Universidade Estadual Paulista "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Departamento Ciências Biológicas – Laboratório de Parasitologia

ÉDER DOS SANTOS SOUZA

Descrição de uma nova espécie de *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) da Amazônia.

Araraquara - SP

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

S731d Souza, Eder dos Santos
Descrição de uma nova espécie de *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) da Amazônia / Eder dos Santos Souza – Araraquara, 2016
86 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: João Aristeu da Rosa

1. Triatominae. 2. Rhodnius marabaensis sp. 3. Amazônia. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

ÉDER DOS SANTOS SOUZA

Descrição de uma nova espécie de *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) da Amazônia.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas a Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

.

Orientador: Profª. Dr. João Aristeu da Rosa

Araraquara - SP

2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho Aos meus pais e irmãos: Maria, Cristiano, Eduardo e Ernand, pelo constante incentivo em obter uma excelente educação e formação acadêmica, não medindo esforços em conceder-me o apoio necessário.

AGRADECIMENTOS

Ao nosso amado Pai Celestial, por conceder-me a vida, saúde, força e motivação para trilhar uma carreira acadêmica. Por preparar o caminho pelo qual consegui superar os desafios do mestrado, pelas oportunidades de adquirir sabedoria, paciência e amadurecimento de caráter em todos os sentidos.

O Profª. Drª. João Aristeu da Rosa, pela orientação deste trabalho, por ter concedido a oportunidade inicial em minha carreira acadêmica, por seu exemplo e pelos recursos concedidos.

A Profª. Drª. Noé Von Carlos Barbosa Atzigen, pela ajuda na coleta de campo no município de Marabá-PA.

A Minha esposa Sara Souza, por seu apoio incondicional, pela ajuda durante o tempo que eu fiquei fora de casa buscando a coleta de dados da pesquisa de mestrado, pela compreensão e paciência.

Ao meu amado filho Ivan Souza, por fornecer a mim a motivação necessária para alcançar meus objetivos como pai e como profissional.

Aos meus amados pais, Maria Pimenta e José Souza, pelo encorajamento e conselhos em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Eduardo Souza e Ernand Pimenta, pelo suporte nos momentos mais desafiadores do mestrado.

Aos professores Dra. Mara Pinto e Dr. Marcos Obara pela participação na comissão examinadora do Exame Geral de Qualificação e Defesa de Dissertação, pelas contribuições nas sugestões.

Ao Prefeito de São Sebastião da Boa Vista, Getúlio Vargas pelo auxilio e apoio no planejamento e execução do projeto de mestrado.

Aos meus colegas de pós-graduação pelo auxílio na execução do projeto.

A todos os funcionários e professores da pós-graduação, por seu comprometimento com a formação profissional dos alunos, concedendo-lhes todo suporte e orientações necessárias para o sucesso e conclusão de suas atividades na pós-graduação desta universidade.

Aos Professores Sebastião Aldo Valente do Instituto Evandro Chagas, e aos colegas Maria Betânia Furtado e Lucas, pelo auxílio no campo durante a pesquisa.

.

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

A todos, meu muito obrigado!

“Nenhum sucesso na vida compensa um fracasso no lar”.

David O. Mackay

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO vi
RESUMO..... vii
ABSTRACT..... viii
INTRODUÇÃO 1
1. Doença de Chagas 1
2. Doença de Chagas na região Amazônica 5
3. Triatomíneos 9
4. Identificação morfológica e molecular dos triatomíneos..... 12
OBJETIVOS..... 14
Objetivo Geral..... 14
Objetivos Específicos..... 14
MATERIAL E MÉTODOS 15
RESULTADOS 20
DISCUSSÃO..... 33
CONCLUSÃO..... 38
REFERÊNCIAS..... 39
CAPÍTULO II - ARTIGOS 50
Description of *Rhodinius marabaensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidade: Triatominae) from the Brazilian state of Pará..... 51
Frist cytogenetic study of *Cavernicola pilosa* Barber, 1937 (Hemiptera, Triatominae)..... 72

CAPÍTULO I - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RESUMO

Descreve-se *R. marabaensis* n. sp. coletada em maio/2014 na reserva Murumurú, município de Marabá, Estado do Pará, Brasil. Observaram-se caracteres morfológicos da cabeça, tórax, abdômen e de ovos. Foram consultadas as descrições morfológicas de 19 espécies de *Rhodnius*, porém exame mais detalhado foi realizado comparativamente com *R. prolixus* e *R. robustus* que ocorrem na região Norte do Brasil. Observou-se também exemplares de 18 espécies de *Rhodnius* depositadas no Laboratório Nacional e Internacional de Referência de Taxionomia de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. Os caracteres morfológicos mais notáveis que distinguem *R. marabaensis* n. sp. são o vértice da cabeça em forma de quilha, o comprimento do segundo segmento da antena, forma do prosterno, mesosterno, metasterno, conjunto de manchas no abdômen, genitália masculina, faces posterior e ventral da genitália externa feminina e os caracteres morfológicos de ovos. A análise filogenética do fragmento do gene Cytb também mostrou diferenças com outras sete espécies de *Rhodnius* avaliadas. Como foram examinados exemplares de *Rhodnius jacundaensis* Serra, Serra & Von Atzingen, 1980 [*nomen nudum*] depositados na Casa da Cultura de Marabá essa espécie entra em sinonímia com *R. marabaensis* n. sp., pois foi verificado que se tratavam da mesma espécie.

Palavras chave: Triatominae, *Rhodnius marabaensis* sp, Amazônia.

ABSTRACT

The species *Rhodnius marabaensis* sp. is described. It was collected in May 2014 in the Murumurú Environmental Reserve in the city of Marabá, Pará State, Brazil. The morphological characteristics of the head, thorax, abdomen, and eggs have been determined. The morphological descriptions of 19 previously described *Rhodnius* species were consulted; however, *R. prolixus* and *R. robustus*, which also occur in the northern region of Brazil, were examined in more detail. The exam included specimens from 18 *Rhodnius* species held in the Brazilian National and International Triatomine Taxonomy Reference Laboratory at the Oswaldo Cruz Institute in Rio de Janeiro, Brazil. The most notable morphological features that distinguish *R. marabaensis* sp. nov. are the keel-shaped apex of the head, the length of the second segment of the antennae, the shapes of the prosternum, the mesosternum, and the metasternum, the set of spots on the abdomen, the male genitalia, the posterior and ventral surfaces of the external female genitalia, and the morphological characteristics of the eggs. A phylogenetic analysis revealed that this species' cyt-b gene fragment differed from the other seven *Rhodnius* species that were evaluated. *Rhodnius jacundaensis* Serra, Serra & Von Atzingen, 1980 [*nomen nudum*] specimens deposited in the Marabá Cultural Center were examined and were found to be synonymous with *R. marabaensis* sp. nov.

Key Words: Triatominae, *Rhodnius marabaensi*, Amazon.

INTRODUÇÃO

1. Doença de Chagas

Carlos Chagas em 1909 descreveu a tripanossomíase americana que posteriormente ficou conhecida como doença de Chagas. Trata-se de uma zoonose transmitida por insetos hematófagos da subfamília Triatominae, cujo agente etiológico é um protozoário hemoflagelado descrito por Chagas com a denominação *Trypanosoma cruzi.* A doença é endêmica em 21 países da América Latina onde predominam os triatomíneos, embora exista uma espécie amplamente dispersa por regiões portuárias de diversos países, que é *Triatoma rubrofasciata.* Fora da região Neotropical ocorrem: *Tritoma migrans, Linshcosteus carnifex, L. chota, L. confumus, L. costalis*, *L. kali*, *L. karupus* encontradas na Índia, assim como *T. amicitae, T. bouvieri, T. cavernicola. T. leopoldi, T. pugasi, T. sinica* na Ásia, porém sem importância epidemiológica, pois nos países em que essas espécies ocorrem não há registro de infecção humana por *T. cruzi*. (Chagas, 1909; Galvão et al., 2003; WHO, 2015; Brasil, 2015;).

A doença de Chagas constitui uma das mais importantes endemias do Brasil e da América Latina conforme Coura (2009). O principal mecanismo de transmissão ocorre por meio das fezes infectadas dos triatomíneos, correspondendo a 80% dos casos da doença de Chagas, relacionadas às características próprias dos vetores, baixas condições sociais e ação desordenada do homem sobre o meio ambiente (WHO, 2013).

A doença de Chagas é causada por um protozoário eucarioto, denominado *Trypanosoma cruzi*, que apresenta-se sob três formas principais: tripomastigota,

forma não reprodutiva, flagelada e com membrana ondulante, seu cinetoplasto localiza-se na porção posterior do parasito e o núcleo é geralmente central; epimastigota, forma flagelada com capacidade reprodutiva por divisão binária no trato digestório do vetor, apresentando o cinetoplasto próximo ao núcleo na região central do parasito; amastigota, forma arredondada sem flagelo livre com capacidade de multiplicação intracelular (Argolo et al., 2008; Noireau et al., 2009). A forma infectante de *T. cruzi* é a tripomastigota metacíclica, que pode ser encontrada na ampola retal dos vetores sendo liberada nas fezes. A primeira etapa do ciclo do protozoário ocorre durante o repasto sanguíneo, quando o triatomíneo suga o sangue gerando compressão abdominal, fazendo-o defecar próximo ao local da picada. Já na segunda etapa do indivíduo se coça em resposta à reação alérgica causada pela saliva do inseto e pode contaminar a lesão da picada com fezes infectadas pelo protozoário, ou ainda contaminar as mucosas e conjuntivas próximas, por onde o parasita penetra. Após a penetração no hospedeiro vertebrado, na terceira e quarta etapa, o parasito invade as células do sistema fagocítico mononuclear, assumindo então forma amastigota intracelular, e multiplica-se por divisão binária. Devido à elevação do número de parasitos, na quinta epata ocorre ruptura da célula liberando formas tripomastigotas no interstício, que irão infectar células vizinhas e disseminar-se pelo organismo por meio dos sistemas linfático e sanguíneo. As células mais atingidas são as do miocárdio e tecidos musculares lisos, e os órgãos mais afetados são o esôfago, cólon intestinal e coração, podendo levar a insuficiência cardíaca, arritmias e ao óbito (Argolo et al., 2008). Na sexta etapa do ciclo de contaminação com o protozoário, novamente durante o repasto sanguíneo, os triatomíneos podem ingerir as formas tripomastigotas circulantes no hospedeiro vertebrado, que ao

atingirem o intestino posterior desses insetos, assumem a forma epimastigota. Então o protozoário volta reproduzir-se assexuadamente, gerando uma infecção permanente no vetor. Esses flagelados migram para a ampola retal do inseto retomando a forma tripomastigota metacíclica, que será expelida com suas fezes, reiniciando o cilo (Argolo et al., 2008; Noiraeu et al., 2009).

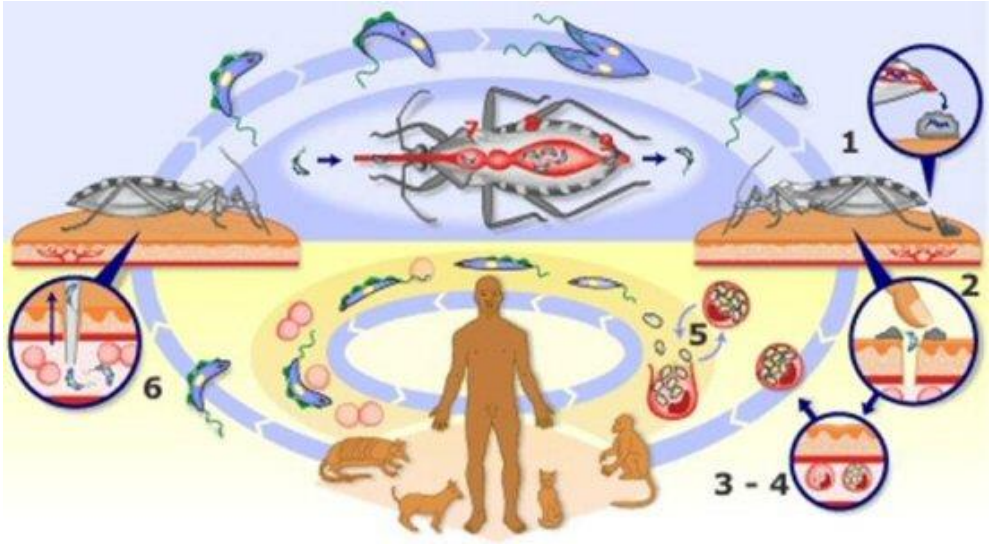

FIGURA 1. Ciclo do protozoário *Trypanosoma cruzi*

Fonte: http:// www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm (acesso em: 04/08/2015).

Há casos da doença de Chagas em países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, alguns países europeus e outros localizados no Oeste do oceano pacífico, devido os processos migratórios de pessoas oriundas de áreas endêmicas e a outros mecanismos de transmissão (Coura, Viñas, 2010). A doação de sangue e órgãos, bem como a infecção congênita são modos primários de infecção nos países de destino dos imigrantes (Schmunis & Yadon, 2010).

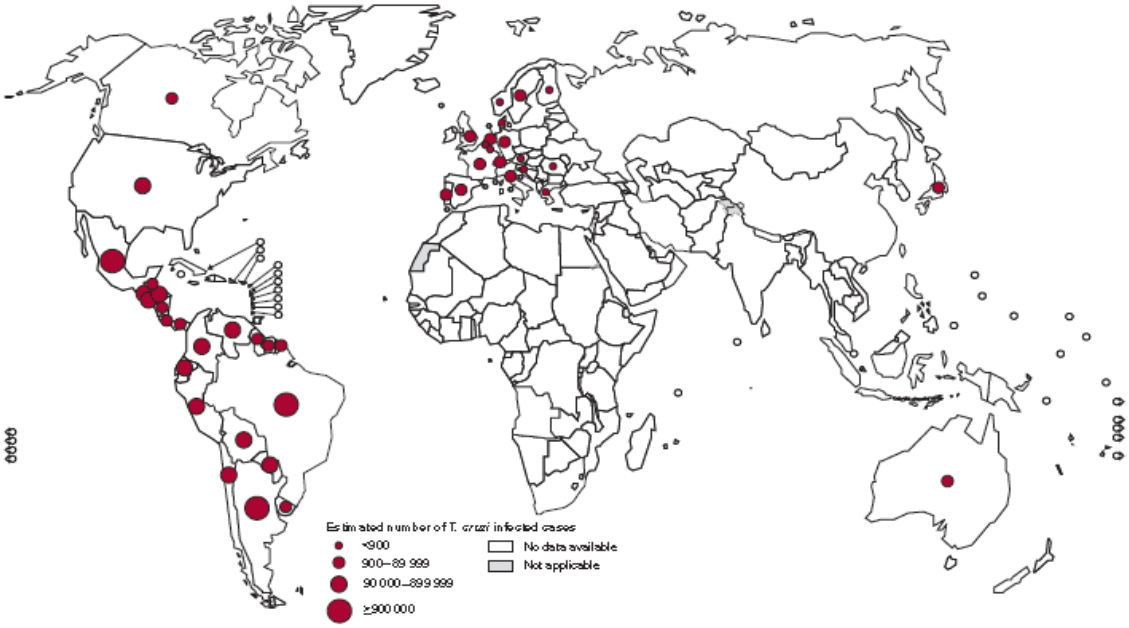

FIGURA 1. Distribuição global de casos de doenças de Chagas (WHO, 2013).

De acordo com o Ministério da Saúde, há cerca de 7-8 milhões de pessoas infectadas ao redor do mundo. Atualmente alguns casos de fase aguda da doença de Chagas ocorrem principalmente na região da Amazônia Legal, por ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba etc.) ou por infecção vetorial. Porém os casos crônicos da doença de Chagas são predominantes no Brasil, com um número aproximado de 3 milhões de indivíduos infectados por *T. cruzi* (Brasil, 2015).

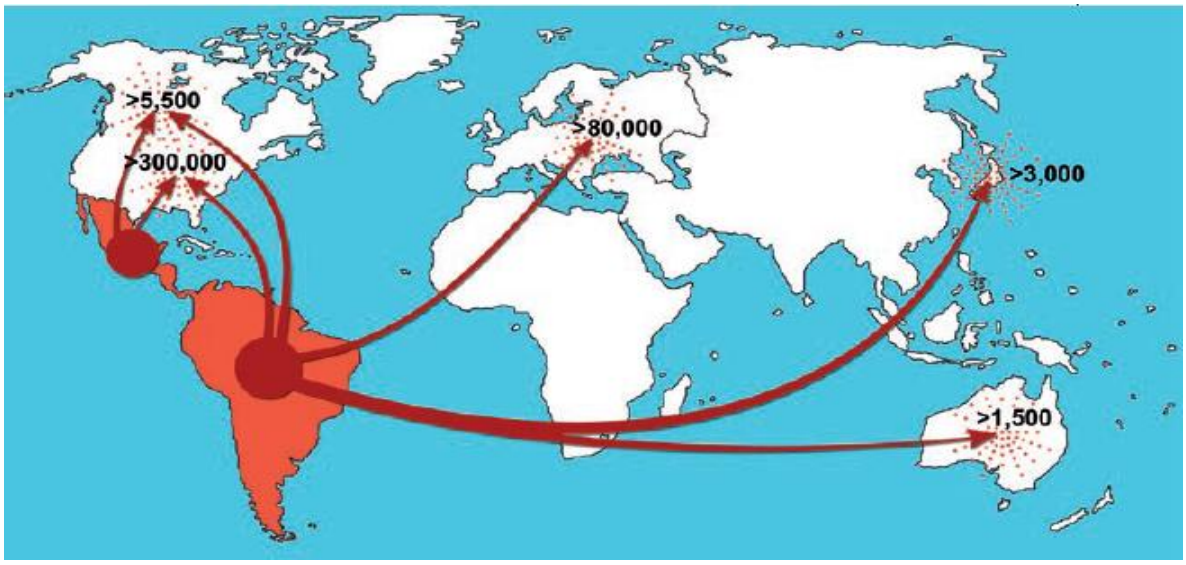

FIGURA 3. Rota migratória da América Latina e estimativa de infectados pelo *T. cruzi* em áreas não endêmicas (Coura & Viñas, 2010).

Na região norte do Brasil, a transmissão via oral tem assumido importância maior, principalmente em razão de sua associação com microepidemias. Na transmissão oral, a ingestão de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* presentes em diferentes alimentos conduz a um quadro agudo que, em muitos casos, evolui para a morte. Embora a transmissão oral seja acidental, dados atuais podem considerar que é uma forma de transmissão endêmica na região da Amazônia (Fraiha et al.,1995; Valente et al., 1999; Junqueira et al, 2005; Pinto et al, 2008).

2. Doença de Chagas na região Amazônica

A doença de Chagas é endêmica na região Amazônica devido a uma grande variedade de espécies da tribo Rhodniini ser bastante comum na região. Esses triatomíneos estão associados a floras e faunas diversificadas, em nichos ecológicos e ecótopos existentes na Amazônia. Algumas espécies de Triatominae tem sido

responsabilizadas pela transmissão de *T. cruzi* do ambiente de mata para o ambiente residencial (Valente V. et al., 1998).

A transmissão da doença de Chagas em zonas rurais e peri-urbanas na região amazônica está relacionada com vetores silvestres *Rhodnius robustus* e *R. pictipes*, que invadem os domicílios e colonizá-los, *Panstrongylus geniculatus*, que tem sido encontrado em peridomicílios. Ainda pode-se falar do *T. maculata*, reconhecido na Venezuela como o vetor de importância secundária e que vem sendo capturado com freqüência em residências humanas no Estado de Roraima, no Brasil (Rojas et al., 2005).

Na tentativa de controlar a doença de Chagas na Amazônia é necessário um sistema de vigilância que permita a detecção rápida de casos agudos e de qualquer indício de domiciliação de triatomíneos endêmicos na região. O processo de colonização desses triatomíneos ainda é pouco conhecido e demanda estudos taxonômicos e comportamentais das diferentes espécies de triatomíneos a fim de investigar quais espécies teriam maior potencial de se estabelecer nos ambientes peridoméstico e doméstico. Esses estudos são relevantes para determinar os fatores de riscos para as diferentes espécies, prováveis mecanismos de adaptação e preferência por ecótopos e animais que possam servir como fonte de alimentação. Esse conhecimento é fundamental para que medidas de controle eficientes possam ser implementadas a fim de combater o processo de domiciliação de espécies na Amazônia (Noireau et al., 2000; Abad-Franch et al., 2009; Valente et al., 2009).

Considerando que 11 espécies de triatomíneos já foram encontradas infectadas naturalmente por *T. cruzi* na Amazônia, o potencial de transmissão vetorial é grande. As espécies mais envolvidas na transmissão para o homem são as do gênero *Rhodnius*, porque são as mais abundantes na região e vivem em

palmeiras ao lado das habitações cujas palmas servem como cobertura de moradias, as fibras utilizadas para confecção de utensílios domésticos e os frutos são consumidos frescos pela população e por animais domésticos locais (Abad-Franch & Monteiro, 2007; 2010). A domiciliação dos vetores da doença de Chagas depende basicamente da ação antrópica sobre o ambiente natural, induzindo os triatomíneos a se deslocarem de seus ecótopos silvestres para residências humanas (Alves, 2007).

As espécies de triatomíneos e sua distribuição na região amazônia, as associações com ecótopos (espécies de palmeiras), os fatores de dispersão e as espécies que mais facilmente seriam adaptáveis a ecótopos artificiais e mais importantes na transmissão da infecção para o homem ainda precisam ser mais amplamente investigados e conhecidos. Estudos morfológicos vem sendo realizados com várias espécies da região, porém estudos moleculares e filogeográficos de triatomíneos da Amazônia se restringem a *R. robustus*, que se mostrou um complexo de populações geneticamente distintas (Monteiro et al., 2003).

Considerando as dificuldades de intervenção para o controle vetorial, atualmente a Amazônia representa um grande potencial para a disseminação da doença de chagas (Araújo et al., 2009). A ocorrência de surtos focais, provavelmente por transmissão via oral, mais especialmente por ingestão de suco de açaí (*Euterpe catinga*) contaminado, vem sendo relatados. Acredita-se que triatomíneos ou suas fezes infectadas por *T. cruzi* entram em contado com o produto em alguma fase do processamento e consumo do suco de açaí. Até o ano de 1998, 17 episódios de surto focal envolvendo 85 casos foram descritos, sendo que a maioria ocorreu no Estado do Pará e os outros, no Amapá, Acre e Amazonas, e não

se encontoru outra evidência satisfatória que explique esses surtos focais a não ser a transmissão pelos alimentos (Rojas et al., 2005).

Para que o controle vetorial seja bem sucedido, agentes de saúde devem ser treinados para reconhecer os triatomíneos regionais e seus ecótopos naturais, detectar e acompanhar a aproximação de espécies silvestre ao domicílio do homem, verificar as taxas de infecção natural por *T. cruzi* e intervir com medidas de controle (Villela et al., 2007; Brasil, 2009). Além de tudo é fundamental que estudos taxonômicos, biológicos, de distribuição e de dispersão, preferências alimentares e de ecótopos dos triatomíneos sejam aprofundados (Noireau et al., 2000; Abad-Franch et al., 2009) para que medidas de controle vetorial na região amazônica sejam planejadas e aplicadas com mais eficácia.

Com a iniciativa dos Países do Cone Sul, que possibilitou a aplicação sistemática de inseticidas de ação residual, o Brasil recebeu a certificação de interrupção da transmissão vetorial por *T. infestans* (Ferreira e Silva, 2006). No entanto, na Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia, realizada em setembro de 2004 em Manaus, foi reconhecido que a doença de chagas apresenta características próprias e muito particulares na Amazônia, que a diferenciam substancialmente, dos padrões habituais da doença de Chagas com tem sido descrita e estudada principalmente no Cone Sul (Rojas et al., 2005). Neste sentido, na referida reunião foi proposto um sistema de cooperação internacional para vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia (AMCHA) formalmente constituída por decisão e vontade política dos Ministros da Saúde da Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, França Guiana, Peru, Suriname e Venezuela.

A iniciativa AMCHA destinada ao controle do *R. prolixus, R. robustus, P. geniculatus e R. brethesi,* tem como objetivo prevenir o estabelecimento em ampla escala da transmissão vetorial endêmica da doença de Chagas na região amazônica implementando um sistema de vigilância epidemiológica regular, integrado e com aproveitamento máximo dos recursos, serviços e programas de saúde já existentes; desenvolver métodos e técnicas de controle, ajustados aos mecanismos de transmissão já conhecidos (transmissão vetorial extradomiciliar, transmissão domiciliar sem colonização pelo vetor, transmissão oral) e gerar novos conhecimentos acerca da epidemiologia da doença na região (OPS, 2004; Rojas et al., 2005).

3. Triatomíneos

Os vetores da doença de Chagas são insetos hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda, classe Insecta, Ordem Hemiptera, Familia Reduviidae e todas as espécies da subfamília Triatominae são potencialmente transmissoras de *T. cruzi.* No entanto, nem todas as espécies participam efetivamente da transmissão da doença via vetorial, pois muitas ainda habitam apenas o ambiente silvestre. Assim pode-se observar uma divisão nos ciclos de transmissão do parasito; um ciclo silvestre e um ciclo doméstico (Forattini, 1980; Argolo et al, 2008).

Na literatura são registrados 18 gêneros subfamilia Triatominae (Galvão et al, 2003; Forero et al, 2004). Os gêneros *Panstrongylus, Triatoma e Rhodnius* são aqueles com maior número de espécies, portanto de maior relevância quanto à transmissão de *T. cruzi* para os seres humanos. As espécies de triatomíneos consideradas de importância epidemiológica são aquelas capazes de colonizar habitações humanas (Lent & Wygodzinsky, 1979). Das 150 espécies de triatomíneos

descritas somente algumas atendem a essa importância epidemiológica, entre elas: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata e Panstrongylus megistus* (Jurberg, Rocha e Galvão, 2009; Rosa et al., 2012; Abad-Franch et al., 2013; Gonçalves et al., 2013; Jurberg et al., 2013; Galvão et al., 2003). Essas espécies são responsáveis por mais de 80% dos casos da doença de Chagas nas regiões endêmicas (Cailleaux et al., 2011).

No final da década de 1980 surgiram propostas baseadas principalmente em aspectos ecológicos e biogeográficos, defendendo a origem polifilética da subfamília. No início do século XXI uma análise cladística utilizando o DNA de 57 espécies retomou a hipótese da origem monofilética, quebrando o que já havia se tornado um paradigma, a origem polifilética dos triatomíneos (Galvão, 2003).

O gênero *Rhodnius* é o mais fácil de identificar por morfologia externa, no entanto, a separação especifica envolve várias dificuldades, como já notado por Neiva e Pinto. O gênero *Rhodnius* está bem caracterizado, o que não acontece com as espécies que o constituem (Neiva & Pinto, 1923).

As espécies do gênero *Rhodnius* têm padrões definidos em relação à biologia, pois a maioria das espécies são silvestres, vivem em folhagens de palmeiras, buracos de árvores, sugando aves, roedores, morcegos e marsupiais, colocam seus ovos aderidos ao substrato o que favorece a sua dispersão, passiva e ativa, pois muitas aves que nidificam nas palmeiras tem hábitos migratórios. Ainda podem ser reconhecidas pela morfologia externa com seu tamanho reduzido e o tubérculo antenífero localizado no ápice da cabeça, genitália masculina caracterizada pela ausência de suporte do falosoma, na maioria das espécies, pelo formato do processo mediano do pigóforo, pela coloração homogênea tendendo sempre para castanho claro/escuro, com manchas mais ou menos acentuadas, e

pela morfologia e ornamentação dos ovos (Abadh Franch, 2009; Lent & Jurberg 1969; Lent & Wygodzinsky, 1979; Barata, 1981; Barata, 1998; Lent, Jurberg & Galvão, 1993; Jurberg, 1995; Jurberg, Lent & Galvão, 1998; Carcavallo et al., 1998; Carcavallo, 1999; Mejia, Galvão & Jurberg, 1999; Jurberg et al., 2005; Jurberg & Galvão, 2006).

Carcavallo et al., (2000) definiram para o gênero *Rhodnius* Stål, quatro complexos a saber: complexo *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 com duas espécies: *R. pictipes* e *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão 1993, complexo *Rhodnius prolixus* Stål 1859 com cinco espécies: *R. prolixus*, *R. domesticus* Neiva & Pinto 1923, *R. nasutus* Stål 1859, *R. neglectus* Lent, 1954 e *R. robustus* Larrousse, 1927; complexo *R. pallescens* Barber, 1932 com três espécies: *R. pallescens*, *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999 e *R. ecuadoriensis* Lent & Leon, 1958; complexo *R. dalessandroi* Carcavallo & Barreto, 1976 com duas espécies: *R. dalessandroi* e *R. milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001. As outras quatro espécies não possuíam caracteres morfológicas suficientes para constituir complexos, a saber: *R. amazonicus* Santos & Sposina, 1973, *R. brethesi* Matta, 1919; *R. neivai* Lent, 1953 e *R. paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977.

Dentre as 19 espécies de *Rhodnius*, são encontradas na região Norte do Brasil: *R. amazonicus, R. barretti, R. brethesi, R. milesi, R. montenegrensis, R. paraensis, R. pictipes, R. prolixus e R. robustus*. A décima espécie encontrada nessa região brasileira e a vigésima do gênero *Rhodnius* é a que se descreve neste trabalho. A descrição desta nova espécie, porém já tinha sido feita e publicada em forma de resumo apresentado no 4º Congresso Brasileiro de Parasitologia ocorrido no Rio de Janeiro em 1980, por isso não foi validada, de acordo com o 9º artigo do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. Devido a isso Carcavallo *et al,*

1998 e Galvão, 2003 consideraram *Rhodnius jacundaensis* Serra, Serra & Von Atzingen, 1980 [*nomen nudum*].

4. Identificação morfológica e molecular dos triatomíneos

As observações morfológicas têm fundamentado a identificação de espécies e sistemática de triatomíneos, principalmente por meio de microscopia óptica. Uma metodologia bastante utilizada para identificação de novas espécies é a análise dos parâmetros morfológicos da genitália masculina (Lent e Wygodzinsky, 1979; Lent e Jurberg, 1967, 1968, 1969, 1975; Jurberg et al., 1997).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), auxilia no esclarecimento da definição de algumas espécies de Triatominae, pois proporciona uma melhor visualização de parâmetros morfológicos com imagens detalhadas. Porém, somente analisar parâmetros morfológicos nem sempre é suficiente para esclarecer a taxonomia de espécies, como por exemplo, as espécies do gênero *Rhodnius* (espécies crípticas) (Rosa et al., 1992; 1999; Costa et al., 1997; Monteiro et al., 2001; Jurberg, 2003). Com relação à sistemática para a distinção dessas espécies, ferramentas mais sensíveis são necessárias. Estudos utilizaram marcadores moleculares baseados no DNA mitocondrial (mtDNA) e nuclear (nDNA) a fim de esclarecer questões filogenéticas de triatomíneos sul-americanos. Os marcadores mais utilizados do mtDNA são os fragmentos 12S, 16S, citocromo oxidase I (COI) e citocromo b (Cytb) e do nDNA, ITS1, ITS2, 18S e a 33 porção D2 do fragmento 28S (Bargues et al., 2000; Martinez et al., 2006; Tartarotti e Ceron, 2005; Hypsa et al., 2002). A correta identificação dos táxons de insetos da subfamília Triatominae e o mapeamento das áreas de risco, apresentam grande importância taxonômica e

epidemiológica, pois pode beneficiar iniciativas para controle vetorial (Almeida et al., 2008).

Em maio/2014 foram coletados em Marabá, Estado do Pará um casal de *Rhodnius* sp., após confronto com a chave descritiva de Lent & Wygodzinsky (1979), assim como com as espécies descritas posteriormente não foi possível efetuar a sua identificação. Ao examinar exemplares identificados como *R. jacundaensis* [*nomen nudum*] e depositados na Casa da Cultura de Marabá, Pará, percebeu-se que se tratava da mesma espécie.

Portanto, o objetivo desta dissertação é descrever essa nova espécie. A descrição de *R. marabaensis* n. sp. foi feita comparativamente com *R. prolixus e R. robustus*, pois apresentam alguns caracteres morfológicos semelhantes e as três espécies ocorrem na região Norte (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão, 2014). A descrição específica pautou-se na observação do casal coletado em maio/2014, assim como de 14 machos e 14 fêmeas depositadas Casa da Cultura de Marabá no qual foram observados caracteres morfológicos e morfométricos da cabeça, tórax, abdômen e ovos, bem como se procedeu a caracterização molecular utilizando o fragmento citocromo b (Cytb).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Descrever uma nova espécie de *Rhodnius* da Amazônia.

Objetivos Específicos

- Caracterizar aspectos morfológicos da nova espécie e comparar os dados morfológicos observados com as demais 19 espécies de *Rhodnius* descritas.
- Mensurar os exemplares machos, fêmeas e ovos, de modo a estabelecer os parâmetros morfométricos.
- Depositar em banco de dados as novas sequencias observadas, disponibilizando-as para posteriores estudos.
- Realizar análise molecular para propor hipóteses filogenéticas, relacionando a espécie descrita com as demais 19 espécies de *Rhodnius* conhecidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a descrição específica de *R. marabaensis* n. sp. foi utilizado um casal de adultos coletados ao invadir uma residência na reserva ambiental Murumurú, município de Marabá, Estado do Pará, Brasil. (Fig. 2) coordenadas (S: 10° 10´ 05,1” e W: 63° 24’ 09,1”) (Fig. 1). Também foram utilizados 14 machos e 14 fêmeas depositadas na Casa da Cultura de Marabá, Pará.

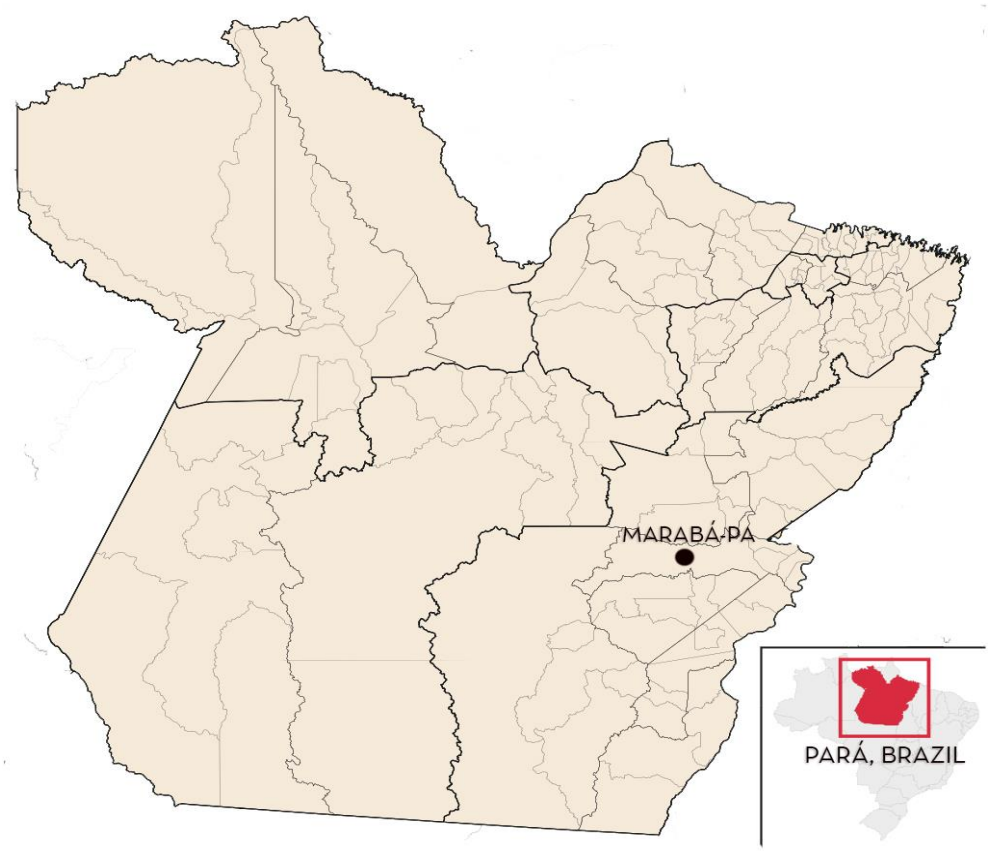

FIGURA 1. Localização do município de Marabá-PA, onde foi coletado *R. marabaensis* n. sp. (S: 05º 21' 54" e W: 49º 07' 24").

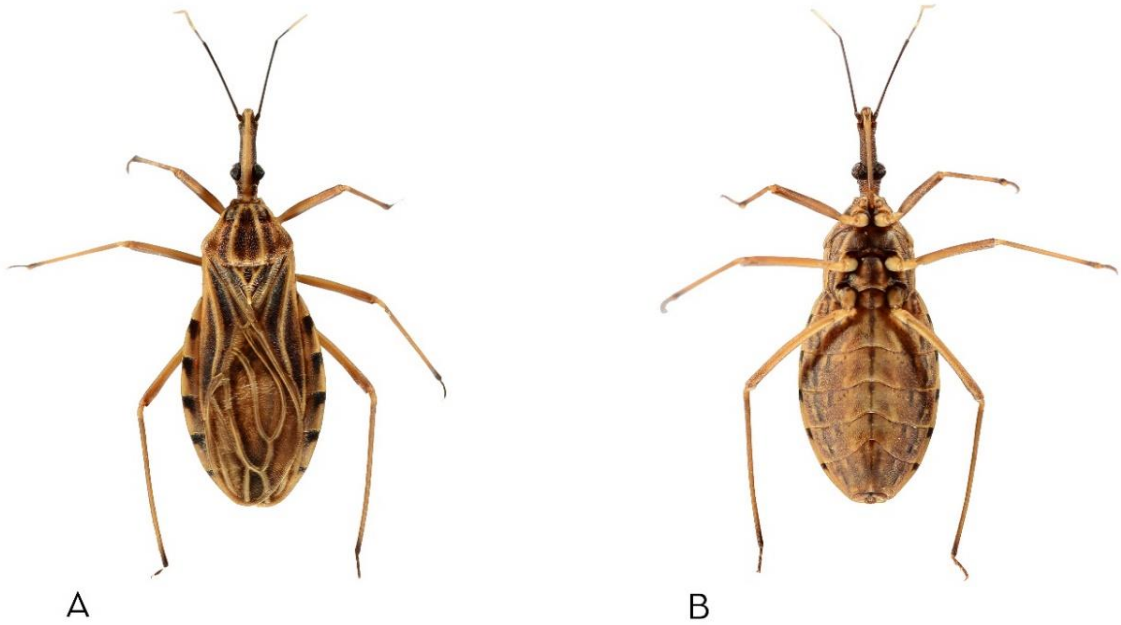

FIGURA 2. *R. marabaensis* sp. nov. fêmea. A, Vista dorsal; B, Vista ventral.

Para o estudo morfológico comparativo foram utilizados exemplares de *Rhodnius prolixus* - CTA 074 (Colônias de Triatominae de Araraquara) e *Rhodnius robustus* – CTA 085 mantidos em colônia no Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil. Os exemplares de *Rhodnius prolixus* CTA 074 que originaram a colônia foram coletados no ambiente silvestre da Venezuela em 23/05/1983. A colônia CTA 085 de *R. robustus* é mantida desde fevereiro/1972 a partir de exemplares procedentes do Peru. (Fig. 3)

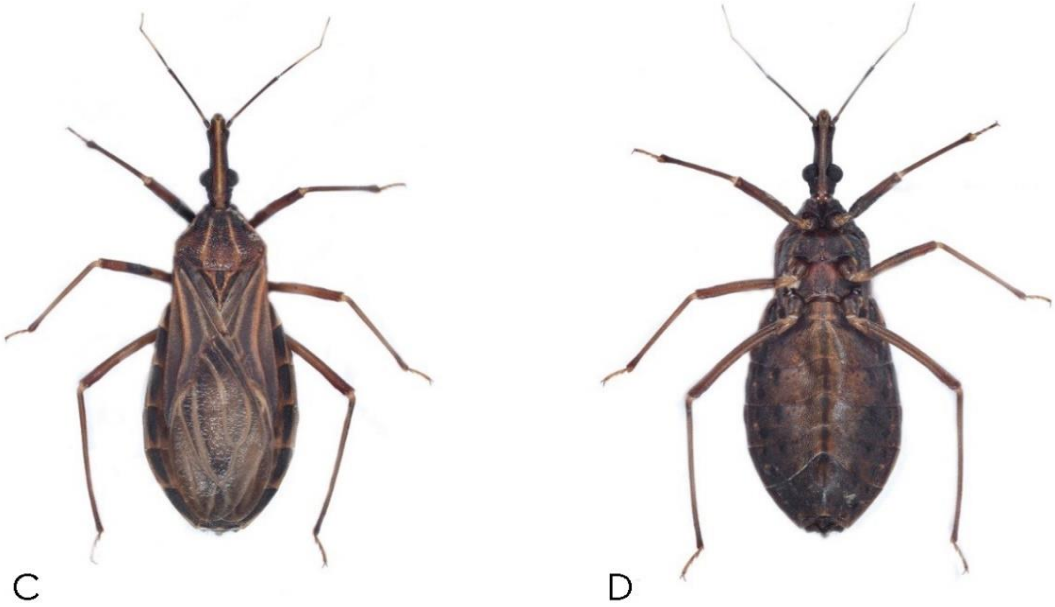

FIGURA 3. *R. prolixus* fêmea. C, Vista dorsal; D, Vista ventral.

FIGURA 4*. R. robustus* fêmea. E, Vista dorsal; F, Vista ventral.

O estudo comparativo de *R. marabaensis* n. sp. com *R. prolixus* e *R. robustus,* assim como com nove outras espécies foi realizado utilizando-se a chave dicotômica de Lent & Wygodzinsky, (1979). As descrições de *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1999; *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999; *R. milesi* Valente *et al.,* 2001; *R. zeledoni* Jurberg, Rocha & Galvão, 2009; *R. montenegrensis* Rosa *et al*., 2012 e *R. barretti* Abad-Franch et al., 2013 também foram consultadas. Um exemplar de *R. marabaensis* n.sp**.** foi observado comparativamente com espécimes de 18 espécies de *Rhodnius* depositadas no Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, localizado na Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. A única espécie não observada comparativamente foi *R. amazonicus* que se encontra depositada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sendo assim foi comparado com dados da literatura.

Microscópio estereoscópico Leica MZ APO e o sistema Motic Images Advanced, Hversion 3.2 foram utilizados para as mensurações efetuadas, assim como para o estudo da genitália masculina de *R. marabaensis* n. sp. e *R. robustus*. Para o estudo comparativo com a genitália masculina de *R. prolixus* foi utilizado a descrição de Lent & Jurberg, (1969).

Tanto machos (15) e fêmeas (15) foram mensurados pelos seguintes parâmetros: comprimento total (TL), comprimento da cabeça (HL), comprimento dos quatro segmentos da antena (A_1, A_2, A_3 e A_4) e dos três segmentos da probóscida (R_1, R_2 e R_3); assim como a distância entre os olhos (IE), anteocular (AO) e pós-ocular (PO), diâmetro dos olhos (DE); largura máxima do abdômen (MWA) e do tórax (MWT); comprimento, largura e diâmetro da abertura opercular de ovos (Lent & Wygodziinsky 1979; Dujardin et al*.,* 1999; Rosa et al, 2000).

Os 13 ovos de *R. marabaensis* n. sp. mensurados por microscopia óptica e estudados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidos do útero da fêmea coletada em maio/2014, quando cortada para estudo da genitália feminina. Além dos ovos e da genitália feminina foram observados por MEV, a cabeça, a porção ventral do tórax, o escutelo e o pigóforo.

Para MEV, as cascas de ovos e as genitálias externas de fêmeas adultas foram limpas em aparelho de ultrassom, desidratadas em série alcoólica, secas em estufa a 45º por 20 min e em seguida fixados em pequenos cilindros de alumínio com esmalte incolor. A seguir foram metalizadas por “sputtering” durante dois minutos com potência de 10mA em aparelho da marca Edwards, segundo Rosa et al (2010).

Após o processo de metalização as amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Topcon SM-300 segundo Rosa et al (1999).

Por meio de microscopia óptica foram observadas as estruturas da genitália masculina de exemplares machos de *Rhodnius marabaensis.* Esse processo pode ser observado no inseto seco com o pigóforo puxado para fora, ou mais facilmente após aquecimento em solução de hidróxido de potássio a 10% até que toda a matéria orgânica seja destruída segundo Costa et al. (1991).

As mensurações de machos, fêmeas e ovos de *R. marabaensis, R. prolixus* e *R. robustos* foram testadas quanto a normalidade (teste Shapiro-Wilk) e igualdade de variâncias (teste f de Levene). Para comparação múltipla das médias foi aplicado o teste ANOVA one way com utilização do pós-teste de Tukey. Foi adotado nível de significância de 5%. Os dados foram analisados no Softwere bioestat 5.0.

A extração do DNA genômico, mitocondrial foi realizado de acordo com o protocolo de Sambrook e Russel (2001). Para tanto três pernas foram excisadas e processadas. Os iniciadores utilizados para amplificar o fragmento do gene foram aqueles propostos por Monteiro et al. (2003). Para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado o termociclador Gene Amp® PCR System 9700 – Applied Biosystems ™.

Os fragmentos amplificados foram purificados e sequenciados em duplicata (forwed e rowerd). A sequência de consenso foi obtida utilizando o software BioEdit. As sequências homólogas disponíveis no GenBank foram alinhadas e utilizadas para análise filogenética. O dendrograma foi reconstruído com base no algoritmo de probabilidade máxima disponível no MEGA 6.0 software, Considerando o alinhamento de 663 pares de base (bp) do fragmento cyt-b de 17 haplótipos (15 obtained from *GenBank* database). O apoio dos clados foi estimado usando 1000 bootstrap repetições com *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* como grupos externos (Tabela 3). A distância p foi medida usando MEGA 6.0 software (Tabela 4).

RESULTADOS

Sistemática. *Rhodnius marabaensis* n. sp.

Holotipo. ♀, BRASIL: Insetário de Triatominae da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, Rodovia Araraquara-Jaú km 1. 2015.

Paratipo. BRASIL: Fundação Casa da Cultura de Marabá, Folha 31, quadra especial, lote 1, Nova Marabá-PA.

Sinonímia. *Rhodnius jacundaensis* Serra, Serra & Von Atzingen, 1980 [*nomen nudum*]

Etimologia. O nome *Rhodnius marabaensis* n. sp. foi escolhido pois essa espécie foi encontrada em Marabá, PA por Noé Von Atzingen e Maria Betânia Ferreira.

Descrição. Comprimento do macho 20,41±0.01mm, da fêmea 22,35±0,02mm, largura do pronoto do macho 4,25±0,01, da fêmea 4,88±0,02, largura do abdômen do macho 6,22±0,01mm, da fêmea 6,92±0,02mm (Tabela 01).

Tabela 1. Média de mensuração (mm) de 15 espécimes de fêmeas e machos de *R. marabaensis* sp. nov., *R. prolixus* e *R. robustus*.

	Machos			**Fêmeas**		
	R. marabaensis	*R. prolixus*	*R. robustus*	*R. marabaensis*	*R. prolixus*	*R. robustus*
HL	**4.90** [a]	3.87 [b]	3.82 [c]	**5.32** [a]	3.90 [b]	4.06 [c]
IE	0.62 [a]	0.53 [b]	0.64 [a]	0.59 [a]	0.56 [b]	0.67 [c]
AO	2.21 [a]	2.05 [b]	2.23 [c]	3.04 [a]	2.26 [b]	2.38 [c]
PO	0.98 [a]	0.92 [b]	0.72 [c]	1.06 [a]	0.77 [b]	0.78 [c]
DE	1.72 [a]	1.94 [b]	1.00 [c]	1.91 [a]	1.68 [b]	1.64 [c]
R1	0.97 [a]	0.55 [b]	0.91 [c]	0.93 [a]	0.57 [b]	0.97 [c]
R2	**3.87** [a]	3.25 [b]	3.02 [c]	**3.77** [a]	3.32 [b]	3.30 [c]
R3	0.87 [a]	0.33 [b]	0.92 [c]	0.77 [a]	0.39 [b]	0.96 [c]
TL	**20.41** [a]	19.98 [b]	20.20 [c]	**22.35** [a]	20.98 [b]	21.28 [c]
MWT	4.25 [a]	4.62 [b]	4.06 [c]	4.88 [a]	4.82 [b]	4.12 [c]
MWA	**6.22** [a]	5.93 [b]	6.03 [c]	**6.92** [a]	6.75 [b]	6.56 [c]
A1	0.48 [a]	0.38 [b]	0.37 [c]	0.45 [a]	0.37 [b]	0.38 [c]
A2	**4.72** [a]	3.04 [b]	3.28 [c]	**4.47** [a]	2.88 [b]	3.18 [c]
A3	2.68 [a]	2.25 [b]	2.32 [c]	3.05 [a]	1.94 [b]	2.41 [c]
A4	1.05 [a]	0.98 [b]	1.54 [c]	1.15 [a]	0.94 [b]	1.64 [c]

HL: comprimento da cabeça; IE: distância interior entre os olhos; AO: distância anteocular; PO: distância postocular (excluindo pescoço); DE: diâmetro do olho; R1, R2 and R3: comprimentos do primeiro, segundo e terceiro rostral; TL: comprimento total dos triatomíneos; MWT: largura máxima do tórax; MWA: largura máxima do abdomen; A1, A2, A3 and A4: 1º, 2º 3º, e 4º segmento antenal, respectivamente; a,b,c: letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies. Tukey: $p < 0,05$. Os valores em negrito indicam os principais achados.

Cabeça com cor preta salvo o vértice (porção longitudinal dorsal, central) elevado amarelo-palha em forma de quilha (Fig. 1). Essa quilha apresenta o mesmo formato desde o início do clípeo até a porção posterior dos ocelos, desse modo a delimitação do clípeo é percebida pelas genas e jugas (1+ 1) que se localizam nas

laterais (fig 5). Porém, o início das genas é anterior ao início do clípeo, desse modo as genas avançam para o ante-clípeo que apresenta forma arredondada. Ocelos cristalinos, claros. Olhos com omatídeos de cor preta e amarela-palha. Primeiro e segundo segmentos da antena com cor amarela-palha, terceiro segmento com os dois terços posteriores de cor branca, quarto segmento totalmente branco. Segundo segmento antenal significativamente maior que os demais, (10,3 vezes maior que o primeiro; 1,65 vezes maior que o terceiro e 4,3 vezes maior que o quarto) (Tab .1)

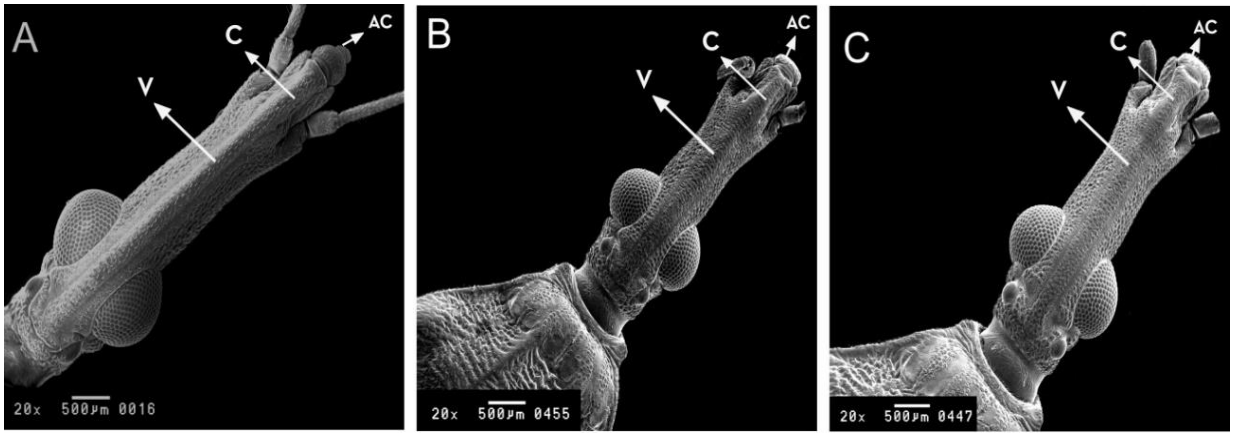

FIGURA 5. Cabeça por MEV. A: *R. marabaensis*; B: *R. prolixus*, C: *R. robustus.*
V: vértice; C: Clípeo; AC: Anticlípeo.

O tórax dorsal (pronoto) com forma trapezoidal delimitado em toda sua a extensão por carena de cor amarela-palha. Lobos anteriores com quatro conjuntos de manchas pretas. Os dois lobos centrais delimitados por carenas submedianas de cor amarela-palha com mesmo padrão de manchas pretas. Os dois lobos laterais maiores, também iguais e situados entre os limites externos do tórax e as carenas submedianas. Escutelo triangular delimitado nas laterais por cor preta muito perceptível, com porção interna também triangular de cor amarela-palha e delimitada por carenas grossas e salientes. A porção posterior (ponta) do escutelo, quando retiradas as asas, atinge 2/3 do urotergito I (Fig. 6, 7).

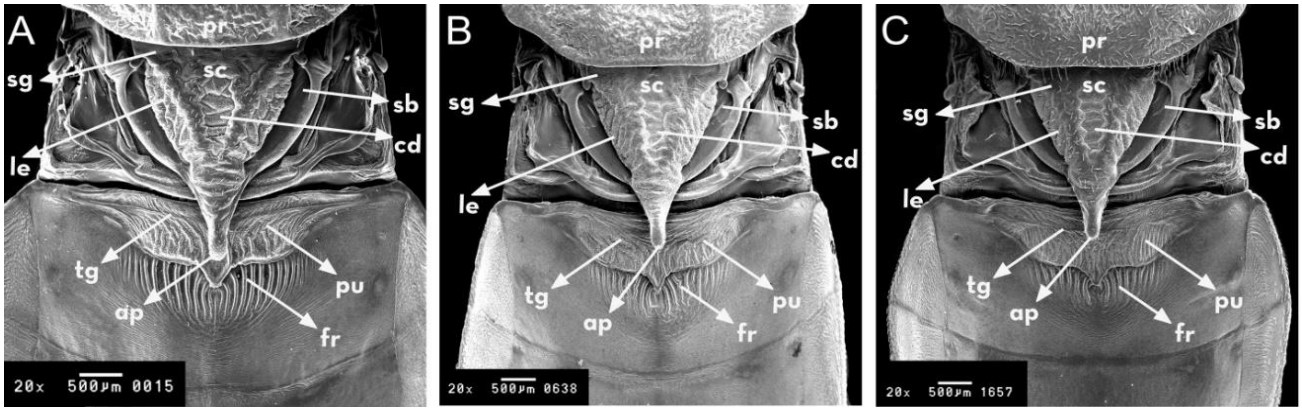

FIGURA 6. Escutelo e processo I do urotergito por MEV. A: *R. marabaensis* n. sp.; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*; pr: pronoto; sc: escutelo; sb: base de semicircular; sg: espaço glabro; cd: depressão central; le: borda lateral; ap: ápice do escutelo; pu: processo do urotergito I; tg: sulco transversal; fr: franja.

O tórax em visão ventral mostra o prosterno com sulco estridulatório de cor preta, retilíneo nas laterais, muito bem definido, sulcado, fundo; na porção posterior assume a forma afunilada e termina em ponta fina entre o par anterior de pernas (Fig.7). O mesosterno tem duas áreas elevadas de cor preta e separadas por uma depressão amarela-palha. O limite do mesosterno com o metasterno é constituído por um conjunto de três carenas, elevadas e salientes. As duas carenas laterais são de cor preta e a central de cor amarela-palha. Essas três carenas mostram-se curvas para o sentido anterior. A carena central, elevada e saliente mostra uma depressão semi-circular na porção central no limite com o metasterno. O metasterno tem a forma aproximada de um retângulo, a porção central é de cor preta e delimitada por duas carenas de cor amarela-palha (Fig. 8).

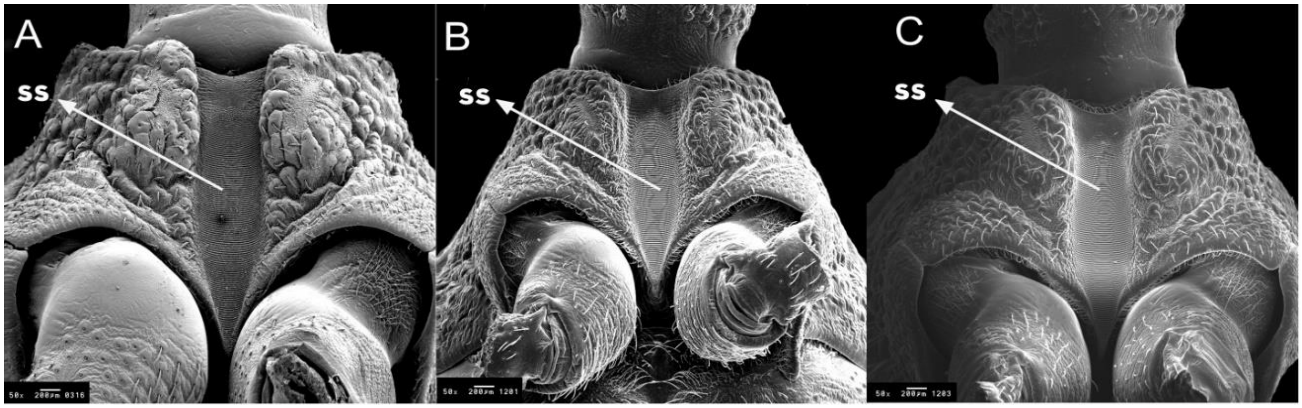

FIGURA 7. Tórax ventral por MEV. SS: Sulco Estridulatorio; A: *R. marabaensis* n. sp.; B: *R. prolixus*; C: *R.robustus*.

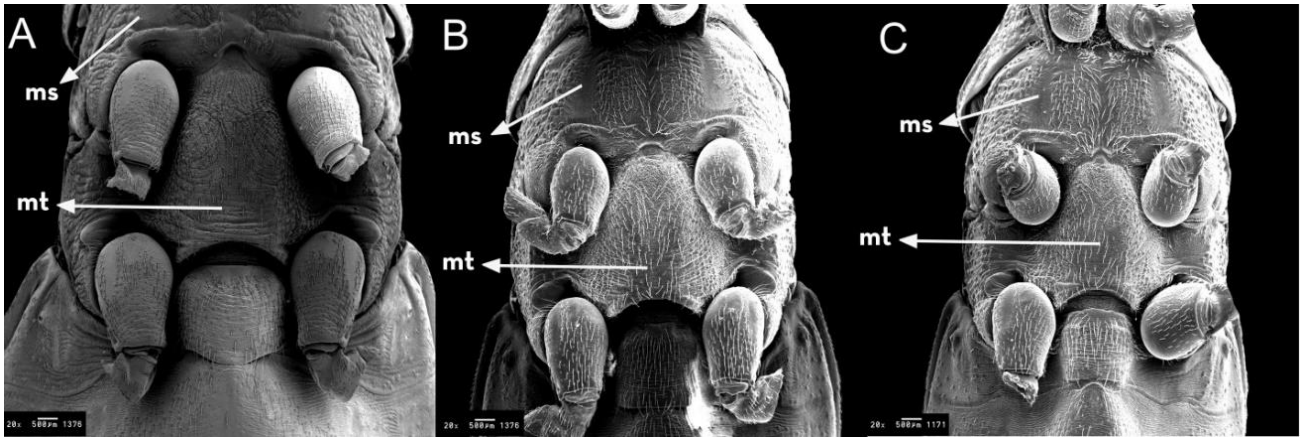

FIGURA 8. Tórax ventral por MEV. ms: mesosterno; mt: metasterno. A: *R. marabaensis*; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*.

Pernas com tonalidade geral amarela-palha. Coxas com manchas amarela-palha e pretas; trocanteres com cor amarela-palha sem manchas; fêmures de cor amarela-palha com manchas longitudinais pretas; tíbias amarelas-palha, salvo a sexta parte posterior em continuidade com os segmentos tarsais de cor preta (Fig. 2).

O abdômen visto por visão ventral apresenta-se com cor predominante amarela com conjuntos de listras pretas, uma na porção longitudinal central e (2+2) nas laterais, acima do conexivo,. Primeiro segmento com mancha longitudinal preta

que se situa entre duas amarela-palha mais largas. Segundo, terceiro, quarto e quinto segmentos abdominais ventrais com (1+1) conjuntos em forma de curva de manchas de cor marrom escuro. Essas manchas tem início na linha divisória anterior e se estendem em diagonal à porção central dos segmentos. Conexivo dorsal formado por manchas amarelas e pretas que preenchem metade de cada segmento, largas na porção anterior e se estreitam na porção posterior interna. A mancha preta do conexivo do sexto segmento é menor que as dos quinto, quarto, terceiro e segundo segmentos (Fig. 2). O processo do I do urotergito, que é percebido quando as asas são retiradas é formado basicamente por duas partes: a parte anterior com a cutícula estriada que contrasta com as áreas circundantes com cutícula lisa, apresenta formato triangular em nível superior, possui um sulco transversal bem delimitado. A segunda porção posterior à primeira e em nível inferior é constituída por um conjunto de franjas transversais e retas (Fig. 7).

Na genitália masculina o falo (P) pela vista dorsal é constituído pelo endosoma (En) pela extensão mediana da placa basal (EPlb) e a placa basal (Plb). Por visão ventral o falo (P) é formado pela conjuntiva (Cj), falosoma (Ph), processo do falosoma (PrPh), extensão da placa mediana basal (EPlb), processo do gonopóro (PrG) e a placa basal (Plb). No falo por visão lateral foi observado a conjuntiva (Cj), endosoma (En), extensão da placa mediana basal (EPlb), placa basal (Plb), falosoma (Ph) e o processo do falosoma (PrPh) (Fig. 9). O processo mediano do pigóforo é alongado e com ponta arredondada, inserido em uma ampla base triangular (Fig. 10).

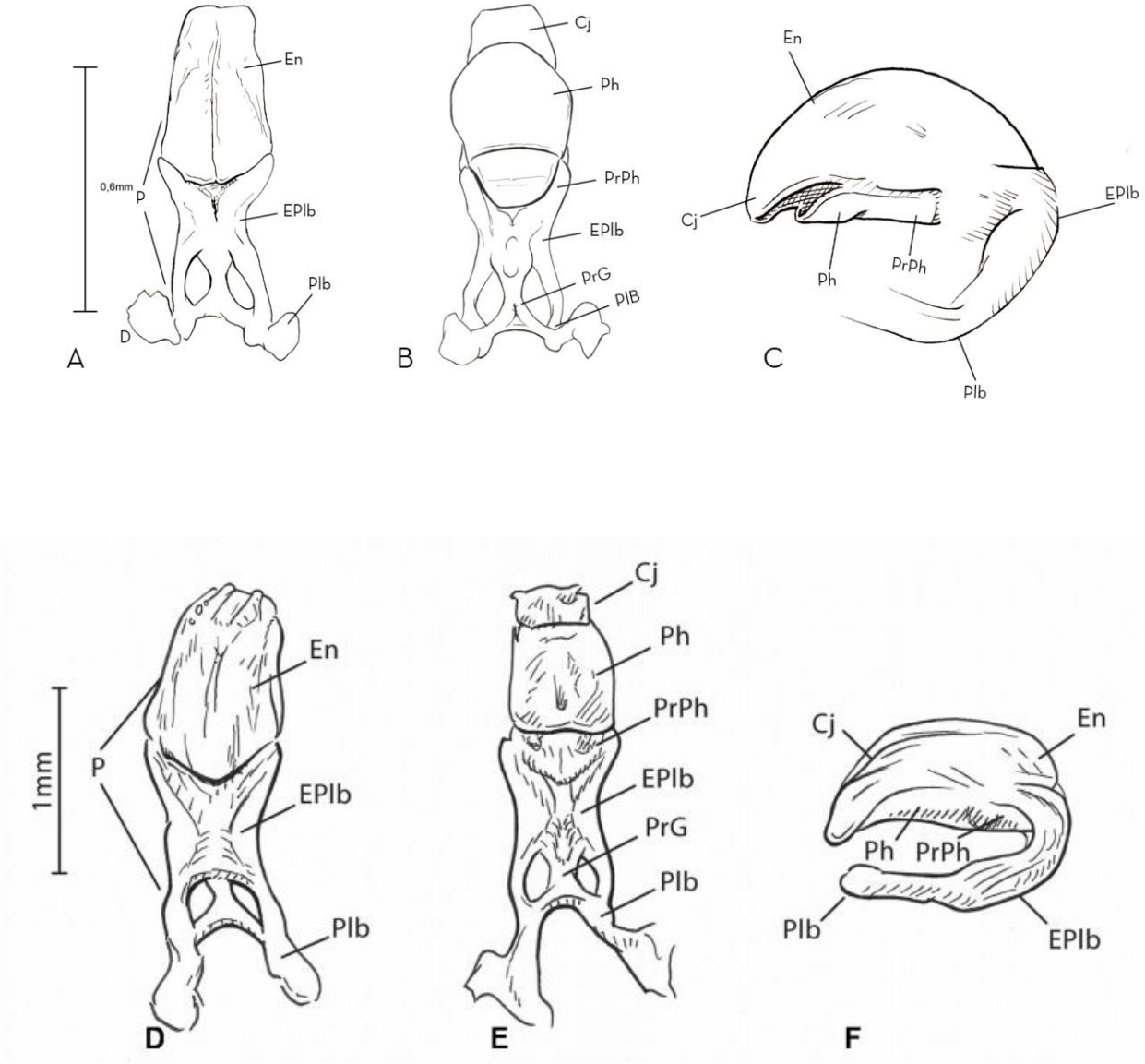

FIGURA 9. Falo de *R. marabaensis* n. sp. (A: vista dorsal; B: vista ventral; C: vista lateral) e *R. robustus* (D: vista dorsal; E: vista ventral; F: vista lateral). Cj, conjuntivo; En, endossomo; EPlb, extensão mediana da placa basal; P, falo; Plb, placa basal; PrG, processo gonoporo; PrPh, processo falosoma; Ph, falosoma; PrCj, processo conjuntivo.

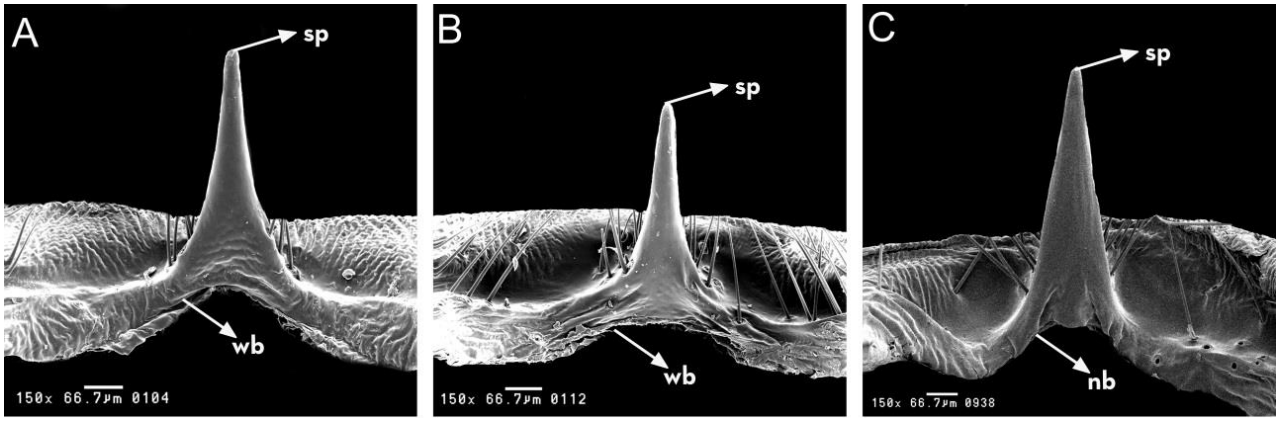

FIGURA 10. Processo mediano do pigóforo por MEV. A: *R. marabaensis* n. sp.; B: R. *prolixus*; C: *R. robustus*. gp: ponta grossa: nb: base triangular estreita; sp: ponta afilada; wb: ampla base triangular.

A face dorsal da genitália externa feminina examinada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra que o segmento VII se divide com o segmento VIII por meio de uma linha ligeiramente irregular e forma (1 + 1) pontas triangulares no limite entre o conexivo e o segmento VIII. O segmento VIII tem forma trapezoidal. O segmento IX aparece como (1+1) saliências. O segmento X se mostra como uma pequena curva na porção central onde se delimita com o segmento VIII (Fig. 11).

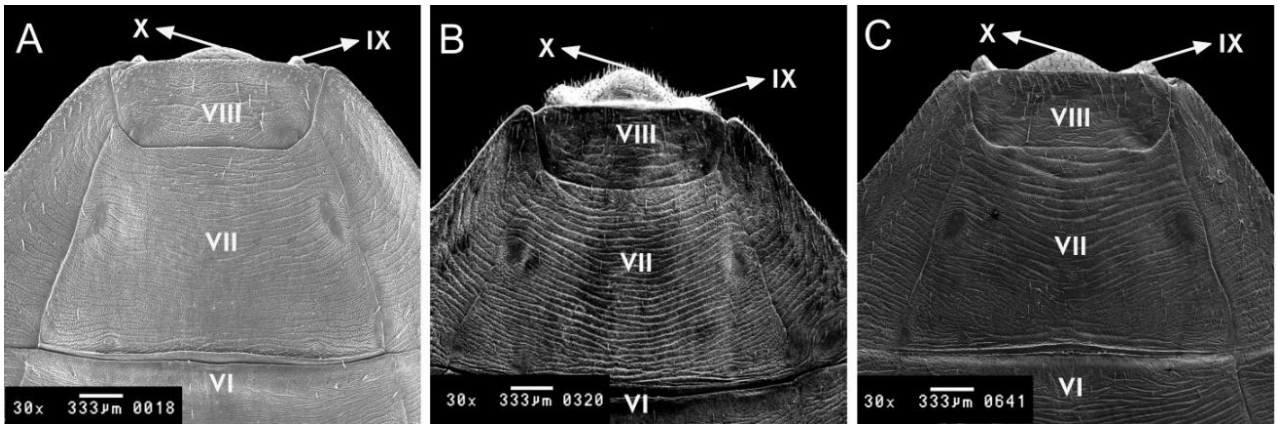

FIGURA 11. Genitália externa feminina por MEV, face dorsal . A: *R. marabaensis* n. sp.; B: R. *prolixus*; C: *R. robustus*. VI , VII, VIII , IX , X, tergitos.

Pela face posterior percebe-se (1+1) apêndices no limite do segmento VIII com o IX. O segmento X tem forma semicircular com uma pronunciada fenda central em forma de “V” invertido e com (1+1) saliências no limite posterior com segmento X. Visualiza-se também (1+1) gonocoxito 8 e (1+1) gonapófise 8 (Fig. 12).

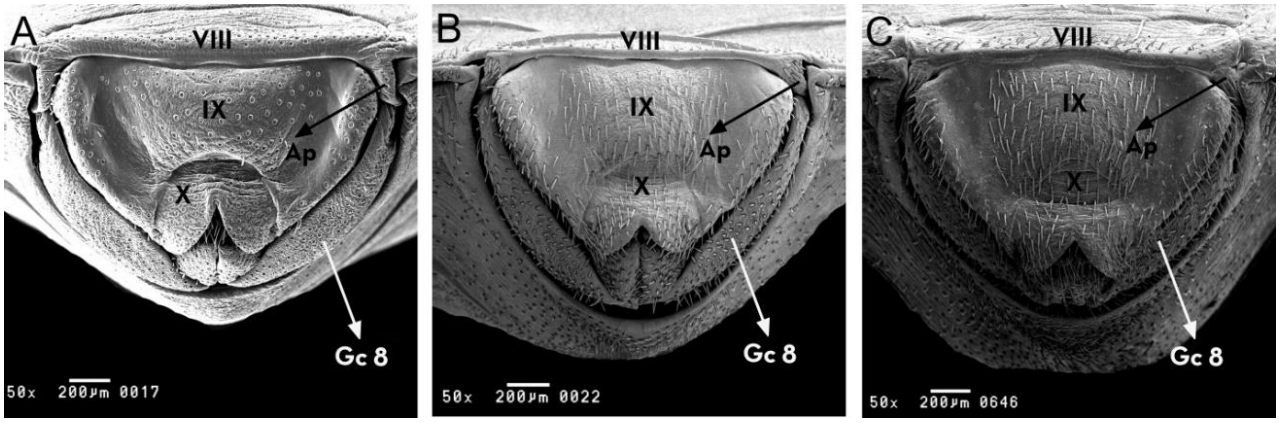

FIGURA 12. Genitália externa feminina por MEV, face posterior. A: *R. marabaensis* n. sp.; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*. Ap: apêndices; Gc 8: gonocoxito VIII; Gp 8: gonapófise VIII; VII, VIII, IX: tergito; X: segmento

Vista pela face ventral nota-se que a linha que divide o VII segmento com os gonoxitos 8 e gonapófises 8 é curva nas porções laterais e a seguir assume a forma de (1+1) pequenas curvaturas ascendentes e uma ligeira depressão na porção central. O segmento IX forma (1+1) abas laterais na divisa com o segmento X e apresenta na posição sub-intermediária (1+1) fendas transversais. Após as fendas transversais assumem a forma de dois triângulos, cujas pontas se apresentam separadas na porção central. O segmento X é o limite externo da genitália externa feminina e se apresenta como uma estreita faixa curva e convexa (Fig. 13).

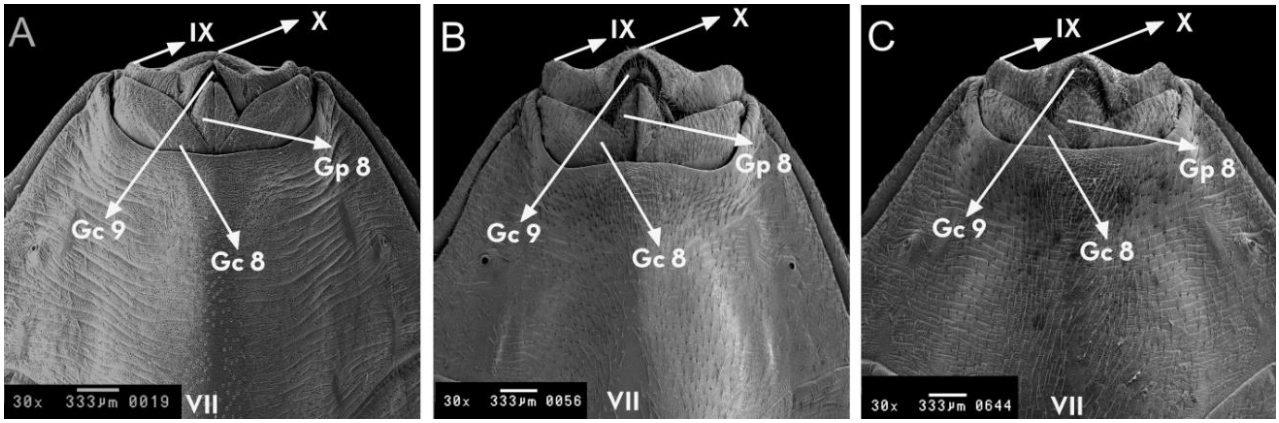

FIGURA 13. Genitália externa feminina por MEV, face ventral. A: *R. marabaensis* n. sp.; B: R. *prolixus*; C: *R. robustus*. Gc 8: gonocoxito VIII; Gc 9: gonocoxito IX; Gp 8: gonapófise VIII; VII, IX: esternitos; X: segmento

As cascas de ovos medem 1,59 mm de comprimento e 0,71 mm de largura, apresentam colo e colarinho evidentes (Tab. 2 e Fig. 14). As células exocoriais são nitidamente delimitadas, com granulações internas dispostas circularmente. Os tubos foliculares de cada célula exocorial não apresentam diferenças quanto ao diâmetro (Fig. 15).

Tabela 2. Média de mensuração (mm) de 13 ovos de *R. marabaensis* sp. nov., *R. prolixus* e *R. robustus*.

	R. marabaensis	*R. prolixus*	*R. robustus*
L (mm)	1.54 ± 0.04 [a]	1.73 ± 0.02 [b]	1.61 ± 0.04 [c]
W (mm)	0.87 ± 0.01 [a]	0.71 ± 0.06 [b]	0.93 ± 0.01 [c]
Oo (mm)	0.49 ± 0.01 [a]	0.67 ± 0.01 [b]	0.73 ± 0.01 [c]

L: comprimento (40x); W: largura (40x); Oo: abertura do operculo (80x); a,b,c: letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies. Tukey: $p < 0,05$.

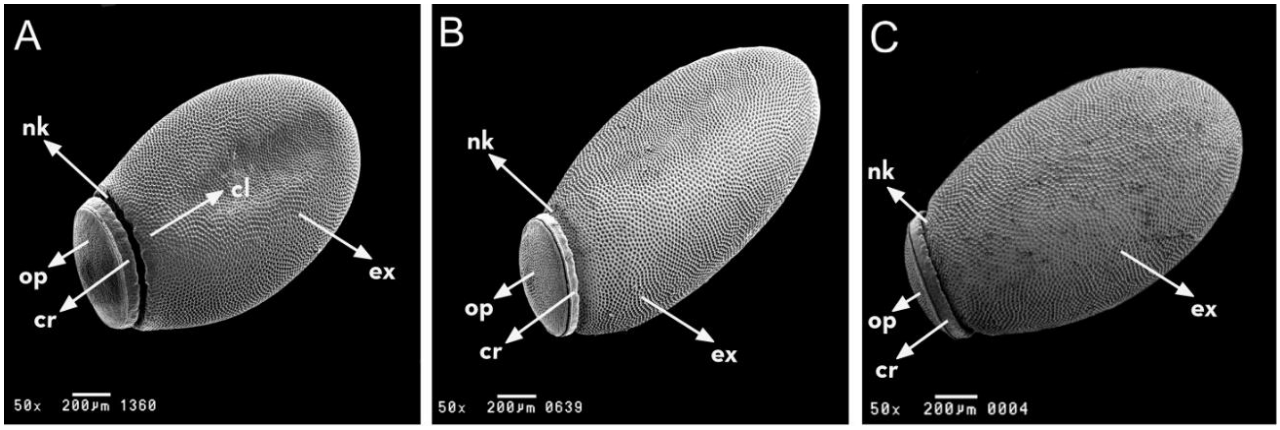

FIGURA 14. Ovo visão geral por MEV. A: *R. marabaensis* n. sp.; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*. cl: colarinho; cr: rim corial; ex: exocório; nk: pescoço; op: opérculo

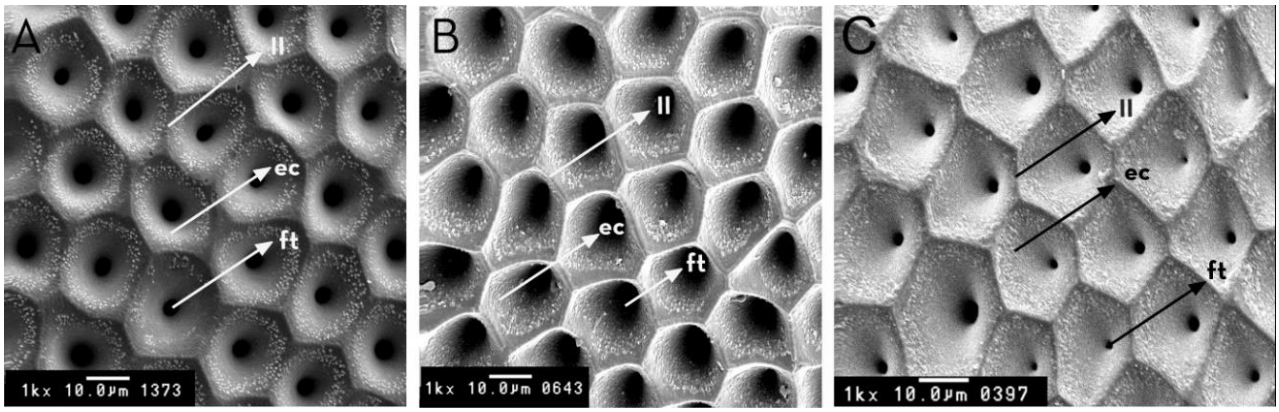

FIGURA 15. Detalhe do exocório de ovo por MEV. A: *R. marabaensis* n. sp.; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*; ec: células do exocório; ft: tubo foliculares; ll: linha limitante

Reconstrução filogenética da nova espécie *R. marabaensis* sp. nov. obtida por alinhamento de 16 sequências de fragmentos do gene cyt-b, de outras 10 espécies de *Rhodnius* (*R. barretti, R. brethesi, R. ecuadoriensis* Lent et al. 1958*, R. montenegrensis, R. neglectus* Lent 1954*, R. pallescens* Barber 1932*, R. pictipes, R. prolixus, R. robustus* - haplotypes I, II, III, IV - and *R. stali* lent et.al. 1993) (Tab. 3).

Tabela 3. Espécies usadas para compor o alinhamento de sequências do fragmento do gene mitocondrial Cytb.

Especies	Código de Acesso
Rhodnius marabaensis **n. sp.**	-
R. barretti	JX273159
R. brethesi	AF045714
R. ecuadoriensis	KC543508
R. montenegrensis CTA 088	-
R. neglectus	JX273156
R. pallescens	FJ229359
R. pictipes	JX273157
R. prolixus	EF011716
R. robustus III	AF421342
R. robustus III	EF011715
R. robustus IV	EF011712
R. robustus II	EF011713
R. robustus I	EF011718
R. stali	FJ887791
T. infestans (outgroup)	GU807570
P. megistus (outgroup)	KC249232

Códigos de acesso como relacionados na base de dados GenBank.

Os dados moleculares com base no fragmento do gene cyt-b indicam que *R. marabaensis* sp. nov. está intimamente relacionada com espécies de *R. robustus* com apoio bootstrap de 93%. Os quatro haplótipos de *R. robustus* foram dispersados, mostrando que este taxon é parafilético: i) *R. robustus* I posicionado com *R. prolixus* e *R. neglectus*; ii) *R. robustus* II é próximo a *R. montenegrensis*; iii) *R. robustus* IV aparece próximo da nova espécie *R. marabaensis* sp. nov. + *R. robustus* III (Fig. 16).

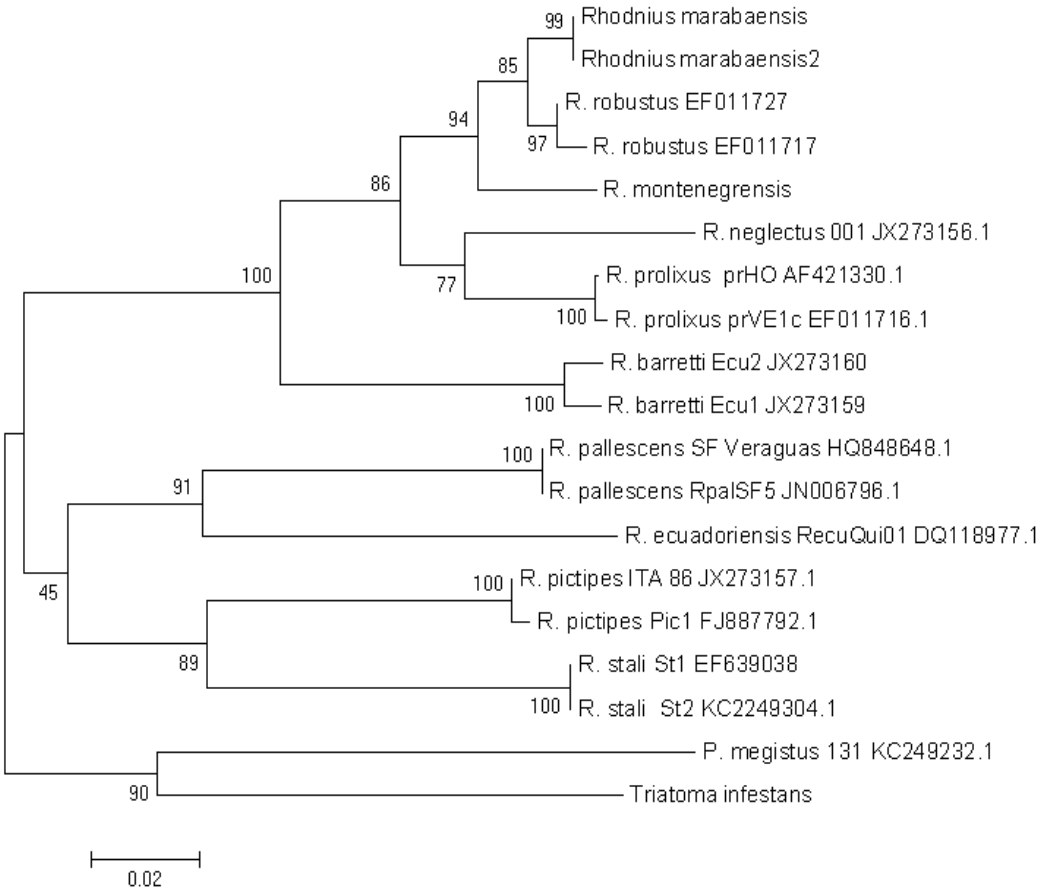

FIGURA 16. Dendograma filogenético (NJ) gerado pelo programa MEGA 6.0 e baseado no alinhamento do fragmento Cytb

Os valores de distância p revelaram uma variação genética entre *R. marabaensis* sp. nov. e *R. robustus* III acima de 0.3%; entre 1.9% para 4.5% quando comparada a nova espécie com os haplótipos de *R. robustus* IV e II respectivamente; e 7.2% em comparação com *R. robustus* I. Este último valor é superior comparando *R. marabaensis* sp. nov. com outras espécies tais como *R. montenegrensis* (4.2%) e *R. prolixus* (6.3%) e perto de *R. neglectus* (8.2%), o que indica que haplótipos de *R. robustus* I precisam ser avaliados separadamente (Tabela 4).

Tabela 4. Distância genética (%) entre as espécies usadas na construção filogenética (distância p) baseado no alinhamento das sequências do fragmento mitochondrial Ctyb.

	Cytb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	*Rhodnius marabaensis* **n. sp.**																
2	*R. robustus* III	0,0															
3	*R. robustus* III	0,3	0,3														
4	*R. robustus* IV	1,9	1,9	2,2													
5	*R. robustus* II	4,5	4,5	4,2	4,2												
6	*R. montenegrensis* CTA 088	4,2	4,2	3,9	3,4	1,4											
7	*R. prolixus*	6,3	6,3	6,6	7,2	8,8	7,8										
8	*R. robustus* I	7,5	7,5	7,2	8,5	8,2	7,8	3,9									
9	*R. neglectus*	8,2	8,2	8,5	8,5	9,5	9,2	6,9	7,6								
10	*R. barretti*	10,7	10,7	11,1	10,4	10,4	10,7	12,7	14,5	15,3							
11	*R. brethesi*	19,1	19,1	19,1	17,3	19,1	19,1	18,4	19,2	18,4	18,4						
12	*R. pictipes*	19,7	19,7	20,1	18,6	19,7	20,5	19,8	20,9	19,8	19,4	13,0					
13	*R. pallescens*	20,0	20,0	19,6	19,2	19,2	19,6	21,9	22,6	17,4	21,3	16,5	16,0				
14	*R. ecuadoriensis*	22,0	22,0	22,4	21,2	22,4	22,0	20,9	23,2	20,9	22,0	17,6	18,9	14,0			
15	*R. stali*	22,2	22,2	21,8	19,5	20,2	20,2	20,7	20,3	20,7	20,6	4,2	12,3	18,0	20,2		
16	*T. infestans*	22,1	22,1	22,5	21,7	22,5	23,7	21,0	22,1	21,8	21,8	19,2	18,8	25,2	24,0	19,5	
17	*P. megistus*	23,2	23,2	23,5	21,6	24,3	23,5	25,0	27,1	25,5	24,8	21,7	22,0	26,0	23,1	23,2	16,4

DISCUSSÃO

Os três principais gêneros de Triatominae em termos epidemiológicos por contarem com as principais espécies envolvidas na transmissão de *T. cruzi* são *Panstrongylus, Rhodnius* e *Triatoma.* A distinção desses três gêneros não traz dificuldades, pois a caracterização pode ser feita mesmo macroscopicamente pelo formato da cabeça e posição do tubérculo antenífero conforme descrito por Pinto (1931). Porém a distinção das espécies de *Rhodnius* exige exame mais detalhado por meio de microscopia óptica. A dificuldade para identificação das espécies de *Rhodnius* foi observada primeiramente por Neiva & Pinto 1923, quando então eram conhecidas cinco espécies (*R. nasutus*, *R. prolixus*, *R. pictipes*, *R. brethesi* e *R. domesticus*) (Lent & Wygodzinsky, 1979). Com a descrição de *R. marabaensis* n. sp., contam-se atualmente 20 espécies, portanto a distinção específica tornou-se

ainda mais difícil, o que exige maior número de caracteres a serem observados. A partir dessa constatação discute-se a caracterização de *R. marabaensis* n. sp. comparativamente com *R. prolixus* e *R. robustus*, com as quais apresenta caracteres comuns e também pelas três espécies ocorrerem na região Norte do Brasil.

Rhodnius marabaensis sp. é predominantemente amarelo, enquanto *R. prolixus* é preto e *R. robustus* é marrom. As pernas das três espécies são também consistentes nestes esquemas de cores (Figs. 2, 3 e 4). Outra característica muito clara de *R. marabaensis* sp. nov. é que é maior do que *R. prolixus* and *R. robustus* (Figs. 5,6 and 7, Tabela I) .

A cabeça de *R. marabaensis* sp. tem cinco características muito claras que ajudam a diferenciá-lo dos demais:

1) A cabeça é mais longa do que a de *R. prolixus* e de *R. robustus* (Figs. 5, Tabela 1);

2) Possui uma porção dorsal longitudinal em forma de quilha (ápice) iniciando a partir do clípeo para o ocelo. Como mostrado na (Fig. 5), esta característica não é acentuada em *R. prolixus* ou *R. robustus*;

3) Possui um anteclipeo semicircular. Em *R. prolixus* e *R. robustus*, o anteclipeo é plano (Fig. 5);

4) Possui um clípeo indistinguível. Em *R. prolixus*, é estreito na porção anterior e amplo na porção posterior. Em *R. robustus* é amplo na porção anterior, estreito na parte medial, e amplo na porção posterior.

5) O segundo segmento da antena é significativamente maior do que os outros três, com a seguinte proporção de comprimento entre os quatro segmentos da antena: 2> 3> 4> 1. Esse padrão de comprimento relativo dos quatro segmentos antenais é o mesmo observado por Rosa et al. (2010) em *R. neglectus* e *R. prolixus* adultos. No entanto, as diferenças de tamanho entre os maiores e os menores segmentos são distintas: o segundo segmento da antena de *R. marabaensis* sp. nov. é 10,3 vezes maior do que o primeiro; em *R. prolixus*, é 6,2 vezes maior (Rosa et al. 2010), e em *R. robustus*, é 8,3 vezes maior (Tabela I).

Para a descrição de *R. marabaensis* sp. cinco características do tórax permitem a sua distinção:

1) O escutelo é maior e inclui duas carenas laterais internas proeminentes. Por conseguinte, é distinto de *R. prolixus* e *R. robustus*, que apresentam menor escutelo e que não apresentam carenas pronunciadas (Fig. 6);

2) O primeiro urotergito tem um sulco transverso pronunciado e franja inferior composta por filamentos longos e retos. Em *R. prolixus*, o sulco transverso não aparece e a franja possui filamentos curtos e irregulares. Enquanto isso, em *R. robustus*, o sulco transverso não é acentuado, e a franja possui filamentos curtos e retos, (Fig. 7);

3) Possui sulco estridulatório longo e mais claramente formado em relação ao de *R. prolixus* e *R. robustus* (Fig. 7). Essa diferenciação específica entre essas três espécies de *Rhodnius* contribui para as observações feitas por (Lent & Wygodzinsky 1979), pois verificaram que o sulco estridulatório em seis espécies de diferentes gêneros apresentaram características que permitiram a identificação específica;

4) As carenas transversais, que fazem divisa com o mesosterno e metasterno diferem entre as três espécies. Em *R. marabaensis* sp., elas são elevadas e proeminentes, e possuem curvatura convexa na porção central. Em *R. prolixus*, elas são menos elevadas e salientes, e em *R. robustus*, elas são interrompidas na porção central (Fig. 8);

5) O metasterno é ligeiramente retangular em *R. marabaensis* sp. nov. enquanto em *R. prolixus* e *R. robustus*, é ligeiramente triangular (Fig. 8).

Do ponto de vista da superfície ventral, o abdômen de *R. marabaensis* sp. é diferente devido à sua coloração amarela; essa área é marrom em *R. prolixus* e preta em *R. robustus* (Fig. 13). Os conjuntos de pontos marrons escuros não aparecem em *R. prolixus* e *R. robustus*. O conexivo ventral também é um caráter distintivo entre as três espécies, uma vez que as manchas pretas são menores e a do sexto segmento muito menor em *R. marabaensis* n. sp.

Quando os órgãos genitais masculinos foram examinados a partir da superfície dorsal, o vértice do endosoma de *R. marabaensis* sp. foi definido como longo e reto; em *R. prolixus*, o ápice é longo e convexo, e em *R. robustus* é curto, largo e convexo (Lent & Jurberg, 1969) (Fig. 9). As analises também revelaram que as duas porções finais da peça basal estão viradas para o lado em *R. marabaensis* sp. nov.**,** enquanto em *R. robustus*, estão voltadas para região posterior. A partir da superfície ventral, o falosoma de *R. marabaensis* sp. nov. é arredondado, enquanto em *R. prolixus*, a porção anterior é convexa e em *R. robustus* é quadrado (Fig. 9). O pigóforo de *R. marabaensis* sp. nov., *R. prolixus*, e *R. robustus* são todos em forma de triângulo isosceles. No entanto, os lados dos pigóforos são retos em *R. robustus*

e curvos em *R. prolixus* e *R. marabaensis* . O pigóforo de *R. marabaensis* sp. é maior e a ponta é mais grossa e circular (Fig. 10).

A genitalia feminina externa também foi considerada. A partir da superfície dorsal, *R. marabaensis* sp. nov. e *R. robustus* não apresentaram diferenças; no entanto, o formato do nono segmento da superfície dorsal em *R. prolixus* apresentou características diferentes (Fig. 11). A superfície posterior e superfície ventral do nono e décimo segmento são distintos nas três espécies (Figs. 12). Essas características também são distintas de outras 12 espécies de *Rhodnius*, como descrito por (Rosa et al (2014).

Os ovos de *R. marabaensis* sp. possuem colarinho, enquanto aqueles de *R. prolixus* e *R. robustus* não. O diâmetro dos tubos foliculares das células exocoriais em *R. prolixus* são maiores do que aquelas de *R. marabaensis* sp. nov. e *R. robustus*; Contudo, são regulares em *R. marabaensis* sp. nov. e variados em *R. robustus* (Fig. 14, 15 and Tabela II).

A análise filogenética gera dados que auxiliam estudos sobre as relações filogenéticas e taxonomia de triatomíneos (Abad-Franch and Monteiro 2005, Gardim et al. 2013, Justi et al. 2014). A variação genética muito baixa observada entre *R. marabaensis* sp. nov. e *R. robustus* III (0.3%), indicam que esses haplotipos podem ser um único status taxonômico. Ambos apresentam distância genética entre 1,9% e 2,2% em comparação com *R. robustus* IV, essa variação é maior do que a observada entre as diferentes espécies *R. robustus* II and *R. montenegrensis* (1.4%) (Tabela IV). A partir desta nova descrição, os haplótipos classificados como *R. robustus* III poderiam ser avaliados com base nas variações morfológicas aqui

mostradas e, se necessário reconsiderar a sua taxonomia, como sugerido para os haplótipos de *R. robustus* I por Monteiro et al. (2003). Assim, a abordagem molecular apoia a evidência morfológica e morfométrica de *R. marabaensis* sp. como um novo status taxonômico, intimamente relacionada com *R. robustus,* e assim também inserido no complexo *R. prolixus* (Carcavallo et al. 2000).

CONCLUSÃO

Os dados obtidos demonstram que o uso da morfologia como base para a descrição das espécies de *Rhodnius* oferece informação fenotípica (morfológica e morfométrica) para definir o *status* de espécies. Embora dados moleculares, especialmente com base em um fragmento de gene único, devam ser vistos como uma abordagem complementar para suportar os resultados morfológicos (Schlick-Steiner et al., 2010).

REFERÊNCIAS

Abad-Franch F, Monteiro FA (2005). Molecular research and the control of Chagas disease vectors. An Acad Bras Cienc. 77(3):437-454.

Abad-Franch F, Monteiro FA (2007). Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. Mem Inst Oswaldo Cruz 102(1):57-70.

Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo O, Palomeque FS, et al. (2013). *Rhodnius barreti*, A new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from western Amazônia. Mem Inst Oswaldo Cruz 108 (1): 92-99.

Abad-Franch F, Monteiro FA (2009). Molecular research and the control of Chagas disease vectors. An Acad Bras Cienc. 77:437-454.

Almeida CE, Pacheco RS, Haag K, Dupas S, Dotson EM, Costa J (2008). Inferring from the Cytb Gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Genetic Structure and Domiciliary Infestation in the State of Paraíba, Brazil. Am J Trop Med Hyg. 78(5):791– 802.

Almeida FB, Santos EI, Sposina G (1973). Triatomíneos da Amazônia. Acta Amazônica, 3:43-46.

Araújo CA, Waniek PJ, Jansen AM (2009). An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 9(3):227-34.

Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa, J (2008). Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. Imperial Novo Milênio, Rio de Janeiro, 64p.

Barata JMS (1981). Aspectos morfológicos de Ovos e Triatominae II – Características macroscópicas e Exocoriais de dez espécies de gênero *rhodnius* Stal, 1859 (Hemíptera – Reduviidae). Rev Saúde Pública 15:490-592.

Barata JMS (1998). Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs/ estruturas macroscopicas e exocoriais de ovos de triatominae. Vol II, pp. 409 - 448. In Atlas of chagas nas américas (RU Carcavalho, I Galíndez Girón, J Juberg e H, Lent eds.) Editora Fio Cruz. Rio de Janeiro.

Barber HG (1932). A new species of *Rhodnius* from Panama (Hemiptera: Reduviidae). Journal of the Washington Academy of Scince 22:514-517.

Bargues MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S (2000). Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 95(4):567-573.

Brasil. Ministério da Saúde. Brasilia (2014). Descrição da Doença de Chagas. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/leia-maisoministerio/646-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doenca-de-chagas/l2doenca-dechagas/11113 descricao-da-doenca-de-chagas>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

Carcavallo RU, Sherlock IA, Gálindez – Girón I, et al. (1999). Geographical distribution and altilatitudinal dispersion/dispersão geográfica e disperção altilatitudinal. Vol. III p. 747-890. In Atlas of Chagas disease vectors in the américas/ Atlas dos vetores da doença de chagas nas américas (R U Carcavalho, I Galindez Girón, Juberg e H Lent eds.) Editora FIOCRUZ. Rio de Janeiro.

Carcavallo RU, Canale DM, Martínez A (1988). Habitats de triatominos argentinos y zonas ecológicas donde prevalecen. Chagas 5(1): 8-17.

Carcavallo RU, Jurberg J (2000). *T. baratai* sp. n. do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Entomol Vect. 7: 373-387.

Carcavallo RU, Rocha IDS, Galíndez Girón I, Sherlock, Galvão C, Martinez RJA, Tonn and Cortón E (1998a). Feeding sources and patterns; p. 537-560 In R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J, Jurberg and H. Lent. (ed.) Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas. Volume II. Rio de Janeiro: Fiocruz.

Carcavallo RU, Rodríguez MR, Salvatella SI, Curto de Casas I, Sherlock and Galvão C (1998b). Habitats and related fauna; p. 561-619 In R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg and H. Lent (ed.). Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas, Volume II. Rio de Janeiro: Fiocruz.

Costa J, Freitas-Sibajev MGR, Marchon-Silva V, Pires MQ, Pacheco RS (1997). Isoenzymes detect variation in populations of Triatoma brasiliensis (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 92(4):459- 464.

Costa J, Jurberg J, Barth MO (1991). Estudos morfológicos de *Cavernicola* Lenti Barrett e Arias, 1985 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 86 *(2)*: 247-263.

Coura JR, Dias JC (2009). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 104(1):31-40.

Coura JR, Viñas PA (2010). Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Nature 465(7301):S6-7.

Dujardin JP, Steindel M, Chavez T, Machane M, Schofield CJ (1999). Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. Mem Inst Oswaldo Cruz 94: 565-569.

Ferreira ILM, Silva TPT (2006). Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo Triatoma infestans no Brasil: um fato histórico. Rev Soc Bras Med Trop. [online] 39(5):507-509.

Foratinni OP (1980). Biogeographya, origin, and distribuition of triatominae domiciliarity in Brazil. Rev Saúde Pública 14:3.

Forero D, Weirauch C, Baena M (2004). Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus Torrealbaia (Triatominae) with Amphibolus (Harpactorinae), with notes on Amphibolus venator (Klug, 1830). Zootaxa, 670:1-12.

Fraiha Neto H, Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN (1995). Doença de Chagas - Endêmica na Amazônia? An Acad Med Pará 6:53-57.

Galvão C (2014). Vetores da Doença de Chagas no Brasil, On line Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 210-235.

Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Juberg JA (2003). Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel,(Hemiptera, Reduviidae) and their geografical distribuition, with nomenclatural and taxonomic note. Zootaxa, 202: 1-36.

Galvão C (2003). A Sitemática dos Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), DE Geer ao DNA. Entomol Vect. 10 (4): 511-530.

Gardim S, Rocha CS, Almeida CE, Takiya DM, Silva MTA, Ambrósio DL, Cicarelli RMB, Rosa JA (2013). Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic triatoma in Central-Western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 89(4): 766-774.

Hypsa V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego RO, Galvão C, Jurberg J (2002). Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. Mol Phylogenet Evol. 23(3):447-457.

Juberg J, Galvão C (2006). Biology, Ecology and Systematics of Triatominae (Heteroptera – Reduviidae) vectors of chagas disease and implications for human heath. Denisia 19:1096 - 1116.

Juberg J, Rocha DS, Galvão C (2009). *Rhodnius zeledoni* sp. Nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton e Milles, (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). Biota Neotrop. 9:123-128.

Juberg J (1995). Uma abordagem filogenética entre os triatomíneos baseada nas estruturas fálicas (Hemíptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 90(1):59. 1995.

Juberg J (2003). Ferramentas Usadas em Taxonomia de Triatomíneos o uso Múltiplo. Entomol Vect. 10(4):497-509.

Jurberg J, Lent H, Galvão C (1997). Male genitalia and its importance in taxonomy. In: Carcavallo, R. U.; Galíndez-Girón, I.; Jurberg, J.; Lent, H. (eds.). Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, Fiocruz, Rio de Janeiro, 1:85-106.

Jurberg J, Rocha DS, Lorosa ES, Vinhães M, Lent H (1998). Uma nova espécie de Triatoma do Estado do rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Entomol Vect. 5:295-310.

Junqueira AC, Degrave W, Brandao A (2005). Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. Trends Parasitol. 21(6):270-2.

Justi SA, Russo CAM, Mallet JRS, Obara MT, Galvão C (2014). Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Parasit Vectors 7: 149.

Laroouse F (1927) Etude biologique et systémaque du genre *Rhodnius Stal* (Hemiptera, Reduviidae). Ann Parasit hum comp. 5, 6-88.

Lent H, (1954) Comentários sobre o genêro *Rhodnius Stal* com descrição de uma nova espécie do Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Rev Brasil Biol. 14, 237-247.

Lent H, Juberg J (1969). O gênero *Rhodnius Stål*, 1859 com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol. 29: 487- 560.

Lent H, León LA (1958) Um novo *Rhodnius Stal* do Ecuador (Hemiptera, Reduviidae) Rev Brasil Biol. 18, 181-185.

Lent H, Wygodzysnky P (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera – Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Amer Mus Nat Hist 163: 123-520.

Lent, H., Jurberg, J. & Galvão, C (1993). *Rhodnius stali* sp. n., afim de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 88, 605-614.

Lent H, Jurberg J (1967). Algumas informações sobre Triatoma spinolai Porter, 1934, com um estudo sobre as genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae). Rev Brasil Biol. 27:273-288.

Lent H, Jurberg J (1968). Estudo morfológico comparativo de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e suas genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol. 28:499-520.

Lent H, Jurberg J (1975). O gênero Panstrongylus Berg, 1879, com um estudo sobre a genitália externa das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol. 35:379-438.

Lent H, Jurberg J (1969). O gênero Rhodnius Stål, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol. 29:487-560.

Martínez FH, Villalobos GC, Cevallos AM, Torre PDEL, Laclette JP, Alejandre-Aguilar R, Espinoza B (2006). Taxonomic study of the phyllosoma complex and other triatomíneo (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mt Cytb sequences. Mol Phylogenet Evol. 41:279–287.

Matta A (1919) Um novo Reduvido do Amazonas, *Rhodnius brethesi* n. sp. Amazonas Médico, 2:93-94.

Meija JM, Galvão C, Juberg J (1999). *Rhodnius colombiensis* sp. n. da Colômbia, com quatros comparativos entre estruturas fálicas do gênero *Rhodnius Stal*, 1859 (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). Entomol Vect. 6(6): 601-617.

Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB (2003). Molecular Phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixu*s and *Rhodnius robustus*. Mol Ecol. 12: 1997-1006.

Monteiro FA, Escalante AA, Beard CB (2001). Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. Trends Parasitol, 17:344–347.

Neiva A, Pinto C (1923). Estado actual dos conhecimentos sobre o gênero *Rhodnius Stal*, com a descrição de uma nova espécie. Brasil-Médico 37: 20–24.

Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F (2000). Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. Trans R Soc Trop Med Hyg. 94(1):23-7, 2000.

Noireau F, Diosque P, Jansen AM (2009). Trypanosoma cruzi: adaptation to its vectors and its hosts. Vet Res. 40(2):26.

Organización Panamericana De La Salud. AMCHA: Iniciativa de los países amazónicos para la prevención y Control de la Enfermedad de Chagas.: Organización Panamericana de la Salud. Washington DC, 2004.

Pinto C (1931). Valor do rostro e antenas na caracterização dos gêneros de triatomideos. (Hemiptera, Reduviidae). Boletim biológico de São Paulo 19: 45-136.

Pinto AYN, Valente SAS, Valente VC, Ferreira Junior AG, Coura JR (2008). Aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. Rev Soc Bras Med Trop. 1:102-614.

Rojas A, Vinhães M, Rodríguez M, Monroy J, Persaud N, Aznar C, Náquira C, Hiwat H, Benítez J (2005). Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia: implementação da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da doença de Chagas na Amazônia. Rev Soc Bras Med Trop. [online]. 38(1):82-89.

Rosa JA, Mendonça VJ, Gardim S, Carvalho DB, Oliveira J, Nascimento JD, Pinotti H, Pinto MC, Cilense M, Galvão C, Barata JMS (2014) Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. Parasit Vectores 7-17.

Rosa JÁ, Rocha CS, Gardim S, Pinto MC, Mendonça VJ, Ferreira-Filho JCR, Carvalho EOC, Camargo LMA, Oliveira J, Nascimento JD, Cilense M, Almeida CE (2012). Description of *Rhodnius montenegresis* sp. nov. (Hemipetera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. Zootaxa. 3478: 62-76.

Rosa JA, Mendonça VJ, Rocha CS, Gardim S, Cilense M (2010). Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidade) by scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz 105: 286–292.

Rosa, J A, Barata JMS, Santos JLF e Cilense M (2000). Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Saúde Pública, 34 (5): 538-542,

Rosa JA, Barata JMS, Cilence M, Belda Neto FM (1999). Head morfology of 1st and 5th instar nymphs of Triatoma circummaculata and Triatoma rubrovaria (Hemiptera, Rediviidae). Int J Insect Morphol Embryol. 28:363-375.

Rosa JA, Barata JMS, Barelli N, Santos JLF, Belda-Neto FM (1992). Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 87:257-264.

Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Vol I, 3.ed.

Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH (2010). Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. Annu Rev Entomol. 55: 421–38.

Serra OP, Serra RG, Atzigen NCBV (1980). Nova espécie do gênero *Rhodnius* da Amazonia, Estado do Pará, Brasil. Anais do V Congresso Brasileiro de Parasitologia, Rio de Janeiro, p.120.

Sherlock IA, Guitton N, Miles M (1977). *Rhodnius paraensis* especie nova do estado do Pará, Brasil (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae) Acta Amazônica, 7:71-74.

Schmunis GA, Yadon ZE (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 115:14–21.

Stal C (1872) Enumeratio hemipterorum Pars 2. Kongl Svenska Vet Akad Handl. 10:1-159.

Stal C. (1859) Monografie der Gattung Conorhinus und Verwandten. Berlin Entomol Z. 3:99-117:

Tartarotti E, Ceron CR (2005). Ribosomal DNA ITS-1 Intergenic Spacer Polymorphism in Triatomines (Triatominae, Heteroptera). Biochem Genet. 43(7/8):365-373.

Valente Sas, Valente Vc, Fraiha Neto, H (1999). Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz 94:395-398.

Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN, César MJB, Santos MP, Miranda COS, Cuervo P, Fernandes O (2009). Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. Trans R Soc Trop Med Hyg. 103:291-297.

Valente VC, Valente S, Carcavallo RU, Rocha DS, Galvão CE, Juberg J (2001), Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius Stal*, do estado do Pará, Brasil (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). Entomol Vect. 8(1):65-80.

Villela MM, Souza JMB, Melo VP, Dias JCP (2007). Vigilância epidemiológica da doença de Chagas em programa descentralizado: avaliação de conhecimentos e práticas de agentes municipais em Região endêmica de Minas Gerais, Brasil (Chagas disease epidemiological surveillance in a decentralized program: evaluation of practice and knowledge among municipal health agents in an endemic region of Minas Gerais State, Brazil). Cadernos de Saúde Pública, 23:2428-2438.

World Heath Organization (2013). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em: 05 de janeiro de 2015.

World Heath Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 10 de janeiro de 2015.

CAPÍTULO II - ARTIGOS

Description of *Rhodinius marabaensis* sp. nov. (Hemiptera: Reduviidade: Triatominae) from the Brazilian state of Pará.

Eder dos Santos Souza[1], Noé Von Barbosa Atzingen[2], Maria Bethânia Furtado[2], Jader de Oliveira[1], Juliana Nascimento Damieli[3], Daniel Pagotto Vendrami[4], Sueli Gardim[5] and João Aristeu da Rosa[1].

1 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

2 Fundação Casa da Cultura de Marabá – PA, Brasil

3 Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil

4 Faculdade Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), SP, Brasil

5 Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Araraquara, SP, Brasil

The species Rhodnius marabaensis sp. nov. *is described. It was collected in May 2014 in the Murumurú Environmental Reserve in the municipality of Marabá, Pará state, Brazil. The morphological characteristics of the head, thorax, abdomen, and eggs have been determined. The morphological descriptions of 19 previously described* Rhodnius *species were consulted; however,* R. prolixus *and* R. robustus*, which also occur in the northern region of Brazil, were examined in more detail. The exam included specimens from 18* Rhodnius *species held in the Brazilian National and International Triatomine Taxonomy Reference Laboratory at the Oswaldo Cruz Institute in Rio de Janeiro, Brazil. The most notable morphological features that distinguish* R. marabaensis *sp. nov. are the keel-shaped apex of the head, the length of the second segment of the antennae, the shapes of the prosternum, the*

mesosternum, and the metasternum, the set of spots on the abdomen, the male genitalia, the posterior and ventral surfaces of the external female genitalia, and the morphological characteristics of the eggs. A phylogenetic analysis revealed that this species' cyt-b gene fragment differed from the other seven Rhodnius *species that were evaluated.* Rhodnius jacundaensis *Serra, Serra & Von Atzingen, 1980 [nomen nudum] specimens deposited in the Marabá Cultural Center were examined and were found to be synonymous with* R. marabaensis *sp. nov.*

Key Words: Triatominae, Rhodnius marabaensis sp. nov., Amazônia, morphology, Cyt b.

Vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, are represented by 150 species distributed into 18 genera and classified as part of the Triatominae subfamily (Galvão, 2014). *Rhodnius* is one of these 18 genera and includes 19 species, seven of which were described after the publication of the Lent and Wygodzinsky review in 1979. These seven species are *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão 1993; *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg 1999; *R. milesi* Valente et al. 2001; *R. amazonicus* (Almeida, Santos & Sposina, 1973; *R. zeledoni* Jurberg, Rocha & Galvão 2009; *R. montenegrensis* Rosa et al. 2012; and *R. barretti* Abad-Franch et al. 2013.

Among the 19 *Rhodnius* species described thus far, nine are found in the northern region of Brazil: *R. amazonicus, R. barretti, R. brethesi, R. milesi, R. montenegrensis, R. paraensis, R. pictipes, R. prolixus,* and *R. robustus*. This article describes the tenth species found in this region of Brazil and the twentieth member of the genus *Rhodnius*. This new species was mentioned and published in the form of an abstract presented at the Fourth Annual Brazilian Parasitology Conference in Rio de Janeiro in 1980. According to Article 9 of the International Code of Zoological

Nomenclature, however, this new species was not confirmed. As a result, Carcavallo et al. (1998) and Galvão et al. (2003) considered it to be *Rhodnius jacundaensis* Serra, Serra & Von Atzingen, 1980 [*nomen nudum*].

In May 2014, two *Rhodnius* spp specimens were collected in Marabá, Pará State in Brazil and compared to the key described by Lent & Wygodzinsky, as well as to previously described species. Its identification was not possible. Samples that had been identified as *R. jacundaensis* and deposited at the Marabá Cultural Center in Pará were determined to be same species.

Therefore, the objective of this publication is to describe this new species. *Rhodnius marabaensis* sp. nov. was described after comparisons to *R. prolixus and R. robustus*, since it presented some similar morphological characteristics and because all three species occur in the northern region of Brazil (Galvão, 2014). The specific description was guided by the observation of the two specimens collected in May 2014, as well as by the 14 males and 14 females deposited at the Marabá Cultural Center. In these examinations, the morphological and morphometric features of the head, thorax, abdomen, and eggs were considered, and the molecular characterization was performed using the cytochrome b (Cyt b) fragment.

MATERIALS AND METHODS

Triatomines - The specific description of *R. marabaensis* sp. nov. considered one female and one male that was collected from a residence in the Murumurú Environmental Reserve in the municipality of Marabá, Pará state, Brazil (coordinates: S: 10° 10´ 05.1” and W: 63° 24’ 09.1”) (Fig. 1). In addition, 14 males and 14 females deposited in the Marabá Cultural Center in Pará were considered.

For the comparative morphological study, *R. prolixus* specimens from the Araraquara Triatominae Colony (CTA) 074 were used, as were *R. robustus* specimens from CTA 085. The specimens were kept in these colonies at the Triatominae Insectarium at the School of Pharmaceutical Sciences of São Paulo State University, Araraquara (UNESP) in São Paulo, Brazil. The *R. prolixus* colony had been originally collected in a sylvatic environment in Venezuela on May 23, 1983. The *R. robustus* colony has been maintained since February 1972 using specimens from Peru.

The comparative study was based on *R. marabaensis* sp. *R. prolixus*, and *R. robustus*, as well as on nine other species. It was performed using the dichotomous key by Lent & Wygodzinsky (1979). The study also considered descriptions of *R. dalessandroi* Carcavallo & Barreto, 1976; *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1999, *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999, *R. milesi* Valente et al. 2001, *R. zeledoni* Jurberg, Rocha & Galvão, 2009, *R. montenegrensis* Rosa et al. 2012, and *R. barretti* Abad-Franch et al. 2013. *R. marabaensis* sp. specimens, were also compared to specimens from 18 *Rhodnius* specimens held at the Brazilian National and International Triatomine Taxonomy Reference Laboratory at the Oswaldo Cruz Institute in Rio de Janeiro, Brazil. The only species that was not compared was *R. amazonicus*, which is held at the Brazilian National Institute of Amazon Research (INPA).

Morphology and morphometrics - A Leica MZ APO stereoscope and the Motic Images Advanced System version 3.2 were used for the measurements, as well as for the study of *R. marabaensis* sp. male genitalia. For the comparative study on the male genitalia of *R. marabaensis* sp. nov. and *R. prolixus* and *R. robustus*, the descriptions by Lent & Jurberg (1969) and by Rosa et al. (2012) were used.

The following parameters of both males (15) and females (15) were measured: total length (TL); head length (HL); the length of the four antennal segments (A_1, A_2, A_3, and A_4); the three segments of the proboscis (R_1, R_2, and R_3); the inner distance between the eyes (IE); the outer distance between the eyes (OE); the diameter of the eyes (DE); the maximum width of the abdomen (MWA); the maximum width of the thorax (MWT); and the length, width, and diameter of the opercular opening of the eggs (Lent & Wygodzinsky, 1979; Dujardin et al. 1999; Rosa et al. 2000).

The 13 *R. marabaensis* sp. eggs that were measured using optical microscopy and studied using scanning electron microscopy (SEM) were obtained from the uterus of a female that had been collected in May 2014 when the specimen was sectioned for the study of the female genitalia. The head, the ventral portion of the thorax, the scutellum, and the pygophore were also studied using SEM.

Molecular analyses - The extraction of genomic DNA was performed according to the protocol of Sambrook and Russell (2001). For this, three legs of *R. marabaensis* sp. were extracted and processed. The primers used to amplify the mitochondrial gene fragment Cyt b were suggested by Monteiro et al, (2003). For polymerase chain reactions (PCR) was used thermal cycler Gene Amp® PCR System 9700 – Applied Biosystems TM.

The amplified fragments were purified and sequenced in duplicate (forward and reverse). The consensus sequence was obtained using the BioEdit software. Homologous sequences available in GenBank were aligned and used for phylogenetic analysis. The dendrogram was reconstructed based on Maximum Likelihood algorithm available on the MEGA 6.0 software, considering the alignment of 663 base pairs (bp) of fragment Cyt b of 17 haplotypes (15 obtained from *GenBank* database). The support of the clades was estimated by using 1000

bootstrap replicates with *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans* as outgroups (Table III). The p distance was measured using the MEGA 6.0 software (Table IV).

RESULTS

R. marabaensis sp. Souza, Atzingen, Furtado, Oliveira, Damieli, Vendrami, Gardim and Rosa 2015 (Fig. 2).

Description: Total male length 20.41±(0.01)mm; total female length 22.35± (0.02)mm; male pronotum width 4.25±(0.01); female pronotum width 4.88±(0.02); male abdomen width 6.22±(0.01)mm; female abdomen width 6.92±(0.02)mm (Table I).

Head: The head is black except for the apex (central longitudinal dorsal portion), which is elevated, straw yellow, and keel shaped. This keel-shaped section presents the same shape from the beginning of the clypeus until the posterior portion of the ocelli; thus, the border of the clypeus is visible around/from the genas and the jugum (1+1), which are located laterally. However, the genas begin anterior to the beginning of the clypeus. Thus, the genas go toward the anteclypeus, which are rounded. The species presents crystalline ocelli and eyes with black and yellow ommatidia. The first and second segments of the antennae are yellow, while the posterior two thirds of the third segment are white, and the fourth segment is completely white. The species presents a second antennal segment that is significantly larger than the others (10.3 times larger than the first; 1.65 times larger than the third, and 4.3 times larger than the fourth) (Table I).

Thorax: At the juncture between the neck and the thorax, there is a ring that is anteriorly black and posteriorly yellow; the anterolateral angles (1+1) are yellow. The dorsal thorax (pronotum) is shaped like a trapezoid and surrounded by a yellow carina. There are two yellow sub-median carinas running lengthwise around the pronotum, from the anterior portion to the posterior portion. The submedian carinas border three anterior lobes, each of which have a set of black spots, and three posterior lobes with two parallel black stripes on each that are connected to the set of black spots on the anterior lobes. The triangular scutellum is marked laterally and is very clear because of its black color. The internal portion is also triangular and yellow, and it is bordered by thick and obvious carinas. When the wings are removed, the posterior portion (tip) of the scutellum covers 2/3 of the first abdominal urotergite (Fig. 6 and 7)

From the ventral surface of the thorax, a prosternum with deep, well-defined stridulatory black sulcus is visible; in the posterior portion, it takes on a funnel shape and ends as a tip between the anterior pair of legs (Fig.7). The mesosternum has two elevated black areas that are separated by a yellow depression. The border between the mesosternum and the metasternum is formed by a set of three elevated and prominent carinas. The two lateral carinas are black, and the central carina is yellow. These three carinas are curved backward. The central carina, which is elevated and prominent, possesses a semi-circular depression in the central portion at the border with the metasternum. The metasternum is slightly rectangular in shape. The central portion is black and outlined by two yellow carinas (Fig. 8).

The legs have an overall yellowish tone. The coxas have yellow and black spots; the trochanters are yellow and do not have spots; the femurs are yellow with

black spots running lengthwise; the tibias are yellow except for the posterior sixth segment, which continues the black pattern of the tarsi (Fig. 2).

Abdomen: The ventral surface of the abdomen is predominantly yellow, with three sets of black stripes: one on the central longitudinal portion and (2+2) on the side portions above the connexivum (Fig. 2). The first abdominal segment has a longitudinal black spot between the two larger yellow spots. The second, third, fourth, and fifth ventral abdominal segments possess (1+1) bow sets of dark brown spots. These spots begin at the anterior dividing line and extend diagonally along the central portion of the segments (Fig. 2). The dorsal connective includes yellow and black spots that cover half of each segment. They are wide in the anterior portion and become thinner in the inner posterior portion. The black spot of the connexivum of the sixth segment is smaller than those of the fifth, fourth, third, and second segments (Fig. 2). The first tergite, which is visible when the wings are removed, is essentially formed by two parts. The anterior portion has a striated cuticula that contrasts with the surrounding smooth cuticula and which is triangular in shape on its upper level. It possesses a clearly defined transverse sulcus. The second portion is posterior to the first and is at a lower level. It is made up of a set of transverse and straight fringes (Fig. 7).

When the male genitalia is seen from the dorsal surface, it is clear that the phallus (P) it is formed by an endosoma (En), by the median extension of the basal plate (EPlb), and by the basal piece itself (Plb). When seen from the ventral surface, the phallus (P) is formed by the conjunctiva (Cj), the phallosoma (ph), the phallosoma process (PrPh), the median extension of the basal piece (EPlb), the gonopore process (PrG), and the basal piece (Plb). When seen from the lateral surface, the phallus is formed by the conjunctiva (Cj), the endosoma (En), the median extension

of the basal piece (EPlb), the basal piece itself (Plb), the phallosoma (Ph), and the phallosoma process (PrPh) (Fig. 10).

The dorsal surface of the external female genitalia was examined using scanning electron microscopy (SEM), which showed that the seventh segment is separated from the eighth segment by a slightly irregular line and forms (1+1) triangular tips at the border between the connective and the eighth segment. The eighth segment is trapezoid shaped. The ninth segment appears as a protrusion. The tenth segment appears as a small curve in the central portion where it delimits with the eighth segment (Fig. 11)

From the posterior surface, (1+1) appendages can be seen on the border between the eighth and ninth segments. The tenth segment is semicircular in shape with a pronounced central slit in the shape of an upside-down V and with (1+1) protrusions at the posterior edge of the gonocoxite 8. Display is also a (1+1) gonocoxite 8 and a (1+1) gonapophysis 8 (Fig. 12).

From the ventral surface, the lateral portions of the line that divides the seventh segment and the gonocoxites 8 and the gonapophysis 8 are curved, and the line then forms small (1+1) ascending curves and a slight depression in the central portion. The ninth segment forms (1+1) lateral flaps at the border with the tenth segment and presents transverse slit at the sub-intermediate position (1+1). The transverse slits then form into two triangles, the tips of which are separated in the central portion. The tenth segment is the outer edge of the external female genitalia and is presented as a narrow curved and convex band (Fig. 13).

Egg: The egg shells measure 1.59mm in length and 0.71mm in width. They present prominent collar and chorial rim (Fig. 14 and Table II). The exochorion cells

are clearly demarcated, with internal granulations organized into a circle. The follicular tubes of each exochorion cell do not differ in diameter (Fig. 15).

Molecular: Phylogenetic reconstruction of the new species *R. marabaensis* sp. obtained by alignment of 16 Cyt b gene fragment sequences, from another ten *Rhodnius* species (*R. barretti, R. brethesi, R. ecuadoriensis, R. montenegrensis, R. neglectus, R. pallescens, R. pictipes, R. prolixus, R. robustus* - haplotypes I, II, III, IV - and *R. stali*) (Table 3). The molecular data based on cyt-b gene fragment indicate that *R. marabaensis* sp. nov. is closely related species of *R. robustus* with bootstrap support of 93%. The four haplotypes of *R. robustus* were dispersed, showing this taxon is paraphyletic: i) *R. robustus* I positioned with *R. prolixus* and *R. neglectus*; ii) *R. robustus* II is near to *R. montenegrensis*; iii) *R. robustus* IV appears near the new species *R. marabaensis* sp. nov. + *R. robustus* III (Fig. 16).

The values of the p distance revealed a genetic variation among *R. marabaensis* sp. and *R. robustus* III up to 0.3%; between 1.9% to 4.5% when comparing the new species with the haplotypes of *R. robustus* IV and II respectively; and 7.2% in comparison with *R. robustus* I. This latter value is higher than comparing *R. marabaensis* sp. with other species such as *R. montenegrensis* (4.2%) and *R. prolixus* (6.3%) and close to *R. neglectus* (8.2%), which indicates that *R. robustus* I haplotype have to be assessed separately (Table IV).

Type-locality - It was collected in May 2014 in the Murumurú Environmental Reserve in the municipality of Marabá, Pará State, Brazil.

Type data and depository – Holotype female: Triatominae Insectarium of the School of Pharmaceutical Sciences, at São Paulo State University – municipality

Araraquara, São Paulo, Brazil; Paratypes: 14 females and 14 males, municipality Marabá, Cultural Center, Pará state, Brazil; Synonymy: *Rhodnius jacundaensis* Serra, Serra & Von Atzingen, 1980 [*nomen nudum*].

Distribution - Murumurú Environmental Reserve in the municipality of Marabá, Pará state, Brazil.

Bionomics – No data.

Etymology - The name *Rhodnius marabaensis* was chosen because this species was found in the municipality of Marabá, in the state of Pará, Brazil.

Discussion

In epidemiological terms (as the species most frequently involved in *T. cruzi* transmission), the three main Triatomine genera are *Panstrongylus, Rhodnius*, and *Triatoma*. Distinguishing among these three genera is not difficult, because they can be characterized macroscopically based on the format of the head and the position of the antenniferous tubercle, as described by Pinto (1931). However, distinguishing among *Rhodnius* species requires a more detailed examination through optical microscopy. The difficulty in identifying *Rhodnius* species was first noted by Neiva & Pinto (1923). At the time, there were five known species: *R. nasutus*, *R. prolixus*, *R. pictipes*, *R. brethesi*, and *R. domesticus* (Lent & Wygodzinsky, 1979). Including this description of *R. marabaensis* sp. nov., there are currently 20 species; therefore, specific distinction is even more difficult and requires that more characteristics be considered. Because of this, the characterization of *R. marabaensis* sp. nov. is discussed comparatively using *R. prolixus* and *R. robustus*. These three species

share common features and are also the three species that occur in the northern region of Brazil.

R. marabaensis sp. is predominantly yellow, while *R. prolixus* is black and *R. robustus* is brown. The legs of the three species are also consistent in these color schemes (Figs. 2, 3 and 4). Another very clear characteristic of *R. marabaensis* sp. is that it is larger than *R. prolixus* and *R. robustus* (Figs. 5, 6 and 7, Table I) .

The head of *R. marabaensis* sp. has five very clear characteristics that help to distinguish it from the others:

1) The head is longer than that of *R. prolixus* and of *R. robustus* (Figs. 5, Table I); 2) It possesses a keel-shaped longitudinal dorsal portion (apex) running from the clypeus to the ocelli. As shown in Fig. 5, this feature is not accentuated in *R. prolixus* or *R. robustus*; 3) It possesses a semi-circular anteclypeus. In *R. prolixus* and *R. robustus*, the anteclypeus is flat (Fig. 5); 4) It possesses an indistinguishable clypeus. In *R. prolixus*, it is narrow in the the anterior portion and wide in the posterior portion. In *R. robustus* it is wide in the anterior portion, narrow in the medial portion, and wide in the posterior portion (Fig. 5); 5) The second segment of the antenna is significantly larger than the other three , with the following length ration among the four antennal segments: 2nd > 3rd > 4th > 1st. This relative length pattern of the four antennal segments is the same as the pattern observed by Rosa et. al. (2010) in *R. neglectus* and *R. prolixus* adults; however, the differences in size between the largest and the smallest segments are distinct: the second antennal segment of *R. marabaensis* sp. is 10.3 times larger than the first; in *R. prolixus*, it is 6.2 times larger (Rosa et al. 2010), and in *R. robustus*, it is 8.3 times larger (Table I).

For the description of *R. marabaensis* sp. five features of the thorax allow for its distinction: 1) The scutellum is larger and includes two prominent internal lateral carinas. It is therefore distinct from *R. prolixus* and *R. robustus*, which present smaller scutellum and which do not present pronounced carinas (Fig. 6); 2) The first urotergite has a pronounced transverse groove and inferior fringe made up of long and straight filaments. In *R. prolixus*, the transverse groove does not appear and the fringe possesses short and irregular filaments. Meanwhile, in *R. robustus*, the transverse groove is not accentuated, and the fringe possesses short and straight filaments, as shown in (Fig. 7); 3) It possesses a longer and more clearly shaped stridulatory sulcus relative to those of *R. prolixus* and *R. robustus* (Fig. 7). This specific differentiation among these three *Rhodnius* species adds to the observations by Lent & Wygodzinsky (1979), who verified that the stridulatory sulcus in six species from different genera presented characteristics that allowed for species identification; 4) The transverse carinas that border the mesosternum and the metasternum differ among the three species. In *R. marabaensis*, they are elevated and prominent, and possess convex curvature in the central portion. In *R. prolixus*, they are less elevated and prominent, and in *R. robustus*, they are interrupted in the central portion (Fig. 8); 5) The metasternum is slightly rectangular in shape in *R. marabaensis* sp. while in *R. prolixus* and *R. robustus*, they are slightly triangular (Fig. 8).

From the view of the ventral surface, the abdomen of *R. marabaensis* sp. is distinct because of its yellow coloring; this area is brown in *R. prolixus* and black in *R. robustus* (Fig. 13). The set of dark brown spots do not appear in *R. prolixus* or *R. robustus* the ventral connective is also distinct among the three species: the black

spots are smaller and, on the sixth segment, much smaller in *R. marabaensis* sp. (Fig. 2).

When the male genitalia was examined from the dorsal surface, the apex of the endosoma of *R. marabaensis* sp. was found to be long and straight; in *R. prolixus*, the apex is long and convex, and in *R. robustus*, it is shorter, wide, and convex (Lent & Jurberg, 1969) (Fig. 9). The analysis also revealed that the two final portions of the basal piece are turned to the side in *R. marabaensis* sp.**,** while in *R. robustus*, they face the posterior region. From the ventral surface, the phallosoma of *R. marabaensis* sp. is rounded, while in *R. prolixus*, the anterior portion is convex and in *R. robustus* is square (Fig. 9). The pygophores of *R. marabaensis* sp., *R. prolixus*, and *R. robustus* are all in the shape of an isosceles triangle. However, the sides of the pygophores are straight in *R. robustus* and curved in *R. prolixus* and *R. marabaensis*. The pygophore of *R. marabaensis* sp. is also larger at the tip, thicker, and circular (Fig. 10).

The external female genitalia were also considered. From the dorsal surface, *R. marabaensis* sp. and *R. robustus* show no differences; however, the format of the ninth segment of the dorsal surface in *R. prolixus* presents different characteristics (Fig. 11). The posterior surface and the ventral surface of the ninth and tenth segments are distinct in the three species (Fig. 12). These characteristics are also distinct from 12 other *Rhodnius* species, as described by Rosa et al. (2014).

R. marabaensis sp. eggs possess chorion rims, while those of *R. prolixus* and *R. robustus* do not. The diameter of the follicular tubes of the exochorion cells in *R. prolixus* are larger than those of *R. marabaensis* sp. and *R. robustus*; however, they

are regular in *R. marabaensis* sp. and varied in *R. robustus* (Figs. 14, 15 and Table II).

Phylogenetic analysis generates data that help studies of phylogenetic relationships and taxonomy of the Triatominae (Abad-Franch and Monteiro 2005, Gardim et al. 2014, Justi et al. 2014). The very low genetic variation observed between *R. marabaensis* sp. and *R. robustus* III (0.3%), indicate that these haplotypes can be a single taxonomic status. Both present genetic distance between 1.9% and 2.2% compared with *R. robustus* IV, these variation is greater than that observed between the distinct species *R. robustus* II and *R. montenegrensis* (1.4%) (Table IV). From this new description, the classified as *R. robustus* III haplotypes could be evaluated based on morphological variations here shown and if necessary reconsider their taxonomy, as suggested to the haplotypes of *R. robustus* I by Monteiro et al. (2003). Thus, the molecular approach supports the morphologic and morphometric evidence *R. marabaensis* sp. As a new taxonomic status, closely related to *R. robustus* and thus also inserted in the *R. prolixus* complex (Carcavallo et al. 2000)

Data obtained corroborate that the use of morphology as a basis for the description of species of Triatominae offers phenotypic information (morphological and morphometric) to define the status of species. Although, molecular data, especially based on a single gene fragment, should be seen as a complementary approach to support the morphological results (Schlick-Steiner et al. 2010).

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. Oswaldo Pinto Serra and Raquel G. Serra (in memoriam) who briefly described R. jacundaensis [nomen nudum] in 1980. We also wish to thank Nelson Papavero (Museu de Zoologia/USP) and Cleber Galvão (FIOCRUZ) for suggesting the scientific name of the new species. We are grateful to José Jurberg (FIOCRUZ), who allowed us to observe the Herman Lent and Rodolfo Carcavallo collection at the Instituto Oswaldo Cruz. We thank Marcelo Ornaghi Orlandi, Mario Cilense, Juan Carlos Guerrero Barreto, and Sebastião Dameto (IQ/UNESP) for their help with the electronic microscope, as well as Danila Blanco de Carvalho, Aline Ribeiro Rimoldi, and Felipe Fatobene (FCF/UNESP) for their collaboration. Special thanks are given to Marcos Takashi Obara (UnB) and to Mara Cristina Pinto (FCF/UNESP/ for their suggestions, and finally, to Davi Antonio da Rosa for the photos and drawings.

Financial Support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant process number 23038-005285/2011-2012; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (PADC); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq).

REFERENCES

Abad-Franch F, Monteiro FA (2005). Molecular research and the control of Chagas disease vectors. An Acad Bras Cienc. *77* (3): 437-454.

Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo O, Palomeque FS, et al. (2013). *Rhodnius barreti*, A new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from western Amazônia. Mem Inst Oswaldo Cruz *108* (1): 92-99.

Almeida FB, Santos EI, Sposina G (1973). Triatomíneos da Amazonia III. *Acta Amazônica 3*: 43-66.

Carcavallo RU, Galvão C, Lent H (1998). *Triatoma jurbergi* sp.n. do Norte do Estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) com uma atualização das sinonímias e outros táxons. Mem Inst Oswaldo Cruz *93*: 459-464.

Carcavallo RU, Jurberg J (2000). *T. baratai* sp. n. do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Entomol Vect. *7*: 373-387.

Dujardin JP, Steindel M, Chavez T, Machane M, Schofield CJ (1999). Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. Mem Inst Oswaldo Cruz *94* (4): 565-569.

Galvão C, org. Vetores da doença de chagas no Brasil (2014). Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. [1 electronic resource; 289 p.]. Available from: http://books.scielo.org

Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution,with nomenclature and taxonomic notes. Zootaxa *202*: 1-36.

Gardim S, Rocha CS, Almeida CE, Takiya DM, Silva MT, Ambrósio DL, Rosa JA (2013). Evolutionary relationships of the Triatoma matogrossensis subcomplex, the endemic Triatoma in central-western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. Am J Trop Med Hyg. 89 (4), 766-774.

Jurberg J, Rocha DDS, Galvão C (2009). *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Biota Neotrop. 9 (1): 0-0.

Justi SA, Russo CAM, Mallet JRS, Obara MT, et al. (2014). Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Parasit Vectors *7*: 149.

Larrousse F (1927). Etude biologique et systématique du genre *Rhodnius* Stål (Hémiptères, Redu-viidae). Ann Parasit hum Comp. 5: 63-88.

Lent, H. (1954) Comentários sôbre o gênero *Rhodnius* Stål com descrição de uma nova espécie do Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Rev Brasil Biol. *14*: 237-247.

Lent H, Juberg J (1969). O gênero *Rhodnius Stål*, 1859 com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol. *29*: 487- 560.

Lent H, Wygodzinsky P (1979). Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Revisión de los triatominae (Hemiptera, Reduviidae) y su significado como vectores del mal de Chagas. Bull Am Mus Nat Hist. *163*: 123-520.

Monteiro FA, Barret TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors Rhodnius prolixus and *R. robustus*. Mol Ecol. *12*: 997-1006.

Pinto C (1931). Valor do rostro e antenas na caracterização dos gêneros de triatomideos. (Hemiptera, Reduviidae). Boletim biológico de São Paulo *19*: 45-136.

Rosa JA, Barata JMS, Santos JLF, Cilense M (2000) Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae) Egg morphology of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). J Public Health 34, 538–542.

Rosa JA, Mendonça VJ, Gardim S, Carvalho DB, Oliveira J, Nascimento JD, Barata JMS (2014). Study of the external female genitalia of 14 Rhodnius species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. Parasit Vectors *7*: 17.

Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Pinto MC, Mendonça VJ, Ferreira Filho JCR, Almeida CE (2012). Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp.(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. Zootaxa *3478*: 62-76.

Rosa JA, Mendonça VJ, Rocha CS, Gardim, S, Cilense M (2010). Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidade) by scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz *105*: 286–292.

Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Vol I, 3.ed, v.1

Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH (2010) Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. Annu Rev Entomol. *55*: 421–38.

Serra OP, Serra RG, Atzigen NCBV (1980). Nova espécie do gênero *Rhodnius* da Amazonia, Estado do Pará, Brasil. Anais do V Congresso Brasileiro de Parasitologia, Rio de Janeiro, p.120.

Stål, C (1859). Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. Berlin Entomol Z. *3*: 99-117.

Valente VC, Valente SAS, Carcavallo RU, Rocha DS, Galvão C, Jurberg J (2001). Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius Stål*, do estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Entomol Vect. *8* : 65-80.

FIGURE 1. Localization of Marabá- PA where is collected *R. marabaensis* sp. nov. (S: 05º 21' 54" e W: 49º 07' 24").

FIGURE 2. *R. marabaensis* sp. nov. female. A, dorsal side; B, ventral side.

FIGURE 3. *R. prolixus* female. C, dorsal side; D, ventral side.

FIGURE 4*. R. robustus* female. E, dorsal side; F, ventral side.

FIGURE 5. Head by SEM. A: *R. marabaensis* sp. nov.; B: *R.; prolixus*, C: *R.robustus.* V: vertice; C: clypeus; AC: anteclypeus.

FIGURE 6. Escutellum and process of I urotergit by SEM. A: *R. marabaensis* sp. nov.; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*; pr: pronotum; sc: escutelum; sb: semi- circular base; sg: glabrous space; cd: central depression; le: lateral edge; ap: apex of escutelum; pu: process of I urotergit; tg: transverse groove; fr: fringe.

FIGURE 7. Thorax ventral by SEM. SS: Stridulatory sulcus; *R. marabaensis* sp. nov.; B: *R. prolixus*; C: *R.robustus*.

FIGURE 8. Thorax ventral by SEM. ms: mesosternum; mt: metasternum. A: *R. marabaensis* sp. nov.; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*.

FIGURE 9. Falo of *R. marabaenses* n. sp. (A: dorsal side, B: ventral side; C: lateral side) and *R. robustus* (D: dorsal side; E: ventral side; F: lateral side). Cj, Connective; En, endosome; EPlb, median extension of the basal plate; P, I speak; Plb, basal plate; PrG, gonopore process; PrPh, phallosoma process; Ph phallosoma; PrCj, conjunctive process.

FIGURE 10. Median process pygophore by SEM. A: *R. marabaensis* n. sp.; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*. gp: Thick edge: nb: narrow triangular base; sp: tapered tip; wb: large triangular base.

FIGURE 11. Female external genitalia by SEM, dorsal surface. A: *R. marabaensis* n. sp.; B: *R. prolixus*; C*: R. robustus*. VI, VII, VIII, IX, X, tergites.

FIGURE 12. Female external genitalia by SEM, posterior side. A: *R. marabaensis* n. sp .; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*. Ap: Appendices; GC 8: gonocoxite VIII; Gp 8: gonapófise VIII; VII, VIII, IX: tergite; X: Segment.

FIGURE 13. Female external genitalia by SEM, ventral face. A : *R. marabaensis* n. sp .; B: R. prolixus; C: R. robustus. GC 8: gonocoxite VIII; Gc 9: gonocoxite IX; Gp 8: gonapófise VIII; VII, IX: sternites; X: segment.

FIGURE 14. Egg overview by SEM. A: *R. marabaensis* n. sp .; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*. cl: collar; cr: chorionic kidney; eg exochorion; nk: neck; op: operculum.

FIGURE 15. Exochorion detail egg SEM. A: *R. marabaensis* n. sp .; B: *R. prolixus*; C: *R. robustus*; c: exochorion cells; ft: follicular tube; ll: limiting line.

FIGURE 16. Phylogenetic dendogram (NJ) generated by MEGA 6.0 program and based on the alignment of Cytb fragment.

Table I. Mean of measurement (mm) of 15 species of females and males of *R. marabaensis* sp. nov., *R. prolixus* and *R. robustus*.

Table II. Mean of measurement (mm) of 13 eggs of *R. marabaensis* sp. nov., *R. prolixus* and *R. robustus*.

Table III. Species used to compose the alignment of sequences of the fragment of the mitochondrial gene Cytb.

Table IV. Genetic distance (%) from the species used in the phylogenetic construction (distance p) based on the alignment of sequences of mitochondrial fragment Ctyb.

Genetics and Molecular Research

Frist cytogenetic study of *Cavernicola pilosa* Barber, 1937 (Hemiptera, Triatominae).

E.S. Souza[1], K.C.C. Alevi[2], A.R. Ribeiro[1], M.B. Furtado[3], N.C.B.V. Atzingen[3], M.T.V. Azeredo-Oliveira[2] and J.A. Rosa[1]

[1]Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas,
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, SP, Brasil
[2]Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências Biológicas,
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
São José do Rio Preto, SP, Brasil
[3]Fundação Casa da Cultura de Marabá, Marabá, PA, Brasil

Corresponding author: K.C.C. Alevi
E-mail: kaiochaboli@hotmail.com

Genet. Mol. Res. 14 (4): 13889-13893 (2015)
Received May 27, 2015
Accepted August 26, 2015
Published October 29, 2015
DOI http://dx.doi.org/10.4238/2015.October.29.9

ABSTRACT. *Cavernicola pilosa* is a triatomine species that lives in caves and feeds on bat blood. This vector has a wide geographical distribution, and is found in Brazil, Colombia, Panama, Peru, and Venezuela. Little is known about the reproductive biology of this species, because most previous studies have only characterized its morphology, morphometry, ecology, and epidemiology. Therefore, this study aimed to obtain preliminary data related to spermatogenesis in *C. pilosa* by conducting cytogenetic analysis. Analysis of the heterochromatic pattern of *C. pilosa* during the initial prophases revealed that heterochromatic blocks are only present in the sex chromosomes. Based on the analyses of the meiotic metaphase and prophases, we found that the sex determination system of *C. pilosa* is XY and the chromosomes are holocentric. *C. pilosa* spermatids are filamentous and have long flagella. It was not possible to detect corpuscle or filament heteropycnosis in spermatids of this species. The initial cytogenetic data presented in this study are important in characterizing the spermatogenesis and heterochromatic patterns of *C. pilosa*. Our results suggest that adaptation to troglodytism did not result in differences in spermatogenesis in this vector.

Key words: Tribe Cavernicolini; Spermatogenesis; Heterochromatin

 ©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

INTRODUCTION

Triatomines are hematophagous vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi*, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), which is the etiological agent of Chagas disease. The Triatominae subfamily includes 148 species (Rosa et al., 2012; Abad-Franch et al., 2013; Alevi et al., 2013a; Gonçalves et al., 2013; Jurberg et al., 2013; Poinar Jr., 2013) that are distributed in 18 genera and six tribes (Galvão et al., 2003; Tartarotti et al., 2006; Alevi et al., 2013a).

The tribe Cavernicolini Usinger, 1944, is composed of only two species of the genus *Cavernicola* Barber, 1937, namely *Cavernicola lenti* Barrett & Arias, 1985 and *Cavernicola pilosa* Barber, 1937. Both members of the Cavernicolini tribe (as the *Cavernicola* genus) were initially described from *C. pilosa*. Oliveira et al. (2007) redescribed the Cavernicolini tribe as the *Cavernicola* genus based on the morphological and morphometric characteristics of *C. lenti* and *C. pilosa*.

C. pilosa mainly inhabits caves, feeds on bat (*Desmodus rotundus*) blood (Lent and Wygodzinsky, 1979) and disperse passively in bat hair (Oliveira et al., 2008). This vector has a wide geographical distribution, and is found in Brazil (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pará, Paraná, and Tocantins), Colombia (Cundinamarca, Meta, Tolima, and Valle), Panama, Peru (Loreto), and Venezuela (Cojedes, Portuguesa, Táchira, Lara, and Amazonas) (Galvão et al., 2003; Gurguel-Gonçalves et al., 2012).
Little is known about the reproductive biology of this vector, because previous studies have only characterized its morphology and morphometry (Lent and Jurberg, 1969; Oliveira et al., 2007), ecology (Oliveira et al., 2008), and epidemiology (Dias et al., 1942; Baker et al., 1978; Silva et al., 1992). Therefore, this study aimed to obtain preliminary data concerning spermatogenesis in this species.

MATERIAL AND METHODS

Because of the difficulty in collecting and maintaining *C. pilosa* in insectariums, we only used one fifth-instar nymph that was collected in a cave in Marabá, PA, Brazil. This insect was dissected and its seminiferous tubules were placed in methanol:acetic acid (3:1). For slide preparation, each tubule was bathed twice in distilled water for 5 min. The tubules were then placed in a 45% acetic acid solution for 10 min, squashed, stained with lacto-aceto-orcein (De Vaio et al., 1985, with modifications by Alevi et al., 2012), and C-banding (Sumner, 1972). The slides were examined (total increase of 1000X) under a Jenaval light microscope (Zeiss, Jena, Germany), and images were captured using AxioVision LE 4.8 (Zeiss).

RESULTS

Polyploid nuclei were observed during all stages of spermatogenesis (Figure 1A and B). These cells exhibited one heterochromatic (Figure 1A) and one heteropycnotic corpuscle (Figure 1B) By analyzing the meiotic prophases, it was possible to study the sex chromosomes, which were completely heterochromatic (Figure 2A) and heteropycnotic (Figure 2B). The sex determination system is probably XY. In addition, by analyzing the prophase, we discovered that there were no heterochromatic blocks in the autosomes (Figure 2A). Although it was not possible to ascertain the species karyotype by studying metaphase I (Figure 2C and D), we did find that the chromosomes are holocentric. We characterized the spermatids during spermiogenesis, which were completely filamentous with long flagella (Figure 2E).

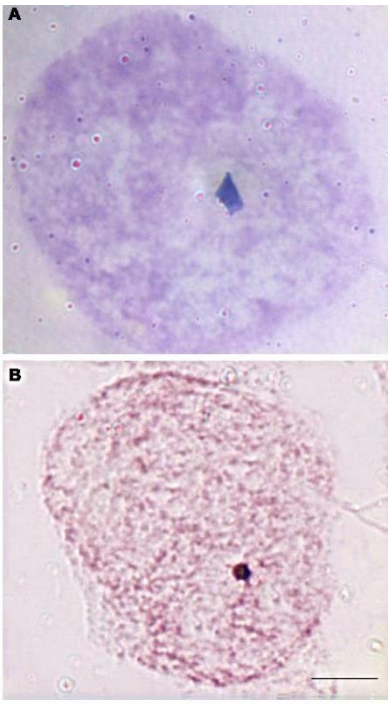

Figure 1. Polyploid nuclei of *Cavernicola pilosa*. Note the presence of a heterochromatic (**A**) and heteropycnotic corpuscle (**B**). Bar, 10 µm.

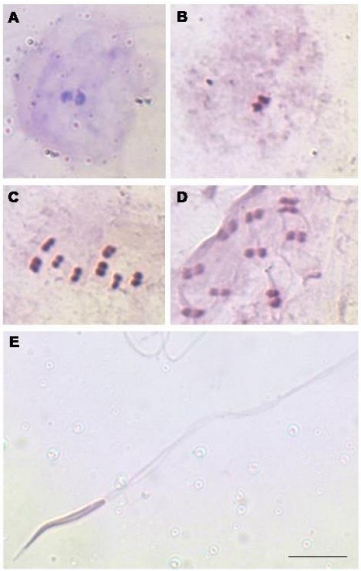

Figure 2. Spermatogenesis in *Cavernicola pilosa*. **A. B.** Initial prophase; the sex chromosomes were heterochromatic (**A**) and heteropycnotic (**B**). **C. D.** Metaphase I; note the holocentric nature of the chromosomes. **E.** Spermatid; note the filamentous form and the presence of a flagellum. Bar, 10 µm.

DISCUSSION

Cytogenetic analyses of the Triatominae subfamily have been conducted for over 100 years (e.g., Payne, 1909), and is of utmost importance to detailed knowledge of cell biology, taxonomy, systematics, and evolution of the triatomines. The cytogenetic characterization of spermatogenesis in *C. pilosa* is important in understanding the reproductive biology and cytogenetics of this vector.

Polyploid nuclei are cells in seminiferous tubule walls that are responsible for cell nutrition during meiotic division. They exhibit high or low transcriptional activity, according to the requirement for reproduction (Alevi et al., 2013b). The absence of heterochromatic blocks in the PN suggests that there is no heterochromatin in *C. pilosa* autosomes, only in its sex chromosomes.

Analyzing the initial prophase to characterize this species is extremely important, because this phase of meiosis has been used as a cytotaxonomic tool for the study of the *Triatoma maculata* (Santos et al., 2007) and *T. brasiliensis* complexes (Alevi et al., 2014). Analyzing the heterochromatic pattern of *C. pilosa* during the initial prophases revealed that heterochromatic blocks are only present in the sex chromosomes.

The commonest sex determination system in the Triatominae is XY. However, there are variations in the fragmentation of X, which results in X_1X_2Y and $X_1X_2X_3Y$ (Ueshima, 1966; Alevi et al., 2013a). The sex determination system in *C. pilosa* is probably XY, based on the meiotic metaphase and prophases.

The holocentric nature of triatomine chromosomes is characterized by the absence of a centromere, i.e., the kinetochore is dispersed throughout the chromosome (Hughes-Schrader and Schrader, 1961). By analyzing the metaphases, it was possible to characterize the chromosomes of *C. pilosa* as holocentric. However, it was not possible to describe the species karyotype.

Analysis of triatomine spermiogenesis has recently been used as a taxonomic tool to differentiate morphologically related species (Alevi et al., 2013c,d, 2014). *C. pilosa* spermatids were completely filamentous with long flagella. It was not possible to detect corpuscle or filament heteropycnosis in this species.

Although further cytogenetic studies should be conducted in *C. pilosa*, these initial cytogenetic data are important in characterizing the spermatogenesis and heterochromatic patterns of *C. pilosa*. Our results suggest that adaptation to troglodytism did not result in differences in spermatogenesis in this vector.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Process #23038.005 and #285/2011-2012).

REFERENCES

Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo N, Palomeque FS, et al. (2013). *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108: 92-99.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2012). Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? *Infect. Gen. Evol.* 12: 1652-1653.

Alevi KCC, Rosa JA and Azeredo-Oliveira MTV (2013a). Mini review: karyotypic survey in Triatominae subfamily (Hemiptera, Heteroptera). *Ent. Orn. Herp.* 2: 106.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013b). Análise das Regiões Organizadoras Nucleolares e da atividade nucleolar em *Triatoma melanocephala* e *T. lenti*, importantes vetores da doença de Chagas. *Rev. Ciênc. Farm. Basica Apl.* 34: 417-21.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Fernandes ALVZ, et al. (2013c). Analysis of spermiogenesis like a tool in the study of the triatomines of the Brasiliensis subcomplex. *C. R. Biol.* 336: 46-50.

Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, et al. (2013d). Heteropyknotic filament in spermatids of *Triatoma melanocephala* and *T. vitticeps* (Hemiptera, Triatominae). *Inv. Rep. Dev.* 58: 9-12.

Alevi KCC, Rosa JA and Azeredo-Oliveira MTV (2014). Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera, Triatominae). *Zootaxa* 3838: 583-589.

Baker JR, Miles MA, Godfrey DG and Barrett TB (1978). Biochemical characterization of some species of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) from bats (Microchiroptera). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 483-491.

De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, et al. (1985). Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Genetica* 67: 185-191.

Dias E, Mello GP, Costa O, Dasmaceno R, et al. (1942). Investigações sobre esquisotripanose de morcegos no Estado do Pará. Encontro do barbeiro "*Cavernicola pilosa*" como transmissor. *Rev. Bras. Biol.* 2: 103-110.

Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS and Jurberg J (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.

Gonçalves TCM, Teves-Neves SC, Santos-Mallet JR, Carbajal-de-la-Fuente AL, et al. (2013). *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108: 429-437.

Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J and Peterson AT (2012). Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J. Trop. Med.* 2012: 1-15.

Hughes-Schrader S and Schrader F (1961). The kinetochore of Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327-350.

Jurberg J, Cunha V, Cailleaux S, Raigorodschi R, et al. (2013). *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrobaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Pan-Amaz. Saúde* 4: 43-56.

Lent H and Jurberg J (1969). O gênero *Cavernicola* Barber, 1937, com um estudo sobre a genitália externa (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Bras. Biol.* 29: 317-327.

Lent H and Wygodzinsky P (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163: 123-520.

Oliveira MA, Souza RCM and Diotaiuti L (2007). Redescription of the genus *Cavernicola* and the tribe Cavernicolini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), with morphological and morphometric parameters. *Zootaxa* 1457: 57-68.

Oliveira MA, Ferreira RL, Carneiro MA and Diotaiuti L (2008). Ecology of *Cavernicola pilosa* Barber, 1937 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the Boa Esperança Cave, Tocantins, Brazil. *Biotropica* 14: 63-68.

Payne F (1909). Some new types of chromosome distribution and their relation to sex. *Biol. Bull.* 16: 119-166.

Poinar Jr G (2013). *Panstrongylus hispaniolae* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a new fossil triatomine in Dominican amber, with evidence of gut flagellates. *Palaeodiversity* 6: 1-8.

Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Pinto MC, et al. (2012). Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 3478: 62-76.

Santos SM, Lopes CM, Dujardin JP, Panzera F, et al. (2007). Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infec. Genet. Evol.* 7: 469-475.

Silva IG, Silva HHG and Elias M (1992). Invasão de *Cavernicola pilosa* Barber, 1937 (Hemiptera, Reduviidae) em habitação humana na periferia de Goiânia. *Rev. Patol. Trop.* 21: 263-264.

Sumner AT (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 305-306.

Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV and Ceron CR (2006). Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz. J. Biol.* 66: 703-708.

Ueshima N (1966). Cytotaxonomy of the triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97-122.