UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PRISCILA PASQÜETTO MENDONÇA

VARIABILIDADE GENÉTICA E VARIAÇÃO DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EM LINHAGENS DE *TRIATOMA INFESTANS* (HETEROPTERA: REDUVIIDAE)

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor em Genética.

São José do Rio Preto – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

PRISCILA PASQÜETTO MENDONÇA

VARIABILIDADE GENÉTICA E VARIAÇÃO DAS REGIÕES HETEROCROMÁTICAS EM LINHAGENS DE *TRIATOMA INFESTANS* (HETEROPTERA: REDUVIIDAE)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

São José do Rio Preto – SP
2014

Mendonça, Priscila Pasqüetto.
Variabilidade genética e variação das regiões heterocromáticas em linhagens de *Triatoma infestans* (Heteroptera : Reduviidae) / Priscila Pasqüetto Mendonça. -- São José do Rio Preto, 2014
115 f. : il., tabs.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Citogenética animal. 2. Triatoma. 3. Reduviidae. 4. Heterocromatina. 5. Linhagem (Genética). I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 595.754

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

Priscila Pasqüetto Mendonça

Variabilidade genética e variação das regiões heterocromáticas em linhagens de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profª. Drª. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Profª. Drª. Alba Regina de Abreu Lima
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa
UNESP – Araraquara

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos
FAMERP – São José do Rio Preto

Profª. Drª. Lilian Madi-Ravazzi
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
27 de junho de 2014

A presente tese foi realizada sob orientação da Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira. O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e no Laboratório de Evolução Molecular, junto ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo No. 142319/2010-4).

Dedico este trabalho as duas "Luísas" da minha vida

Maria Luiza e Ana Luísa

Amor eterno

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.

O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.

Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;

Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

Coríntios, 13

Agradecimentos

Aos meus pais, Ildemar (*in memoriam*) e Maria Luiza, pelo amor, compreensão e incentivo durante toda minha trajetória acadêmica. Obrigada por me apoiarem e estarem comigo nos momentos de alegrias, tristezas, dúvidas...

Agradeço especialmente à minha mãe por dispensar grande parte de seus dias cuidando da minha pequena Ana Luísa todas as vezes que precisei. Sua ajuda foi essencial para que eu pudesse me dedicar integralmente a minha tese, nessa reta final.

Ao meu marido Stevan. Obrigada por entender todas as vezes que precisei ficar trabalhando até tarde e nos finais de semana! Obrigada por sempre me escutar, por tentar me animar nas horas de desânimo e cansaço e por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegrias e indecisões. Muito obrigada também por cuidar com tanto carinho da nossa Ana Luísa...

A minha irmã Christiane, pela companhia e apoio nos momentos de estresse. Obrigada principalmente pelos meus tesouros, meus sobrinhos Arthur e Alice que sempre me apoiaram e me divertiram em todos os momentos difíceis.

À minha orientadora e amiga, professora Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pela orientação durante esses quase sete anos de UNESP. Obrigada por ser um exemplo de pesquisadora e de pessoa. Agradeço também pelos conselhos, pelas boas conversas e pela paciência de sempre!

A todos os que passaram pelo Laboratório de Biologia Celular, em especial à Ana Letícia Guerra, Kaio C. Chaboli Alevi e Nathália Paiva Pereira. Trabalhar ao lado de vocês tornou meus dias muito mais divertidos! Obrigada pela amizade!

Aos amigos do Laboratório de Evolução Molecular, Elaine Silva Dias, Wellington Santos e Camila Vieira. Agradeço especialmente a Adriana Granzotto, pelas valiosas discussões, tão importantes para a realização deste trabalho e para meu aprendizado, pelo auxílio prestado na realização de diversos experimentos, mas principalmente pela amizade.

À amiga Maysa Succi, obrigada pela constante torcida e apoio durante o doutorado.

À Vanessa Bellini Bardella, por estar sempre presente mesmo à distância. Obrigada pela paciência, boa vontade e disposição para ensinar. Seu apoio e ajuda principalmente na etapa final deste trabalho foi fundamental.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa e seus orientados, que me propiciaram a obtenção do material de estudo, além de todo apoio durante todo esse trabalho.

Ao Prof. Dr. André Luís Laforga Vanzela e à Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto pela disponibilização de seus laboratórios e equipamentos.

À querida Elizabete Hiromi Habaro (Betinha) que sempre nos atende com um sorriso no rosto. Obrigada pela atenção e por estar sempre disposta a ajudar.

À Direção do IBILCE/UNESP e ao Departamento de Biologia, que forneceram as condições necessárias que permitiram a realização deste trabalho, e aos funcionários, que sempre me auxiliaram quando necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP), sem o qual a pesquisa não poderia ser realizada, em especial, à Profa. Dra. Claudia Marcia Aparecida Carareto, atual coordenadora do programa, por todo seu entusiasmo e incentivo demonstrado. Agradeço também aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, pela dedicação com que desempenham suas funções.

Aos Profs. Drs. Alba Regina de Abreu Lima, João Aristeu da Rosa, Luiz Carlos de Mattos e Lilian Madi-Ravazzi, pela disposição em avaliar esta Tese e contribuir com a finalização dos nossos trabalhos;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento desta pesquisa.

A Deus, pela dádiva da vida. Por me fazer compreender que tudo é possível quando acreditamos naquilo que desejamos. Por me mostrar que temos que viver um dia após o outro, sem medo do que está por vir.

À todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A doença de Chagas é uma enfermidade de natureza endêmica, com pronunciada relevância na América do Sul. Um dos principais vetores do *Trypanosoma cruzi*, causador desta enfermidade, é o triatomíneo *Triatoma infestans*. Apesar de ter sua incidência reduzida, novos casos de reinfestação apontam a dificuldade do controle vetorial sobre esta espécie devido às suas características biológicas e genéticas, indicando, assim, a importância de se compreender a variabilidade genética neste inseto. No presente trabalho, foi elaborada uma revisão com o objetivo de reunir e organizar os dados disponíveis relacionados à variabilidade genética em *T. infestans*, permitindo eleger os principais e mais informativos genes, assim como evidenciar os índices de variabilidade intra-populacional e inter-populacional. Complementarmente, foi estudada a variação das regiões heterocromáticas, por meio da citogenética clássica e molecular. A aplicação da técnica de bandamento-C convencional e o uso de fluorocromos em nove linhagens e a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com sondas específicas para regiões de DNA satélite em oito linhagens, permitiram observar a grande variação existente na quantidade e distribuição dessas regiões. Os resultados confirmaram a existência de dois grupos com notáveis diferenças genômicas, diferenciadas, principalmente, pela perda de material genético nas linhagens não-andinas. A variabilidade intraespecífica observada pelas análises citogenéticas revelou uma extraordinária dinâmica genômica que ocorreu durante a dispersão desta espécie.

Palavras-chave: Triatomíneos. Variabilidade genética. Citogenética. Cromossomos holocêntricos. Heterocromatina.

ABSTRACT

Chagas disease is an endemic illness of great relevance in South America. Within the triatomines, Triatoma infestans *is one of the most important vectors of Trypanosoma cruzi, the causative protozoan of this disease. Its incidence is controlled, but new cases of reinfestation still occur, and they indicate the difficulties of vector control for this species due to its biological and genetic characteristics. Thus, it is important to understand the genetic variability of this species of insect. In this study, we present a review of the literature in order to gather and organize the data available on genetic variability of* T. infestans. *This review made it possible for us to elect the most appropriate genes and highlight the rates of intra-population and inter-population variability. The variation in the heterochromatic regions was also studied using classical and molecular cytogenetics. The application of the conventional C-banding technique combined with the use of fluorochromes in nine strains, as well as the application of the fluorescent in situ hybridization technique (FISH) with specific probes for regions of DNA satellite in eight strains, all together revealed the existence of noteworthy variation in the amount and distribution of these regions. The results confirmed the existence of two groups with remarkable genomic differences, which are distinguished mainly by the loss of genetic material in non-Andean lineages. The intraspecific variability observed through cytogenetic analysis revealed the extraordinary genomic dynamics that occurred during the dispersion of* T. infestans.

Keywords: Triatomines. Genetic variability. Cytogenetics. Holocentric chromosomes. Heterochromatin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
1.1 Doença de Chagas e *Triatoma infestans* 11
1.2 Biologia e evolução da subfamília Triatominae 12
1.3 Origem e dispersão de *T. infestans* 14
1.4 Citogenética 16
1.5 Citogenética de *T. infestans* 19

2 OBJETIVOS 23

3 CAPÍTULOS 25
3.1 Capítulo I – The genetic variability of *Triatoma infestans* (Klug): a review 26
3.2 Capítulo II – Constitutive heterochromatin variability in meiotic chromosomes of *Triatoma infestans* (Heteroptera, Reduviidae) 57
3.3 Capítulo III – Dynamics of repetitive DNA in *Triatoma infestans* (Heteroptera, Reduviidae) 77

4 DISCUSSÃO GERAL 97

5 CONCLUSÕES 101

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 103

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e *Triatoma infestans*

A doença de Chagas é um dos principais problemas de saúde na América Latina, pois de 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, agente causador dessa enfermidade (WHO, 2013).

Inicialmente considerada uma doença exclusiva das Américas (CHAGAS, 1909; MONCAYO, 2003), lentamente, casos da doença de Chagas já foram relatados nos Estados Unidos (BERN; MONTGOMERY, 2009), Canadá (STELLE et al., 2007), países europeus tais como Suíça (JACKSON et al., 2008), Espanha, França e Itália (SCHMUNIS, 2007; BERN; MONTGOMERY, 2009; GASCÓN et al., 2010; SCHMUNIS; YADÓN, 2010; STRASEN et al., 2014) e também alguns países do Pacífico como a Austrália, Nova Zelândia (JACKSON et al., 2014) e Japão (UENO et al., 1995; GASCÓN et al., 2010). Devido à migração de estrangeiros infectados, o protozoário *T. cruzi* pode ser levado dos países endêmicos para os não endêmicos, iniciando novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos (COURA; VIÑAS, 2010).

Atualmente, a contaminação ocorre de diversos modos, tais como: *i*) transmissão congênita, *ii*) transfusão sanguínea, transplantes de órgãos de pacientes infectados e a *iii*) forma oral que ocorre pela ingestão de alimentos contaminados, principalmente caldo de cana de açúcar e açaí (WHO, 2007; MONCAYO; RASSI JR et al., 2009; SILVEIRA, 2009;). Entretanto, a principal forma de contágio ainda é a transmissão do protozoário pelos vetores conhecidos como “barbeiros”, insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae).

Todas as 148 espécies de triatomíneos reconhecidas atualmente (ABAD-FRANCH et al., 2013; ALEVI et al., 2013; JURBERG et al., 2013; MONTE GONÇALVES et al., 2013) são encontradas principalmente nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), sendo todas potenciais vetores da doença de Chagas. Entretanto, entre as

espécies descritas, a espécie *Triatoma infestans*, é responsável por quase metade de todos os casos da doença de Chagas (SCHOFIELD, 1988; BARGUES et al., 2006). Desse modo, este inseto hematófago é considerado um dos principais vetores do agente causador da doença de Chagas, uma enfermidade que não possui medicamentos eficazes, sendo o controle vetorial ainda a melhor solução no combate da transmissão do protozoário (SCHOFIELD; DIAS, 1999).

A espécie *T. infestans* pode ser considerado um importante vetor devido as suas características biológicas, tais como o alto grau de antropofilia, adaptação ao ambiente domiciliar, capacidade de suportar longos períodos em jejum e apresentar uma ampla distribuição, tornando essa espécie em um grande problema na saúde pública (SCHOFIELD, 1988; DUJARDIN et al., 1998, GARCÍA et al., 2013) apontando, assim, a importância de se compreender a estrutura genética e populacional dessa espécie.

1.2 Biologia e evolução da subfamília Triatominae

Os triatomíneos estão inseridos na ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (LENT; WYGODZINSKY, 1979). Classificados principalmente em relação a sua morfologia externa, as espécies desse grupo se encontram organizadas em seis tribos composta por 18 gêneros (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; ALEVI et al., 2013).

Além da classificação taxonômica clássica, os triatomíneos também foram agrupados em complexos e subcomplexos de acordo com sua morfologia e distribuição geográfica (LENT; WYGODZINSKY, 1979; SCHOFIELD; GALVÃO, 2009) e, mais recentemente, a partir da filogenia molecular. O gênero *Triatoma* apresenta o maior número de espécies e os principais vetores da doença de Chagas e está dividido em três grandes grupos: Rubrofasciata, Dispar e Infestans. O primeiro grupo com a maioria das espécies da América do Norte e do Velho Mundo está subdividido em complexos *Phyllosoma*, *Flavida*, *Rubrofasciata*, *Protracta* e *Lecticularia*. O grupo Dispar é constituído pelas

espécies dos Andes, que inclui o complexo *Dispar*. O terceiro grande grupo Infestans compreende as espécies da América do Sul e apresenta os complexos *Infestans* e *Spinolai* (= *Mepraia*). O complexo *Infestans* apresenta seis subcomplexos, *brasiliensis*, *infestans*, *maculata*, *matogrossensis*, *rubrovaria* e *sordida* (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009).

Além do grande interesse epidemiológico, outras importantes questões em torno da sistemática e filogenia desses insetos também precisam ser estudadas. É relevante ressaltar que essas questões não são apenas importantes na sistemática, mas também na compreensão e controle da doença de Chagas (SCHAEFER, 2003).

Devido às grandes diferenças entre as duas principais tribos Triatomini e Rhodniini, Schofield (1988) considera que esses insetos derivaram de ancestrais distintos. Essa hipótese é suportada devido aos hábitos alimentares de certos triatomíneos e suas relações estreitas com determinados hospedeiros, indicando a origem independente desse grupo (CARCAVALLO et al., 1999). A origem polifilética também é apoiada pela morfologia desses insetos (LENT; WYGODZINSKY, 1979), por marcadores bioquímicos (DUJARDIN et al., 1999) e padrões de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (GARCÍA et al., 1998). Análises de genes mitocondriais (STOTHARD et al., 1998; LYMAN et al., 1999) e nucleares (MARCILLA et al., 2000, 2002; DE PAULA et al., 2005) também corroboram a origem polifilética dos triatomíneos.

Devido a baixa quantidade de espécies e de número de indivíduos analisados, a origem polifilética é questionável (HYPSA et al., 2002; SCHAEFER, 2003). Acredita-se que a origem dos triatomíneos a partir de um único ancestral seja a mais provável (USINGER, 1944; LENT; WYGODZINSKY, 1979; GAUNT; MILES, 2000; HYPSA et al., 2002; SCHAEFER, 2003; WEIRAUCH; MUNRO, 2009, JUSTI et al., 2014). Baseado no hábito de hematofagia compartilhado pelo grupo sugere-se que essa subfamília tenha se originado como um grupo monofilético a partir de insetos hematófagos facultativos da subfamília Physoderinae (USINGER, 1944; LENT; WYGODZINSKY, 1979; HYPSA et al., 2002). A adaptação à hematofagia pode

ter ocorrido uma única vez e, dessa forma, todas as espécies compartilhariam um ancestral comum (LENT; WYGODZYNSKY, 1979; GAUNT; MILES, 2000; HYPSA et al., 2002). Essa hipótese é baseada em caracteres apomórficos como o rostro reto e fino, antenas inseridas lateralmente e ausência de glândulas abdominais dorsais (HYPSA et al., 2002). Apesar dos inúmeros estudos realizados, ainda não há um consenso entre os autores em relação à origem dos triatomíneos e a origem filogenética de muitas tribos e gêneros de triatomíneos continua a ser discutida (HWANG; WEIRAUCH 2012).

1.3 Origem e dispersão de *T. infestans*

Apesar de *T. infestans* ter sua distribuição reduzida após ações de controle ao vetor pela Iniciativa do Cone Sul em que Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai uniram esforços para a eliminação do principal vetor na América do Sul (DIAS; SCHOFIELD, 1999), essa espécie ainda mantém sua importância epidemiológica devido à sua grande capacidade de adaptação ao meio domiciliar e peridomiciliar e, sendo deste modo, um importante vetor do protozoário *T. cruzi* (SCHOFIELD, 1988).

Atualmente *T. infestans* é novamente motivo de preocupação devido aos relatos de re-infestação na Argentina, Bolívia e Paraguai (GÜRTLER et al., 2007), evidenciando a dificuldade do controle vetorial dessa espécie devido a sua ampla extensão em áreas endêmicas e à dificuldade de implementar uma vigilância epidemiológica eficiente a fim de evitar a recuperação de populações de insetos previamente tratados com inseticidas (PÉREZ DE ROSAS et al., 2013).

A principal teoria da origem de *T. infestans* é a hipótese Andina, em que o planalto Boliviano seria o local de origem e dispersão deste inseto (FORATTINI, 1980; SCHOFIELD, 1988; DUJARDIN et al., 1998). Devido ao seu hábito de viver entre rochedos, este inseto estaria associado a roedores (*Cavia porcellus* Meyen) que eram caçados e criados como fonte de alimentação pelas comunidades Andinas (DUJARDIN et al., 1987; SCHOFIELD, 1988) e, deste modo, teriam sido levados para o ambiente domiciliar juntamente com estes

roedores indicando a rota mais provável que *T. infestans* teria sido introduzido pela primeira vez para as habitações humanas (DUJARDIN et al., 1998).

Com o abandono da vida nômade, esses insetos foram sendo gradualmente dispersos para os demais países. De acordo com Schofield (1988) uma das primeiras tribos pré-Inca teria se deslocado do planalto Boliviano para os vales do Chile, iniciando, assim, a dispersão de *T. infestans* pela América do Sul.

A transição de *T. infestans* para o ambiente domiciliar ocorreu, provavelmente, durante o período pré Colombiano, associado ao estabelecimento de tribos pré-Inca e a criação de roedores, e seguido pela colonização dos vales no norte do Chile e sul do Peru. Posteriormente, a dispersão estaria vinculada à criação de gado, fazendo com que estes insetos cruzassem os Andes, alcançando assim a Argentina e o Paraguai. No Brasil, *T. infestans* teria sido transportado provavelmente associado a trabalhadores imigrantes (SCHOFIELD, 1988; DUJARDIN et al., 1997).

Acredita-se que a dispersão de *T. infestans* tenha ocorrido inicialmente em duas rotas, a primeira seria a dispersão deste inseto pela região Andina da Bolívia, Peru e norte do Chile, e uma segunda dispersão não-Andina pela Argentina, Paraguai, Uruguai, Brasil e sul do Chile (SCHOFIELD, 1988; PANZERA et al., 2004; BARGUES et al., 2006).

Apesar de a hipótese Andina ser apoiada por diversos autores (SCHOFIELD, 1988; DUJARDIN et al., 1998) e suportada por análises isoenzimáticas (DUJARDIN et al., 1998), de DNA nuclear e mitocondrial (MONTEIRO et al., 1999; GIORDANO et al., 2005; BARGUES et al., 2006; PICCINALI et al., 2009) e, também, por estudos citogenéticos (PANZERA et al., 2004), essa teoria não explicaria a grande distância que separa *T. infestans* das demais espécies do seu subcomplexo, *T. platensis* e *T. delpontei*, assim como suas diferenças ecológica, fisiológica e comportamental (CARCAVALLO et al., 2000).

A hipótese Andina se baseia principalmente no fato de que os vales Andinos de Cochabamba (Bolívia) seria o único foco silvestre relatado (DUJARDIN et al., 1987; 1998) e, portanto, centro da origem e dispersão dessa espécie. Entretanto, novos focos de populações silvestres foram relatados em

Chuquisaca, La Paz, Potosi e região do Chaco na Bolívia (NOIREAU et al., 1997; 2005; CORTEZ et al., 2007; 2010; BUITRAGO et al., 2010; WALECKX et al., 2011), e também em outros países como Argentina (CEBALLOS et al., 2009), Chile (BACIGALUPO et al., 2006, 2010) e Paraguai (ROLÓN et al., 2011), iniciando, deste modo, mais debates em torno da origem dessa espécie.

Baseando-se na descoberta de novos focos silvestres na região do Chaco Boliviano, Carcavallo et al. (2000) sugerem um ancestral comum que teria se dispersado da floresta subtropical do Chaco para o sul da Bolívia, sul do Paraguai e norte da Argentina. Segundo esse autor, a partir da região do Chaco ocorreu uma dispersão para o norte em que esses insetos se associaram a roedores e, posteriormente, se associariam ao homem, sendo esta a linha evolutiva da origem de *T. infestans*. A segunda linha evolutiva direcionou-se para o sul, em que os insetos associaram-se a pássaros, dando origem às espécies *T. platensis* e *T. delpontei*.

A presença das espécies *T. platensis* e *T. delpontei* na região do Chaco é o principal argumento que apóia a origem Chaquenha de *T. infestans*. Entretanto, para alguns autores, a presença de *T. infestans* silvestres no Chaco pode ser um caso de recolonização por uma população doméstica que teria retornado ao meio silvestre (NOIREAU et al., 2005).

1.4 Citogenética

Citogeneticamente, o interesse sobre os triatomíneos está em seus cromossomos holocêntricos ausentes de constrições centroméricas e com cinetocóro disperso ao longo das cromátides (HUGHES-SCHRADER, 1961; GUERRA et al., 2010). A meiose desses insetos também merece destaque. Durante a divisão celular - meiose, os autosomos são quiasmáticos e segregam-se regularmente, enquanto que os cromossomos sexuais são aquiasmáticos e dividem-se equacionalmente na primeira divisão, e segregam-se reducionalmente somente durante a segunda divisão, caracterizando a meiose invertida para os cromossomos sexuais (UESHIMA, 1966; SOLARI, 1979). Além dessas características, esses vetores apresentam o fenômeno de persistência nucleolar

durante a meiose (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999; ALEVI et al., 2014).

Tradicionalmente, os complementos cromossômicos dos triatomíneos foram descritos de acordo com o seu número e tamanho (UESHIMA, 1966; SOLARI, 1979). O número de cromossomos diplóides varia de 2n = 21 a 25, nos machos, sendo o número mais freqüente, 2n = 22 (20A + XY). O número de autossomos é igualmente homogêneo, diferenciando em apenas algumas espécies, como por exemplo, em *Panstrongylus megistus* e *Triatoma nitida* que reduziram seus autossomos a 2n = 18 e *T. rubrofasciata* que o elevaram a 2n = 22. A maioria das espécies analisadas citogeneticamente, apresenta um par de cromossomos sexuais X e Y nos machos, entretanto, existem espécies com múltiplos cromossomos sexuais, devido à fragmentação do cromossomo X (X_1X_2Y ou $X_1X_2X_3$) (PANZERA et al., 2010; ALEVI et al., 2012).

Assim como os cromossomos monocêntricos, os cromossomos holocêntricos também apresentam regiões de eucromatina e heterocromatina caracterizadas pela diferença no nível de compactação do DNA durante a divisão celular. A localização das regiões heterocromáticas é a principal forma de diferenciação dos cromossomos holocêntricos (PAPESCHI; BRESSA, 2006). Nos triatomíneos a heterocromatina ocorre preferencialmente na região terminal dos autossomos e nos cromossomos sexuais (BARDELLA et al., 2010; 2012; PANZERA et al., 2010; ALEVI et al., 2013).

A localização da heterocromatina pode auxiliar desde a diferenciação de espécies crípticas (PANZERA et al., 1997; 2006; 2010), como também na variação cromossômica intraespecífica em algumas espécies do gênero *Rhodnius* (GÓMEZ-PALACIO et al., 2008), *Panstrongylus* (PÉREZ et al., 2002) e *Triatoma*, sendo a diferenciação de diferentes populações de *T. infestans* o estudo mais relevante nessa subfamília (PANZERA et al., 1992; 2004).

A heterocromatina constitutiva é composta principalmente de regiões repetidas em *tandem* (DNA satélite) e dispersas (elementos de transposição) (GREGORY, 2005), sendo o bandamento-C a técnica mais utilizada na identificação dessas regiões heterocromáticas nos autossomos e na diferenciação

dos cromossomos sexuais dos triatomíneos (PÉREZ et al., 1992), uma vez que o cromossomo Y é quase totalmente heterocromático em relação ao cromossomo X (PANZERA et al., 1992; PÉREZ et al., 1992; 2000). A fim de distinguir alguns tipos de heterocromatina constitutiva pode-se associar à técnica de bandamento-C o uso de fluorocromos que apresentam afinidade às regiões do DNA ricas em AT ou CG (GUERRA, 2000). Amplamente utilizado, o fluorocromo 4'-6 diamidino-2-fenilindole (DAPI) cora preferencialmente a heterocromatina rica em adenina e timina, enquanto que a cromomicina (CMA_3) cora regiões da heterocromatina ricas em citosina e guanina (SCHWEIZER, 1976; SUMNER, 1982; GUERRA, 2000), no entanto, há uma baixa quantidade de estudos relacionados à riqueza de pares de bases em triatomíneos (SEVERI-AGUIAR et al., 2005; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007; BARDELLA et al., 2010; 2012).

Com os avanços da Biologia Molecular, surge a citogenética molecular, permitindo significantes descobertas no entendimento do genoma ao longo dos cromossomos, fornecendo verdadeiros mapas cromossômicos que são de extrema importância na compreensão da evolução do genoma (MARTINS et al., 2011).

A localização de regiões específicas do DNA pela técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) é uma das principais formas de analisar esses marcadores cromossômicos, especialmente em espécies com cromossomos holocêntricos. A maioria desses estudos se concentra na descrição do número e da localização dos sítios de DNA ribossomal (DNAr), principalmente a localização espécie-específica do DNAr 45S (SEVERI-AGUIAR; AZEREDO-OLIVEIRA, 2005; MORIELLE-SOUZA; AZEREDO-OLIVEIRA, 2007; BARDELLA et al., 2010; PANZERA et al., 2012).

Assim como a localização e composição das regiões de heterocromatina constitutiva, a análise e localização de DNAs repetitivos são de grande importância para a citogenética molecular e representam excelentes marcadores cromossômicos, úteis no estudo da evolução das espécies, de cromossomos supernumerários e sexuais e, também, para a identificação de rearranjos cromossômicos (CABRAL-DE-MELLO et al., 2010). Um modo de obtenção de marcadores cromossômicos em regiões repetitivas é por meio da técnica descrita

por Zwick et al. (1997), que se baseia na cinética de reassociação do DNA (C_0t), gerando frações de DNA altamente repetitivos que, após a marcação, podem ser utilizados como sondas espécie-específica.

Apesar da escassa quantidade de estudos em relação à localização das regiões de DNA repetitivo em insetos (MANDRIOLI et al., 1999; LORITE et al., 2001; CABRAL-DE-MELLO et al., 2010), recente estudo realizado na espécie *T. infestans* contribuiu imensamente com a descrição de três novos marcadores cromossômicos (BARDELLA et al., 2014).

1.5 Citogenética de *T. infestans*

Devido à sua grande importância médica e citogenética, os triatomíneos têm sido objeto de muitos estudos genéticos (PANZERA et al., 2010), destacando-se a espécie *T. infestans*. Essa apresenta um conjunto cromossômico constituído de 20 autossomos e um par de cromossomos sexuais (XY em machos e XX em fêmeas) (UESHIMA, 1979). Nesse cariótipo três pares de autossomos são maiores (pares 1-3) e facilmente distinguíveis por seu tamanho. Enquanto que os demais sete pares apresentam tamanho menor e são semelhantes entre si, o que dificulta seu reconhecimento (UESHIMA, 1979).

Além do cariótipo comumente observado, Panzera et al. (2010) registraram supostos cromossomos B durante a mitose dessa espécie. Esses diminutos cromossomos apresentaram-se heterocromáticos e sua frequência variou de um a três, de acordo com sua procedência geográfica. Esses cromossomos não foram visualizados durante a meiose e não houve alterações durante a segregação meiótica. Segundo Pérez et al. (2004) esses cromossomos teriam se originado de restos cromossômicos, a partir de rearranjos estruturais dos autossomos. A presença dos cromossomos B pode interferir na segregação dos cromossomos, tanto autossomos como também dos sexuais, produzindo gametas não viáveis , afetando a fertilidade do indivíduo (PÉREZ et al., 2004).

Inúmeros estudos citogenéticos foram realizados nessa espécie, destacando-se o primeiro estudo de polimorfismo cromossômico intraespecífico

em Heteroptera observado em populações naturais de *T. infestans* do Uruguai (PANZERA et al., 1992), iniciando, deste modo, análises em indivíduos provenientes de outras regiões geográficas: Argentina, Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru. Nesse estudo, Panzera et al. (2004) identificaram dois grupos cromossômicos alopátricos denominados Andino e não-Andino. De acordo com a quantidade das regiões heterocromáticas, o grupo Andino apresentou mais de 30% de heterocromatina quando comparado ao grupo não-Andino. Esses grupos também se diferenciaram na localização e quantidade de blocos heterocromáticos, assim como na localização do sítio do DNAr 18S (PANZERA et al., 2004; 2012). Em relação à distribuição das regiões heterocromáticas, o grupo Andino apresentou de 14-20 autossomos portando blocos heterocromáticos e cromossomos sexuais de tamanhos semelhantes sendo ambos heterocromáticos, enquanto que o grupo Andino apresentou de 4-7 autossomos com blocos heterocromáticos e apenas o cromossomo Y foi maior e heterocromático (PANZERA et al., 2004). A localização do 18S também foi diferente nesses dois grupos, no grupo Andino essa região foi observada em um autossomo, enquanto que no grupo não-Andino foi verificada no cromossomo X (PANZERA et al., 2012). Segundo esses autores as alterações citogenéticas observadas refletem as alterações genômicas adaptativas que contribuem para a capacidade de *T. infestans* sobreviver e se reproduzir em diferentes ambientes.

A composição da heterocromatina verificada por meio dos fluorocromos DAPI e CMA, em indivíduos provenientes do Peru, também foi observada por Bardella et al. (2014), sendo que as bandas DAPI e CMA foram preferencialmente terminal/subterminal nos cromossomos maiores e, também, no cromossomo X. Os três pares maiores apresentaram regiões ricas em AT e CG em ambas as extremidades. Nesses cromossomos as bandas CMA foram adjacentes e mais internas em relação às bandas DAPI. O quarto par apresentou apenas uma banda CMA em uma das extremidades. Os pares 5 e 6 apresentaram apenas um banda DAPI terminal em uma das pontas. Neste estudo, o par 7 foi heteromórfico sendo possível observar uma banda DAPI terminal em um dos cromossomos, enquanto que em seu par essa banda foi intercalar. Os pares 8-10 não apresentaram regiões

de heterocromatina. Em relação aos cromossomos sexuais dos indivíduos do Peru, o cromossomo X foi um pouco maior e apresentou duas bandas DAPI terminal, enquanto que o cromossomo Y apresentou uma grande banda DAPI ocupando mais da metade do cromossomo.

Análises das regiões repetitivas presentes na heterocromatina dessa espécie permitiram evidenciar a complexidade na distribuição e as ocorrências do DNAsat nas regiões heterocromáticas, demonstrando que cada família de DNA repetitivo pode apresentar níveis diferentes e independentes de amplificação/redução e dispersão ao longo do conjunto cromossômico (BARDELLA et al., 2014). Além disso, a heterocromatina mostrou-se mais dinâmica que a eucromatina em relação ao processo de diferenciação dos cariótipos em diferentes populações de *T. infestans* na América do Sul (PANZERA et al., 1995), sendo assim, um marcador cromossômico mais preciso na definição dos cariótipos das espécies da subfamília Triatominae.

Apesar de toda contribuição citogenética acumulada, pouco se compreende em relação aos mecanismos de evolução cromossômica em cromossomos holocêntricos. Estudos em torno da variabilidade da heterocromatina e da dinâmica das regiões repetitivas, em particular na espécie *T. infestans*, que apresenta uma enorme variedade e diversificação cromossômica, podem fornecer novos marcadores para o entendimento da diversificação cromossômica neste grupo.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a variabilidade genética e cromossômica na espécie *Triatoma infestans*, que foi mediado pelos seguintes objetivos específicos:

• Revisar e analisar os dados disponíveis relacionados à variabilidade genética em *T. infestans*;

• Diferenciar citogeneticamente nove linhagens de *T. infestans* provenientes de diferentes regiões geográficas da América do Sul;

• Observar a dinâmica de duas famílias de DNAs repetitivos em oito linhagens de *T. infestans* da América do Sul;

Os resultados obtidos foram organizados na forma de capítulos que correspondem a três manuscritos: uma revisão sobre a variabilidade genética de *T. infestans* e dois manuscritos que focam a variabilidade cromossômica e a análise das regiões repetitivas em diferentes linhagens de *T. infestans*.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu estabelecer as seguintes conclusões:

1. O conhecimento relatado na presente revisão permite eleger o gene mitocondrial citocromo B (citB) como um bom modelo para a investigação da variabilidade genética de *T. infestans*, de modo a se melhor compreender a origem e dispersão desse vetor;

2. A variabilidade citogenética de *T. infestans* em relação à quantidade e distribuição da heterocromatina é maior que a previamente descrita, indicando diferentes padrões nas linhagens analisadas;

3. A existência em *T. infestans* de dois grupos com notáveis diferenças genômicas, que podem ser distinguidas, principalmente, pela perda de material genético nas linhagens não-andinas;

4. A utilização de duas sequências curtas no DNA satélite rico em AT aumentou o número de marcações cromossômicas no cariótipo de *T. infestans*, permitindo observar melhor as alterações ocorridas nas diferentes linhagens analisadas;

5. A localização e distribuição dos novos marcadores citogenéticos (DNA satélite) permitiu observar a dinâmica existente na região heterocromática de *T. infestans*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F.; PAVAN, M. G.; JARAMILLO, N.; PALOMEQUE, F. S.; DALE, C.; CHAVERRA, D.; MONTEIRO, F. A. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from western Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 92-99, 2013.

ALEVI, K. C. C.; CASTRO, N. F. C.; LIMA, A. C. C.; RAVAZI, A.; MORIELLE-SOUZA, A.; DE OLIVEIRA, J.; DA ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Nucleolar persistence during spermatogenesis of the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Triatominae). **Cell Biology International**, v. X, p. n/a-n/a, 2014.

ALEVI, K. C. C.; DA ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Mini Review: karyotypic survey in Triatominae subfamily (Hemiptera, Heteroptera). **Entomology, Ornithology & Herpetology**, v. 2, n. 2, p. 1-2, 2013.

ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; PEREIRA, N. P.; DA ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1652–1653, 2012.

ALEVI, K. C. C.; MENDONÇA, P. P.; PEREIRA, N. P.; GUERRA, A. L.; FACINA, C. H.; DA ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: *Triatoma lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (2002). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 13, p. 301-303, 2013.

BACIGALUPO, A.; SEGURA, J. A.; GARCÍA, A.; HIDALGO, J.; GALUPPO, S.; CATTAN, P. E. Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la Región Metropolitana, Chile. **Revista Médica de Chile**, v. 134, p. 1230-1236, 2006.

BACIGALUPO, A.; TORRES-PÉREZ, F.; SEGOVIA, V.; GARCÍA, A.; CORREA J. P.; MORENO, L.; ARROYO, P.; CATTAN, P. E. Sylvatic foci of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in Chile: description of a new focus and challenges for control programs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 633-641, 2010.

BARDELLA, V. B.; DA ROSA, J. A.; VANZELA, A. L. L. Origin and distribution of AT-rich repetitive DNA families in *Triatoma infestans* (Heteroptera). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 106-114, 2014.

BARDELLA, V. B.; DE SOUZA, R. S.; MARTIN, J. A. B. S.; ANDRADE, C. G. T. J.; VANZELA, A. L. L.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Cytogenetic characterization reveals differences in nuclear organization of cystic cells among Brazilian species of *Triatoma* (Heteroptera, Reduviidae). **Cell Biology International**, v. 36, p. 1287-1291, 2012.

BARDELLA, V; B.; GAETA, M. L.; VANZELA, A. L. L.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Heteroptera: Reduviidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 4, p. 141-149, 2010.

BARGUES, M. D.; KLISIOWICZ, D. R.; PANZERA, F.; NOIREAU, F.; MARCILLA, A.; PEREZ, R.; ROJAS, M. G.; O'CONNOR, J. E.; GONZALEZ-CANDELAS, F.; GALVÃO, C.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R. U.; DUJARDIN, J. P.; MAS-COMA, S. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p. 46–62, 2006.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. e52-4, 2009.

BUITRAGO, R.; WALECKX, E.; BOSSENO, M. F.; ZOVEDA, F.; VIDAURRE, P.; SALAS, R.; MAMANI, E.; NOIREAU, F.; BRENIÈRE, S. F. First report of widespread wild populations of *Triatoma infestans*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 574-579, 2010.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS, C. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in thebeetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. **Heredity**, v. 104, p. 393-400, 2010.

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H. Phylogeny of the triatominae. In Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas, Fiocruz, Rio de Janeiro, v. 3, p. 569-925, 1999.

CARCAVALLO, R. U.; JURBERG, J.; LENT, H.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Entomologia y Vectores**, v. 7, p. 1-99, 2000.

CEBALLOS, L. A.; PICCINALI, R. C.; BERKUNSKY, I.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E. First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 5, p. 1195-1202, 2009.

CHAGAS, C. Nova Tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CORTEZ, M. R.; EMPERAIRE, L.; PICCINALI, R. V.; GÜRTLER, E. R.; TORRICO, F.; JANSEN, A. M.; NOIREAU, F. Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. **Acta Tropica**, v. 102, p. 47-54, 2007.

CORTEZ, M. R.; MONTEIRO, F. A.; NOIREAU, F. New insights on the spread of *Triatoma infestans* from Bolivia – Implications for Chagas disease emergence in the Southern Cone. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, p. 350-353, 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, p. S6–S7, 2010.

DE PAULA, A. S.; DIOTAIUTI, L.; SCHOFIELD, C. J. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, p. 712-718, 2005.

DIAS, J. C. P.; SCHOFIELD, C. J. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 103-121, 1999.

DUJARDIN, J. P.; BERMUDEZ, H.; CASINI, C.; SCHOFIELD, C. J.; TIBAYRENC. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. **Journal of Medical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 544-551, 1997.

DUJARDIN, J. P.; PANZERA, P.; SCHOFIELD, C. J. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 223-228, 1999.

DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; TIBAYRENC, M. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 20-29, 1998.

DUJARDIN, J. P.; TIBAYRENC, M.; VENEGAS, E.; MALDONADO, L.; DESJEUX, P.; AYALA, F. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. **Journal of Medical Entomology**, v. 24, p. 40-5, 1987.

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

GARCÍA, B. A.; MANFREDI, C.; FICHERA, L.; SEGURA, E. Short report: variation in mitochondrial 12s and 16s ribosomal DNA sequences in natural populations of Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n, 6, p. 692-694, 2003.

GARCÍA, B. A.; PÉREZ DE ROSAS, A. R.; BLARIZA, M. J.; GROSSO, C. G.; FERNÁNDEZ, C. J.; STROPPA, M. M. Molecular population genetics and evolution of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). **Current Genomics**, v. 14, p.316-323, 2013.

GARCÍA, B. A.; POWELL, J. R. Phylogeny of species of Triatoma (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, p. 232-238, 1998.

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

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated Trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 557-565, 2000.

GIORDANO, R.; CORTEZ, J. C. P.; PAULK, S.; STEVENS, L. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 753-760, 2005.

GÓMEZ-PALACIO, A.; JARAMILLO-OCAMPO, N.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; SALDAÑA, A.; CALZADA, J.; PÉREZ, R.; PANZERA, F. Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Rhodniini). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 160-164, 2008.

GREGORY, T. R. **The evolution of the Genome**. Elsevier Academic Press, San Diego. p. 768, 2005.

GUERRA, M. Patters of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M.; CABRAL, G.; CUACOS, M.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M.; VEGA, J.; PUERTAS, M. J. Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of the centromeric rules. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 129, p. 82-96, 2010.

GÜRTLER, R. E.; CANALE, D. M.; SPILLMANN, C.; STARIOLO, R.; SALOMÓN, O. D.; BLANCO, S.; SEGURA, E. Effectiveness of residual spraying of peridomestic ecotopes with deltamethrin and permethrin on *Triatoma infestans* in rural western Argentina: a district-wide randomized trial. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 3, p. 196-205, 2004.

GÜRTLER, R. E.; KITRON, U.; CECERE, M. C.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **of the United States of America**, v. 104, p. 16194-16199, 2007.

HUGHES-SCHRADER, S.; SCHRADER, F. The kinetochore of the Hemiptera. **Chromosoma**, v. 12, p. 327-350, 1961.

HWANG, W. S.; WEIRAUCH, C. Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45523, 2012.

HYPSA, V.; TIETZ, D. F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R. O. M.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.23, p. 447-57, 2002.

JACKSON, Y.; CHAPPUIS, F.; LOUTAN, L. Chagas disease in Switzerland: managing an emerging infection and interrupting its transmission. **Revue Médicale Suisse**, v. 14, n. 4, p. 1212-4, 1216-7, 2008.

JACKSON, Y.; PINTO, A.; PETT, S. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. **Tropical Medicine & International Health**, v. 19, n. 2, p. 212-218, 2014.

JURBERG, J.; CUNHA, V.; CAILLEAUX, S.; RAIGORDSCHI, R.; LIMA, M. S.; ROCHA, D. S.; MOREIRA, F. F. F. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 4, p. 43-56, 2013.

JUSTI, S. A.; RUSSO, C. A.; MALLET, J. R.; OBARA, M. T.; GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-12, 2014.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 163: 123-520, 1979.

LORITE, P.; PALOMEQUE, T.; GARNERÍA, I.; PETITPIERRE, E. Characterization and chromosome location of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina Americana* (Coleoptera, Chrysomelidae). **Genetica**, v. 110, p. 143-150, 2001.

LYMAN, D. F.; MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D. M.; DUJARDIN, J. P.; BEARD, C. B. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 377-386, 1999.

MANDRIOLI, M.; BIZZARO, D.; MANICARDI, G. C.; GIONGHI, D.; BASSOLI, L.; BIANCHI, U. Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato aphid *Myzus persicae*. **Chromosoma**, v. 108, p. 436-442, 1999.

MARCILLA, A.; BARGUES, M. D.; ABAD-FRANCH F.; PANZERA, F.; CARCAVALLO, R. U.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C.; JURBERG, J.; MILES, M. A.; DUJARDIN, J. P.; MAS-COMA, S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanossoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.1, p. 225-235, 2002.

MARCILLA, A.; CANESE, A.; ACOSTA, N.; LÓPEZ, E.; ROJAS DE ARIAS, A.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Paraguay: a molecular analysis based on the second internal transcribed spacer of the rDNA. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 60, p. 99-105, 2000.

MARTINS, C.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; OLIVEIRA, S. G. Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes. In: Kevin V Urbano. (Org.). **Advances in Genetics Research**. Hauppauge: Nova Science Publisher, 2011, v. 4, p. 01-82.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 17-30, 2009.

MONTE-GONÇALVES, T. C.; TEVES-NEVES, S. C.; SANTOS-MALLET, J. R.; CARBAJAL-DE-LA-FUENTE, A. L.; LOPES, C. M. Triatoma jatai sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 429-437, 2013.

MONTEIRO, F.; PÉREZ, R.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; GALVÃO, C.; ROCHA, D.; NOIREAU, F.; SCHOFIELD, C.; BEARD, C. B. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 229-38, 1999.

MORIELLE-SOUZA, A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Differential characterization of holocentric chromosomes in triatomines (Heteroptera, Triatominae) using different staining techniques and fluorescent in situ hybridization. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 713-720, 2007.

NOIREAU, F.; CORTEZ, M. G. R.; MONTEIRO, F. A.; JANSEN, A. M.; TORRICO, F. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 1, p. 7-10, 2005.

NOIREAU, F.; FLORES, R.; GUTIERREZ, T.; DUJARDIN, J. P. Detection of sylvatic dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 583-584, 1997.

PANZERA, F.; ALVAREZ, F.; SANCHEZ-RUFAS, J.; PÉREZ, R.; SUJA, J.; SCVORTZOFF, E.; ESTRAMIL, E.; DUJARDIN, J. P.; SALVATELLA, R. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera-Reduviidae). **Genome**, v. 35, p. 1068-1074, 1992.

PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; NICOLINI, P.; CARACCIO, M. N.; ROSE, V.; TELLEZ, T.; BERMÚDEZ, H.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S.; O'CONNOR, E.; PÉREZ, R. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 438-446, 2004.

PANZERA, F.; FERRANDIS, I.; RAMSEY, J.; ORDONEZ, R.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; CABRERA, M.; MONROY, M. C.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S.; O' CONNOR, J. E.; ÂNGULO, V. M.; JARAMILLO, N.; CORDÓN-ROSALES, C.; GÓMEZ, D.; PÉREZ, R. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with

different epidemiological importance as Chagas disease vectors. Tropical Medicine & International Health, v. 11, p. 1092-1103, 2006.

PANZERA, F.; FERRANDIS, I.; RAMSEY, J.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; CABRERA, M.; MONROY, C.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S.; O'CONNOR, J. E.; ANGULO, V. M.; JARAMILLO, N.; PÉREZ, R. Genome size determination in Chagas disease transmitting bugs (Hemiptera-Triatominae) by flow cytometry. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 516-521, 2007.

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

PANZERA, F.; PEREZ, R.; PANZERA, Y.; ALVAREZ, F.; SCVORTZOFF, E.; SALVATELA, R. Karyotype evolution in holocentric chromosomos of three related species of triatomines (Heteroptera-Reduviidae). **Chromosome Research**, v. 3, p. 143-150, 1995.

PANZERA, F.; PÉREZ, R.; PANZERA, Y.; FERRANDIS, I.; FERREIRO, M. J.; CALLEROS, L. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 128, p. 77-87, 2010.

PANZERA, Y.; PITA, S.; FERREIRO, M. J.; FERRANDIS, I.; LAGES, C.; PÉREZ, R.; SILVA, A. E.; GUERRA, M.; PANZERA, F. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). **Cytogenetic Genome Research**, v. 138, p. 56-67, 2012.

PAPESCHI, A. G.; BRESSA, M. J. Evolutionary cytogenetics in Heteroptera. **Journal of Biological Research**, v. 5, p. 3-21, 2006.

PÉREZ DE ROSAS AR, SEGURA EL, FICHERA L, GARCÍA BA. Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. **Genetica**, v. 133, p. 247-260, 2008.

PÉREZ DE ROSAS, A. R.; SEGURA, E. L.; FUSCO, O.; BAREIRO GUIÑAZÚ, A. L.; GARCÍA, B. A. Fine-scale genetic structure in populations of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduvidae). **Genetica**, v. 141, p. 107-117, 2013.

PÉREZ DE ROSAS, A. R.; SEGURA, E. L.; GARCÍA, B. A. Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1401-1412, 2007.

PÉREZ, R.; CALLEROS, L.; ROSE, V.; LORCA, M.; PANZERA, F. Cytogenetic studies on *Mepraia gajardoi* (Heteroptera: Reduviidae). Chromosome behaviour in a spontaneous translocation mutant. **European Journal of Entomology**, v.101, p. 211-218, 2004.

PÉREZ, R.; HERNÁNDEZ, M.; CARACCIO, M. N.; ROSE, V.; VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; MEJÍA, J. M.; ÂNGULO, V. M.; RAMÍREZ, C. M. S.; ROLDÁN, J.; VARGAS, F.; WOLFF, M.; PANZERA, F. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, p. 47-56, 2002.

PÉREZ, R.; PANZERA, Y.; SCAFIEZZO, S.; MAZZELA, M. C.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; SCVORTZOFF, E. Cytogenetics as a tool for triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 353-361, 1992.

PÉREZ, R.; RUFAS, J.; SUJA, J.; PANZERA, F. Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). **Chromosome Research**, v. 8, p. 17-25, 2000.

PICCINALI, R. V.; MARCET, P. L.; CEBALLOS, L. A.; KITRON, U.; GÜRTLER, R. E.; DOTSON, E. M. Genetic variability, phylogenetic relationships and gene flowin *Triatoma infestans* dark morphs from the Argentinean Chaco. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 895-903, 2011.

PICCINALI, R. V.; MARCET, P. L.; NOIREAU, F.; KITRON, U.; GÜTLER, R. E.; DOTSON, E. M. Molecular population genetics and phylogeography of the

Chagas disease vector Triatoma *infestans* in South America. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 4, p. 796-809, 2009.

RASSI JR, A.; DIAS, J. C. P.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. **Heart**, v. 95, p. 524-534, 2009.

ROLÓN, M.; VEJA, M. C.; ROMÁN, F.; GÓMEZ, A.; ROJAS DE ARIAS, A. First report of colonies of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, using a trained dog. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 5, n. 5, p. e1026, 2011.

SCHAEFER, C. W. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): systematic questions and some others. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 1, p. 1-10, 2003.

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

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, p. 14–21, 2010.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of the Triatominae. In: SERVICE, M. W. **Biosystematics of Haematophagous Insects**. Oxford, England, Claredon Press. p.285-312, 1988.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. P. The Southern Cone programme against Chagas disease. **Advances in Parasitology**, v. 42, p. 1-25, 1999.

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

SCHWEIZER, D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma**, v. 58, p. 307-324, 1976.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Localization of rDNA sites in holocentric chromosomes of three species of triatomines (Heteroptera, Triatominae). **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 4, p. 704-709, 2005.

SEVERI-AGUIAR, G. D. C.; LOURENÇO, L. B.; BICUDO, H. E. M. C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). **Genetica**, v. 126, p. 141-151, 2006.

SOLARI, A. J. Autosomal synaptonemal complexes and sx chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Heteroptera, Reduviidae). **Chromosoma**, v. 72, p. 225-240, 1979.

STELLE, L. S.; MACPHERSON, D. W.; KIM, J.; KEYSTONE, J. S.; GUSHULAK, B. D. The sero-prevalence of antibodies to Trypanosoma cruzi in Latin American refugees and immigrants to Canada. **Journal of Immigrant and Minority Health**, v. 9, p. 43-47, 2007.

STOTHARD, J. R.; YAMAMOTO, Y.; CHERCHI, A.; GARCIA, A. L.; VALENTE, S. A. S.; SCHOFIELD, C. J.; MILES, M. A.A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. **Bulletin of Entomological Research**, v. 88, p. 553-560, 1998.

STRASEN, J.; WILLIAMS, T.; ERTL, G.; ZOLLER, T.; STICH, A.; RITTER, O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. **Clinical Research in Cardiology**, v. 103, p. 1-10, 2014.

SUMMER, A. T. The nature of mechanisms of chromosome banding. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 6, p. 59-87, 1982.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. **Caryologia**, v. 52, n. 3-4, p. 177-184, 1999.

UENO, Y.; NAKAMURA, Y.; TAKAHASHI, M.; INOUE, T.; ENDO, S.; KINOSHITA, M.; TAKEUCHI, T. A highly suspected case of chronic Chagas's heart disease diagnosed in Japan. **Japanese Circulation Journal**, v. 59, p. 219-223, 1995.

UESHIMA, N. Cytotaxonomy of the Triatominae (Heteroptera-Reduviidae). **Chromosoma**, v. 18, p. 97-122, 1966.

UESHIMA, N. Insecta 6. Hemiptera II: Heteroptera. En: **Animal Cytogenetics**. Vol. 3. John B (ed.). Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart, 1979.

USINGER, R. L. The Triatominae of North and Central America and the West Indies. **Public Health Bulletin**, v. 88, p. 1-83, 1944.

WALECKX, E.; SALAS, R.; HUAMÁN, N.; BUITRAGO, R.; BOSSENO, M. F.; ALIAGA, C.; BARNABÉ, C.; RODRIGUEZ, R.; ZOVEDA, F.; MONJE, M.; BAUNE, M.; QUISBERTH, S.; VILLENA, E. New insights on the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) brought by the genetic analysis of Bolivian sylvatic populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, p. 1045-1057, 2011.

WEIRAUCH, C.; MUNRO, J. B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, p. 287-299, 2009.

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). WHO Media centre: Fact sheet N° 340, 2013, Geneva: WHO.

World Health Organization. Reporte del grupo de trabajo científico sobre La enfermedad de Chagas. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2007.

ZWICK, M. S.; HANSON, R. E.; ISLAM-FARIDI, M. N.; STELLY, D. M.; WING, R. A.; PRICE, J.; McKNIGHT, T. D. A rapid procedure for the isolation of C_0t–1 DNA from plants. **Genome**, v. 40, p. 138-142, 1997.