

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Amanda Ravazi

**Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera,
Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva,
caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas**

São José do Rio Preto
2019

Amanda Ravazi

**Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera,
Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva,
caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, área de concentração em Biociências e Biologia Evolutiva junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Financiadora: CAPES

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

Co-orientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

São José do Rio Preto
2019

R252e

Ravazi, Amanda

Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera, Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva, caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas / Amanda Ravazi. -- São José do Rio Preto, 2019

67 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Coorientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

1. Genética Animal. 2. Cruzamentos (Genética). 3. Triatomíneo. 4. Doença de Chagas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Amanda Ravazi

**Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera,
Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva,
caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, área de concentração em Biociências e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, SP.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa
UNESP – Câmpus Araraquara (FCFAR)

Prof. Dr. Luis Lênin Vicente Pereira
União das Faculdades dos Grandes Lagos - UNILAGO

São José do Rio Preto
22 de fevereiro de 2019

Local de Realização

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto – IBILCE/UNESP e no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – FCFAR/UNESP.

Dedicatória

Dedico esta conquista aos meus pais Valéria e Ricardo, que mesmo diante de toda dificuldade nunca deixaram de acreditar em mim. Ao meu irmão Pedro, que sempre me apoiou e esteve presente em cada passo da minha vida. Ao meu querido tio Valdemar Rebollo Júnior (*in memoriam*), dedico todo o meu sonho e realização. A Deus, dedico toda minha gratidão por tamanho amor.

"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam." 1 Coríntios 2:9

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente a Deus, por toda bondade e amor comigo, que sempre me proporcionou o necessário para o cumprimento dos seus sonhos em minha vida. Agradeço por tamanho carinho e fidelidade de suas promessas.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Tercilia Vilela de Azeredo Oliveira, agradeço pelo apoio profissional e acolhimento, por me permitir adentrar os caminhos da ciência. A você, o meu muito obrigada!

Ao meu amigo e co-orientador Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, agradeço por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional, por toda a paciência e carinho. Agradeço por me ensinar diariamente o quanto podemos ser justos e o quanto podemos nos esforçar para alcançar aquilo que desejamos. Por muitas vezes, o seu amor pela ciência permitiu que eu acreditasse em mim mesma. A você, o meu muito obrigada!

As minhas amigas e companheiras de laboratório, Fernanda Fernandez Madeira, Ana Letícia Guerra, Ana Beatriz Bortolozo de Oliveira, agradeço por todos os momentos de alegria compartilhados, risadas, também momentos de desespero e por todos auxílios que eu recebi quando precisei. Vocês fizeram e fazem a diferença em todo este tempo. A vocês, o meu muito obrigada!

Aos meus colegas de laboratório, agradeço pela convivência e possibilidade de crescimento pessoal e profissional também. A vocês o meu muito obrigada!

Aos meus pais, Valéria e Ricardo, agradeço por serem a minha base em todos os sentidos, por acreditarem em mim quando eu precisei. Agradeço diariamente por serem vocês os pais que Deus quis me dar, por serem meu modelo de amor e fidelidade. A vocês, o meu muito obrigada!

Ao meu irmão, Pedro, agradeço por me formar como pessoa, por me ensinar o sentido de partilhar e por ter sido um motivo para que eu pudesse seguir em frente. Agradeço por encontrar em você o meu porto seguro. A você, o meu muito obrigada!

Aos meus avós maternos, Neide e Valdemar, e paternos, Maria José e Nelson (*in memorian*), agradeço pela simplicidade no olhar, no falar, no agir e no amar, que em tantos momentos me proporcionaram a vontade de poder dar o meu melhor. Por vezes, no pouco, me fizeram ter a certeza que a vida vale a pena. A vocês, o meu muito obrigada!

As minhas tias, Rosimeire, Renata e Vera e aos meus tios Atayde e Euler, agradeço por toda a ajuda financeira e emocional. Nos momentos mais difíceis estiveram comigo e me estenderam as mãos e também os seus corações quando eu precisei. A vocês, o meu muito obrigada!

De forma especial, agradeço ao meu tio Valdemar Rebollo Junior (*in memorian*), por me fazer entender que a vida merece ser vivida até o último segundo. Por me fazer lembrar o quanto é bom sorrir e o quanto sou capaz de levar alegria onde mora tristeza. Por me fazer acreditar que mereço ser feliz e principalmente, por me mostrar que tenho apenas o hoje. A você, o meu eterno muito obrigada!

Aos meus amigos Maria Izabel Salioni, Matheus Castro, Gabriel Lois, Lais Azevedo, Camila Marques agradeço por darem o seu melhor em minha vida, por dedicarem as suas orações a mim. Agradeço por estarem presentes fisicamente em todas as minhas lutas e conquistas e principalmente, por decidirem passar por todas elas ao meu lado. A vocês, o meu muito obrigada!

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que participaram desta conquista!

RESUMO

Híbridos naturais já foram relatados para a tribo Rhodniini e os estudos acerca dos cruzamentos experimentais podem ajudar a compreender a sistemática deste grupo de vetores. Ainda, podem ser usados para analisar os mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico entre as diferentes espécies bem como podem ser empregados para o estabelecimento do papel da hibridação natural na geração de novas variantes. O presente projeto teve como objetivo realizar uma análise multidisciplinar de aspectos evolutivos (barreiras pré e pós-zigóticas) e taxonômicos na tribo Rhodniini, por meio de cruzamentos experimentais e análise dos híbridos resultantes até, pelo menos, a terceira geração (F3), com ênfase na análise da dinâmica evolutiva dos cruzamentos experimentais (cópula, oviposição, eclosão e desenvolvimento dos híbridos), bem como na análise da viabilidade reprodutiva (espermatogênese e morfologia das gônadas masculinas e femininas) e do padrão de segregação das características fenotípicas dos parentais nos híbridos experimentais. Os cruzamentos permitiram observar que os gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes* estão isolados reprodutivamente por barreiras pré-zigóticas, corroborando o *status* genérico de *Psammolestes*. Além disso, permitiram ressaltar o *status* específico de *P. tertius* e *P. coreodes*, pois embora híbridos em primeira geração (F1) eclodiram, barreiras pós-zigóticas de inviabilidade do híbrido e quebra do híbrido foram relatadas. O *status* específico de *R. nasutus* e *R. prolixus* foi confirmado pelos fenômenos de inviabilidade e esterilidade dos híbridos e o *status* de *R. montenegrensis* por eventos de inviabilidade do híbrido em F1, esterilidade do híbrido para F2 proveniente do cruzamento inicial entre *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ e desmoronamento do híbrido atuando em F2 e F3.

Palavras-chave: Cruzamentos experimentais. Híbridos. Triatomíneos. Doença de Chagas.

ABSTRACT

Natural hybrids have been reported for the Rhodniini tribe, and studies of experimental crosses may help to understand the systematics of this group of vectors. Furthermore, they can be used to analyze the mechanisms of isolation that limit the gene flow between the different species and can be used to establish the role of natural hybridization in the generation of new variants. The present project aimed to carry out a multidisciplinary analysis of evolutionary aspects (pre- and post-zygotic) and taxonomic barriers in the Rhodniini tribe, by means of experimental crosses and analysis of the resulting hybrids up to at least the third generation (F3), with (spermatogenesis and morphology of male and female gonads) and the segregation pattern of the phenotypic characteristics of the parents in the hybrids experiments. The crosses showed that the genera *Rhodnius* and *Psammolestes* are reproductively isolated by pre zygotic barriers, corroborating the generic status of *Psammolestes*. In addition, they allowed to highlight the specific status of *P. tertius* and *P. coreodes*, because although hybrids in the first generation (F1) erupted, post zygotic barriers of hybrid unfeasibility and hybrid breakage were reported. The specific status of *R. nasutus* and *R. prolixus* was confirmed by the phenotypes of infeasibility and sterility of the hybrids and the status of *R. montenegrensis* by events of non-viability of the hybrid in F1, hybrid sterility of F2 from the initial cross between *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ and collapse of the hybrid acting on F2 and F3.

Keywords: Experimental crosses. Hybrids. Triatomines. Chagas disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma dos cruzamentos experimentais.	21
Figura 2 – Pontos de referência (<i>landmarcks</i>).	24
Figura 3 – Cruzamentos experimentais entre <i>R. nasutus</i> ♀ e <i>R. prolixus</i> ♂.	48
Figura 4 – Híbridos adultos do cruzamento experimental entre <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i> .	49
Figura 5 – Gônadas de híbridos do cruzamento experimental entre <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i> .	49
Figura 6 – Metáfases meióticas do cruzamento experimental entre <i>R. prolixus</i> ♀ e <i>R. nasutus</i> .	50
Figura 7 – Mapa fatorial gerado a partir da morfometria da asa de <i>R. nasutus</i> , <i>R. prolixus</i> , híbridos de <i>R. prolixus</i> ♀ e <i>R. nasutus</i> ♂ e híbridos de <i>R. nasutus</i> ♀ e <i>R. prolixus</i> ♂.	51
Figura 8 – Adultos de <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i> e híbridos adultos do cruzamento entre <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i> .	51
Figura 9 – Cruzamentos experimentais interespecíficos entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	53
Figura 10 – Híbridos adultos provenientes do cruzamento experimental entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	53
Figura 11 – Gônadas não atrofiadas de híbridos provenientes do cruzamento experimental entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	55
Figura 12 – Metáfases meióticas do cruzamento experimental entre <i>R. montenegrensis</i> ♀ x <i>R. robustus</i> ♂ e <i>R. robustus</i> ♀ e <i>R. montenegrensis</i> ♂.	56
Figura 13 – Mapa fatorial gerado a partir da morfometria da asa de <i>R. montenegrensis</i> ♀ x <i>R. robustus</i> ♂ e <i>R. robustus</i> ♀ e <i>R. montenegrensis</i> ♂.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae.	12
Tabela 2 – Cruzamentos experimentais realizados.	22
Tabela 3 – Cruzamentos experimentais realizados entre <i>R. nasutus</i> e <i>R. prolixus</i>	47
Tabela 4 – Cruzamentos experimentais realizados entre <i>R. montenegrensis</i> e <i>R. robustus</i> .	54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Delineamento do estudo.....	21
3.2	Cruzamentos Experimentais.....	23
3.3	Análises Citogenéticas	23
3.4	Análises Morfológicas.....	24
3.4.1	Caracterização Fenotípica.....	24
3.4.2	Morfometria Geométrica	24
3.4.3	Morfologia Interna.....	26
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Artigo a ser submetido para a revista Infection, Genetics and Evolution.....	27
4.2	Artigo a ser submetido para a revista Plos One.....	33
4.3	Resultados em forma de apresentação	47
4.3.1	Cruzamentos experimentais no gênero <i>Rhodnius</i>	47
4.3.1.1	<i>R. nasutus</i> x <i>R. prolixus</i>	47
4.3.1.2	<i>R. montenegrensis</i> x <i>R. robustus</i>	53
5	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Os triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) são insetos hematófagos de grande importância epidemiológica, pois são considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), agente etiológico da doença de Chagas (WHO, 2018). Essa doença é negligenciada, não tem cura na fase crônica, atinge cerca de oito milhões de pessoas e coloca em risco de infecção, aproximadamente, 25 milhões de pessoas no mundo, sendo o tratamento com os anti-tripanosomatídeos (Benznidazol e Nifurtimox) efetivos apenas na fase aguda da doença (que, na maioria dos casos, é assintomática) (WHO, 2018). Dessa forma, o controle das populações de vetores é considerado como a principal forma de minimizar a incidência de novos casos chagásicos, sendo os estudos relacionados com os triatomíneos de extrema importância para a saúde pública, uma vez que podem gerar subsídios para auxiliar os programas de controle de vetores na profilaxia da doença de Chagas.

Além da importância vetorial, esses hemípteros são modelos biológicos clássicos para estudos celulares (CARVALHO e RECCO-PIMENTEL, 2013) e contribuíram, substancialmente, para o conhecimento da fisiologia (WIGGLESWORTH, 1931) e evolução (GAUNT e MILES, 2002) dos insetos. Diante dos aspectos evolutivos, embora o conceito biológico de espécie apresentado por Mayr (1963) e Dobzhansky (1935) prediz que “espécies são grupos de populações naturais que se inter cruzam real ou potencialmente e que são isoladas reprodutivamente de outros grupos (produzindo qualquer incompatibilidade com os parentais, ou esterilidade dos híbridos, ou ambos)”, são inúmeros os casos de formação de híbridos interespecíficos na literatura (CHUNCO, 2014). Para os insetos vetores da doença de Chagas, por exemplo, diversos casos de hibridação natural e/ou experimental foram observados (Tabela 1) (MAZZOTTI e OSÓRIO, 1941, 1942; USINGER, 1944, 1966; ABALOS, 1948; RYCKMAN, 1962; CORRÊA e ESPÍNOLA, 1964; UESHIMA, 1966; ESPÍNOLA, 1971; CARVALHEIRO e BARRETTO, 1976; FRANCA-RODRÍGUEZ et al., 1979; GALÍNDEZ et al., 1994, PÉREZ et al 2005; SCHEREIBER et al., 1974; CERQUEIRA, 1982; HEITZMANN-FONTENELLE, 1984; COSTA et al., 2003; MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2008, 2011, 2016a,b; CORREIA et al., 2013; DÍAZ et al., 2014; MENDONÇA et al., 2014, 2016; CAMPOS-SOTO et al., 2016).

Tabela 1. Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae.

(continua)

Cruzamentos experimentais					Resultados
<i>Triatoma hegneri</i>	x	<i>Triatoma dimidiata</i>			Inférteis
<i>Triatoma hegneri</i>	x	<i>Triatoma dimidiata</i>			Férteis
♂ <i>Meccus picturatus</i>	x	<i>Meccus pallidipennis</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus pallidipennis</i>	x	<i>Meccus picturatus</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus picturatus</i>	x	<i>Meccus mazzottii</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus mazzottii</i>	x	<i>Meccus picturatus</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus picturatus</i>	x	<i>Meccus phyllosomus</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus phyllosomus</i>	x	<i>Meccus picturatus</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus phyllosomus</i>	x	<i>Meccus pallidipennis</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus pallidipennis</i>	x	<i>Meccus phyllosomus</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus mazzottii</i>	x	<i>Meccus longipennis</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus longipennis</i>	x	<i>Meccus mazzottii</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Meccus mazzottii</i>	x	<i>Meccus pallidipennis</i>	♀		F1
♂ <i>Meccus pallidipennis</i>	x	<i>Meccus mazzottii</i>	♀		F1
♂ <i>Meccus mazzottii</i>	x	<i>Meccus bassolsae</i>	♀		F1
♂ <i>Meccus bassolsae</i>	x	<i>Meccus mazzottii</i>	♀		F1
♂ <i>Meccus longipennis</i>	x	<i>Meccus picturatus</i>	♀		F1
♂ <i>Meccus picturatus</i>	x	<i>Meccus longipennis</i>	♀		F1
♂ <i>Triatoma platensis</i>	x	<i>Triatoma delpontei</i>	♀		F1 e F2
♂ <i>Triatoma delpontei</i>	x	<i>Triatoma platensis</i>	♀		Inférteis
♂ <i>Triatoma platensis</i>	x	<i>Triatoma infestans</i>	♀		F1 e F2

(continuação)

♂	<i>Triatoma infestans</i>	x	<i>Triatoma platensis</i>	♀	F2 e F2
♂	<i>Triatoma infestans</i>	x	<i>Triatoma rubrovaria</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma rubrovaria</i>	x	<i>Triatoma infestans</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma sinaloensis</i>	x	<i>Triatoma peninsularis</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma sinaloensis</i>	x	<i>Triatoma protracta</i>	♀	F1
	<i>Triatoma protracta</i>	x	<i>Triatoma barberi</i>		F1 e F2
	<i>Triatoma barberi</i>	x	<i>Triatoma rubida</i>		F1 (N5)
	<i>Triatoma maculata</i>	x	<i>Triatoma sórdida</i>		F1
	<i>Triatoma maculata</i>	x	<i>Triatoma infestans</i>		F1
	<i>Triatoma maculata</i>	x	<i>Triatoma brasiliensis</i>		F1
	<i>Triatoma maculata</i>	x	<i>Triatoma pseudomaculata</i>		F1 (híbridos inférteis)
♂	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	x	<i>Triatoma maculata</i>	♀	F1 (híbridos inférteis)
♂	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	x	<i>Triatoma sordida</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma pseudomaculata</i>	x	<i>Triatoma infestans</i>	♀	F1
	<i>Triatoma brasiliensis</i>	x	<i>Triatoma petrochiae</i>		F1 (1 ninfa de 1º instar)
♂	<i>Triatoma bahiensis</i>	x	<i>Triatoma lenti</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma lenti</i>	x	<i>Triatoma bahiensis</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma lenti</i>	x	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1 e F2
♂	<i>Triatoma sherlocki</i>	x	<i>Triatoma lenti</i>	♀	F1 e F2
	<i>Rhodnius prolixus</i>	x	<i>Rhodnius neglectus</i>		F1

(continuação)

<i>Rhodnius prolixus</i>	x	<i>Rhodnius robustus</i>		F2
<i>Rhodnius prolixus</i>	x	<i>Rhodnius pictipes</i>		F1 (N3)
♂ <i>Rhodnius pallescens</i>	x	<i>Rhodnius colombiensis</i>	♀	F1
♂ <i>Rhodnius colombiensis</i>	x	<i>Rhodnius pallescens</i>	♀	inférteis
♂ <i>Triatoma brasiliensis</i>	x	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2 (2 indivíduos)
♂ <i>Triatoma melanica</i>	x	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma brasiliensis</i>	x	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma b. macromelasoma</i>	x	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma brasiliensis</i>	x	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma juazeirensis</i>	x	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma b. macromelasoma</i>	x	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma melanica</i>	x	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma melanica</i>	x	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma juazeirensis</i>	x	<i>Triatoma melanica</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma b. macromelasoma</i>	x	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma juazeirensis</i>	x	<i>Triatoma b. macromelasoma</i>	♀	F1 e F2
♂ <i>Triatoma sherlocki</i>	x	<i>Triatoma juazeirensis</i>	♀	F1
♂ <i>Triatoma juazeirensis</i>	x	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1

(conclusão)

♂	<i>Triatoma sherlocki</i>	x	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	x	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1
♂	<i>Triatoma melanica</i>	x	<i>Triatoma sherlocki</i>	♀	F1

Fonte: Elaborado pelo autor.

A realização de cruzamentos experimentais e a análise dos híbridos são importantes ferramentas para a taxonomia dos triatomíneos. Por exemplo, o *status* específico de espécies agrupadas no complexo *Triatoma brasiliensis* (COSTA et al., 2003, 2009; CORREIA et al., 2013; MENDONÇA et al., 2014, 2016), assim como no complexo *Meccus phyllosoma* (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2008, 2011) e no complexo *T. dimidiata* (GARCÍA et al., 2013) foi corroborado por meio de cruzamentos experimentais. Classificar corretamente esses vetores permite que espécies de importância primária (geralmente associadas a regiões domiciliares) e secundária (geralmente silvestres) para a transmissão do *T. cruzi* sejam diferenciadas (DIAS e SCHOFIELD, 1998), o que pode direcionar as atividades dos programas de controle de vetores. Como exemplo, pode-se destacar a importância dessa metodologia para ressaltar o *status* específico de *T. petrocchiae* Pinto & Barretto, 1925 (ESPÍNOLA, 1971), pois, por muito tempo, essa espécie foi considerada como sinônima de *T. brasiliensis* (LUCENA, 1970). No entanto, do ponto de vista epidemiológico, enquanto *T. petrocchiae* é considerada, até o momento, silvestre e sem importância vetorial, *T. brasiliensis* é a principal espécie vetora da doença de Chagas no Nordeste brasileiro (GALVÃO, 2014).

No entanto, a maioria dos estudos relacionados com a análise da viabilidade dos híbridos de triatomíneos analisa os cruzamentos até a primeira geração (F1) ou, no máximo, a segunda geração (F2), com ênfase, principalmente, na produção ou não de híbridos entre as espécies parentais. Embora essas análises apresentem grande valor científico, principalmente para os cruzamentos resultantes em ovos inférteis (barreira de isolamento reprodutivo pré-zigótico) ou F1 e F2 inviáveis (barreira pós-zigótica), consideramos que cessar os cruzamentos em F1 ou F2 possa ser o principal fator relacionado com os triatomíneos não se adequarem ao conceito biológico de espécie proposto por Mayr (1963), pois existem diversos fatores relacionados com isolamento reprodutivo pós-zigótico que podem inviabilizar os híbridos a partir da F1 [como, por exemplo, o desmoronamento do híbrido, descrito

recentemente na subfamília Triatominae (MENDONÇA et al., 2014)] e, dessa forma, corroborar o conceito de espécie. Assim, sugerimos a necessidade de avaliar a viabilidade híbrida até, pelo menos, a terceira geração (F3) [conforme também sugerido por Mayr (1963)], sobretudo com uma abordagem multidisciplinar, assim como Mendonça et al. (2014) fizeram para o cruzamento experimental entre *T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967 e *T. sherlocki* Papa et al. (2012).

Os mecanismos de isolamento reprodutivo são agrupados, principalmente, em pré e pós-zigóticos (DOBZHANSKY, 1935; MAYR, 1963). Na subfamília Triatominae, os principais eventos relatados, até o momento, foram:

a) Isolamento ecológico (barreira pré-zigótica)

Como exemplo clássico para esse tipo de isolamento reprodutivo, podemos utilizar *T. infestans* e *T. platensis* Neiva, 1913 que são espécies que derivaram de um ancestral comum (JUSTI et al., 2014), mas apresentam hábitos diferentes, a saber, *T. infestans* está associado a regiões domiciliares e se alimenta de sangue de mamíferos (GALVÃO, 2014) e *T. platensis* está associada com ninhos de aves e se alimenta, preferencialmente, do sangue desses vertebrados (ABALOS e WYGODZINSKY, 1951). O único elo que permite a relação entre essas espécies são os galinheiros (ABALOS, 1948; BARRETTO, 1976).

b) Isolamento mecânico (barreira pré-zigótica)

Na subfamília Triatominae, o isolamento mecânico está associado com a incompatibilidade das genitálias e acontece com certa frequência em apenas uma direção dos cruzamentos, como ocorre no cruzamento entre fêmea de *T. platensis* com machos de *T. delpontei* Romãña & Abalos, 1947 (USINGER et al., 1966). Abalos (1948) sugere que, possivelmente, o tamanho da genitália masculina de *T. delpontei* possa estar relacionado com a incompatibilidade na cópula

c) Isolamento gamético (barreira pré-zigótica)

Embora nunca analisado entre os triatomíneos, esse tipo de isolamento pré-zigótico pode ser o mecanismo que inviabiliza a produção de híbridos em diversos cruzamentos experimentais, como, por exemplo, entre *T. lenti* e *T. infestans* (CERQUEIRA, 1982) e entre

T. brasiliensis e *T. petrocchiaie* (ESPÍNOLA, 1971), pois, equivocadamente, quando os cruzamentos não resultam em híbridos (mesmo que em apenas uma das direções), é sugerido que a incompatibilidade das genitálias tenha ocorrido entre os parentais, sem que a morfologia dos gametas ou, até mesmo, das genitálias seja analisada.

d) Inviabilidade do híbrido (barreira pós-zigótica)

Embora os mecanismos pré-zigóticos não tenham inviabilizado a produção de híbridos, nesse tipo de isolamento os híbridos que eclodem dos ovos têm viabilidade extremamente reduzida (baixo valor adaptativo), não chegando até a fase adulta da F1. Esse fenômeno evolutivo pode ser representado pelo cruzamento entre *T. mexicana* (Herrich-Schaeffer, 1848) e as seis espécies de *Meccus* spp. (MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2011). Essa inviabilidade dos híbridos apresentada para o cruzamento entre espécies de gêneros diferentes é extremamente importante do ponto de vista taxonômico, pois ressalta o *status* de cada gênero [o gênero *Meccus*, por exemplo, por muito tempo, foi considerado como *Triatoma* (PINTO, 1927; HYPSE et al., 2002)].

e) Esterilidade do híbrido (barreira pós-zigótica)

Nesse caso, os híbridos em F1 chegam até a fase adulta, mas são incapazes de produzir F2, pois são estéreis (disgenesia gonadal) ou produzem gametas inviáveis resultantes de anomalias cromossômicas durante a espermatogênese, como acontece, por exemplo, para os híbridos resultantes entre o cruzamento experimental entre *T. infestans* e *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843), que apresentam ausência de pareamento ou pareamento trivalente entre os cromossomos homeólogos (PÉREZ et al., 2005), assim como para os híbridos do cruzamento entre *T. sordida* e *T. pseudomaculata* (SCHREIBER et al., 1975), que apresentaram espermátides e espermatozoides gigantes e anômalos.

f) Desmoronamento do híbrido (barreira pós-zigótica)

Esse tipo de isolamento pós-zigótico foi recentemente descrito para os triatomíneos e está relacionado com a inviabilidade híbrida a partir da F2, ressaltando a importância das análises da viabilidade híbrida até, pelo menos, a F3 antes de sugerir eventos de

sinonimização entre espécies de triatomíneos que não apresentaram isolamento reprodutivo. Mendonça et al. (2014) analisaram a espermatogênese de híbridos em F1 (resultantes do cruzamento experimental entre *T. lenti* e *T. sherlocki*) e observaram 100% de pareamento entre os cromossomos homeólogos. No entanto, quando os autores analisaram o grau de pareamentos em F2, observaram erros nos pareamentos de diversos cromossomos (univalentes), por incompatibilidade genética, o que resulta em gametas inviáveis (fenômeno confirmado pela taxa de eclosão dos ovos que resultariam em F3).

A tribo Rhodniini é um grupo monofilético composto por 23 espécies agrupadas nos gêneros *Rhodnius* (20 espécies) e *Psammolestes* (três espécies) (GALVÃO, 2014, SOUZA et al., 2016a; ROSA et al., 2017, POINAR, 2019, NASCIMENTO et al., 2019). Híbridos naturais já foram relatados para essa tribo, especificamente no gênero *Rhodnius* (DIAS et al., 2014). Cruzamentos experimentais, bem como as análises dos híbridos na tribo Rhodniini foram restritos aos cruzamentos entre *R. prolixus* x *R. neglectus*, *R. prolixus* x *R. robustus*, *R. prolixus* x *R. pictipes* (GALÍNDEZ et al., 1994), assim como entre *R. pallescens* x *R. colombiensis* (DÍAZ et al., 2014). Os três primeiros cruzamentos avaliaram apenas a viabilidade dos híbridos (GALÍNDEZ et al., 1994). O cruzamento entre *R. pallescens* fêmeas x *R. colombiensis* machos não produziu híbridos e o cruzamento entre *R. pallescens* machos x *R. colombiensis* fêmeas produziu F1 (DÍAZ et al., 2014). O grau de pareamento entre os cromossomos homeólogos foi analisado nos machos em F1 desse cruzamento e ausência de pareamento entre vários cromossomos foi relatada (diversos cromossomos monovalentes nas metáfases), que resultam em gametas inviáveis para os híbridos (esterilidade do híbrido).

Considerando que os estudos dos cruzamentos experimentais e dos híbridos resultantes podem ajudar a compreender a sistemática deste grupo de vetores, podem ser usados para analisar os mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico entre as diferentes espécies, assim como podem ser empregados para o estabelecimento do papel da hibridação natural na geração de novas variantes, que por sua vez, podem levar à evolução adaptativa e/ou na fundação de novas linhagens evolutivas (PÉREZ, 2005), o presente projeto teve como objetivo realizar uma análise multidisciplinar e integrada de aspectos evolutivos (barreiras reprodutivas pré e pós-zigóticas) e taxonômicos na tribo Rhodniini, por meio de cruzamentos experimentais interespecíficos e análise dos híbridos até, pelo menos, a terceira geração (F3).

5 CONCLUSÃO

Os cruzamentos híbridos se mostraram como importantes ferramentas taxonômicas e também auxiliaram no entendimento das questões evolutivas. Foi possível observar que possivelmente os gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes* estão isolados reprodutivamente por barreiras pré-zigóticas, corroborando o *status* genérico de *Psammolestes*. Além disso, nossos resultados permitiram ressaltar o *status* específico de *P. tertius* e *P. coreodes*, pois embora híbridos em primeira geração (F1) eclodiram, barreiras pós-zigóticas de inviabilidade do híbrido e quebra do híbrido foram relatadas. Por sua vez, o *status* específico de *R. nasutus* e *R. prolixus* foi confirmado pelos fenômenos de inviabilidade e esterilidade dos híbridos e o *status* de *R. montenegrensis* por eventos de inviabilidade do híbrido em F1, esterilidade do híbrido para F2 proveniente do cruzamento inicial entre *R. montenegrensis* ♀ x *R. robustus* ♂ e indicação de possível desmoronamento do híbrido atuando em F2 e F3.

REFERÊNCIAS

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. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v.108, p. 92-99, 2013.

ABALOS, J.W. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. **Anais do Instituto Regional**, v.2, p. 209-223, 1948.

ABALOS, J.W.; WYGODZINSKY, P. Las Triatominae argentinas. **Monographia Anais do Instituto Regional**, v. 1, p. 1-178, 1951.

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

ALMEIDA, L.M.; CARARETO, C.M.A. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). **Ilheringia**, v. 92, p.71-79, 2002.

BARRETTO, M.P. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 6, p. 339-353, 1976.

BELISÁRIO, C.J.; D'ÁVILA-PESSOA, G.C.; DIOTAIUTI, L. Biological aspects of crosses between *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 517-521, 2007.

CAMPOS-SOTO, R.; PANZERA, F.; PITA, S.; LAGES, C.; SOLARI, A.; BOTTO-MAHAN, C. Experimental crosses between *Mepraia gajardoi* and *M. spinolai* and hybrid chromosome analyses reveal the occurrence of several isolation mechanisms. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, p. 205-212, 2016.

CARVALHEIRO, J.R.; BARRETTO, M.P. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LX – tentativas de cruzamento de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 com *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** v. 18, p. 17-23, 1976.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula**. São Paulo: Manole, 2013.

CERQUEIRA, R.L. **Estudos sobre populações de triatomíneos silvestres encontrado em Santo Inácio – Bahia**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 68p, 1982.

CHUNCO, A.J. Hybridization in a warmer world. **Ecology Evolution**, v. 4, p. 2019-2031, 2014.

CORRÊA, R.R.; ESPÍNOLA, H. Descrição de *Triatoma maculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral, Ceará (Hemiptera, Reduviidae). **Arquivos de Higiene e Saúde Pública**, v. 29, p. 115-127, 1964.

CORREIA, N.; ALMEIDA, C.E.; LIMA-NEIVA, V.; GUMIEL, M.; LIMA, M.M.; MEDEIROS, L.M.O.; MENDONÇA, V.J.; ROSA, J.A.; COSTA, J. Crossing experiments confirm *T. sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. **Acta Tropica**, v. 128, p.162-167, 2013.

COSTA, J.; ALMEIDA, C.E.; DUJARDIN, J.P.; BEARD, C.B. Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 637-639, 2003.

COSTA, J.; PETERSON, A.T.; DUJARDIN, J.P. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 263-270, 2009.

DE VAIO, E.S.; GRUCCI, B.; CASTAGNINO, A.M.; FRANCA, M.E.; MARTINEZ ME. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). **Genetica**, v. 67, p. 185-191, 1985.

DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, p. 373-383, 1998.

DIAS, F.B.S.; JARAMILLO, N.; DIOTAJUTI L. Description and characterization of the melanic morphotype of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 637–41, 2014.

DÍAZ, S.; PANZERA, F.; JARAMILLO, O. N.; PÉREZ, R.; FERNÁNDEZ, R.; VALLEJO, G.; SALDAÑA, A.; CALZADA, J.E.; TRIANA, O.; GÓMEZ-PALÁCIO, A. Genetic, Cytogenetic and Morphological Trends in the Evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) Trans-Andean Group. **PLoS ONE**, v. 9, p. e87493, 2014.

DOBZHANSKY, T. A critique of the species concept in biology. **Philosophy of Science**, v. 2, p. 344-355, 1935.

ESPÍNOLA, H.N. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto & Barretto, 1925 (Hemiptera Reduviidae). **Revista Brasileira de Bioliologia**, v. 31, p. 277-281, 1971.

FRANCA-RODRÍGUEZ, M.E.; YONG, D.G.; LOZANO, M. Estudio sobre los descendientes entre *Triatoma infestans* (Klug, 1834) y *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843, (Hemiptera, Reduviidae). **Revista de Biología do Uruguay**, v. 7, p. 101-115, 1979.

GALÍNDEZ, G.I.; BARAZARTE, R.; MÁRQUEZ, J.; OVIEDO, M.; MÁRQUEZ, Y.; MORÓN, L.; CARCAVALLO, R.U. Relaciones reproductivas entre *Rhodnius prolixus* Stal y *Rhodnius robustus* Larrousse (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. **Entomología y Vectores**, v. 1, p. 3-13, 1994.

GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: **Sociedade Brasileira de Zoologia**, 2014.

GARCÍA, M.; MENES, M.; DORN, P.L.; MONROY, C.; RICHARDS, B.; PANZERA, F.; BUSTAMANTE, D.M. Reproductive isolation revealed in preliminary crossbreeding experiments using field collected *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from three ITS-2 defined groups. **Acta Tropica**, v. 128, p. 714–718, 2013.

GAUNT, E.; MILES, M.A. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. **Molecular Biology Evolution**, v. 19, p. 748-61, 2002.

HEITZMANN-FONTENELLE, T. Bionomia comparativa de triatomíneos. VI - Híbridos de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 x *Triatoma lenti*, Sherlocki & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 47, p. 175-181, 1984.

HYPSE, V.; TIETZ, D.; ZRZAVY, J.; REGO, R.O.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the asiatic clade. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 23, p. 447-457, 2002.

JUSTI, S.A.; RUSSO, C.A.M.; DOS SANTOS-MALLET, J.R.; OBARA, M.T; GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, p.149, 2014.

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

LENT, H.; WIGODZINSKY, P. Revision of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 163, p. 520, 1979.

LUCENA, D.T. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 22, p. 3-173, 1970.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A., VENTURA-RODRÍGUEZ, L.V.; MEILLON-ISAIS, K.; BARAJAS-MARTÍNEZ, H.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; LUPERCIOCORONEL, P.; ROCHA-CHÁVEZ, G.; NOGUEDA-TORRES, B. Biological and genetic aspects of experimental hybrids from species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 236-243, 2008.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; GRANT-GUILLÉN, Y.; DELGADILLO-ACEVES, I.N.; ZUMAYA-ESTRADA, F.A.; ROCHA-CHÁVEZ, G.; SALAZARSCETTINO, P.M.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; VILLALOBOS, G.; NOGUEDA-TORRES, B. Biological and

genetic aspects of crosses between phylogenetically close species of Mexican Triatomines (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, p. 705-707, 2011.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; NOGUEDA-TORRES, B.; GARCÍA-LIN, J.C.; ARROYO-REYS, D.; SALAZAR-MONTAÑO, L.F.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, J.A.; DÍAZ-SNCHES, C.G.; TORO-ARREOLA, E.S.; ROCHA-CHÁVEZ, G. Importance of Hybrids of *Meccus phyllosomus mazzottii*, and *M. p. pallidipennis*, and *M. p. phyllosomus* to the Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Mexico. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 69, p. 202-6, 2016b.

MARTÍNEZ-IBARRA, J.A.; NOGUEDA-TORRES, B.; SALAZAR-SCHETTINO, P.M.; CABRERA-BRAVO, M.; VENCES-BLANCO, M.O.; ROCHA-CHAVEZ, G. Transmission Capacity of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) by Three Subspecies of *Meccus phyllosomus* (Heteroptera: Reduviidae) and Their Hybrids. **Medical and Veterinary Entomological**, v. 53, p. 928-934, 2016a.

MAZZOTTI, L.; OSORIO, M.T. Resultados obtenidos en cruzamientos con especies diferentes de *Triatoma*. **Revista da Faculdade de Bogotá**, v. 10, p. 159-160, 1941.

MAZZOTTI, L.; OSORIO, M.T. Cruzamientos experimentales entre varias especies de triatomas. **Medicina**, v. 22, p. 215-222, 1942.

MAYR, E. Animal Species and Evolution. **Harvard University Press**, Cambridge, 1963.

MENDONÇA, V.J.; ALEVI, K.C.C.; MEDEIROS, L.M.O.; NASCIMENTO, J.D.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 26, p. 123-131, 2014.

MENDONÇA, V.J.; ALEVI, K.C.C.; PINOTTI, H.; GURGEL-GONGALVES, R.; PITA, S.; GUERRA, A.L.; PANZERA, F.; ARAÚJO, R.F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. **Zootaxa**, v. 4107, p. 239-254, 2016.

MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J.; BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **The American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 62, p. 460-465, 2000.

NASCIMENTO, J.D.; ROSA, J.A.; SALGADO-ROSA, F.C.; HERNÁNDEZ, C.; PARDO-DIAZ, C.; ALVEI, K.C.C.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, J.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; SALAZAR, C.; RAMIRES, J.D. Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species? **Plos One**, v. 14, p.2, 2019.

OLIVEIRA, J. **Estudo morfológico, morfométrico e molecular de espécies do complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR/UNESP), 80p, 2015.

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

PINTO, C. Classification de genres d'hémiptères de la famille Triatomidae (Reduviidae). **Boletim Biológico**, v. 8, p. 103-114, 1927.

POINAR, G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. **Cretaceous Research**, v. 93, p. 90-97, 2019.

RAVAZI, A.; ALEVI, K. C.C.; OLIVEIRA, J.; ROSA, J.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Cytogenetic analysis in different populations of *Rhodnius prolixus* and *R. nasutus* from different countries of South America. **Brazilian Journal of Biology**, v. 1, p.1, 2017.

ROHLF, F.J. tpsDig, Version 1.27. **Ecology and Evolution**, State University of New York, New York, 2011.

ROSA, J.A.; BARATA, J.M.S.; BARELLI, N.; SANTOS, J.L.F.; BELDA-NETO, F.M. Sexual distinction between 5th instar nymphs of six species (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 257-264, 1922.

ROSA, J.A.; ROCHA, C.S.; GARDIM, S.; PINTO, M.C.; MENDONÇA, V.J.; FERREIRA-FILHO, J.C.R.; CARVALHO, E.O.C.; CAMARGO, L.M.A.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J.D.; CILENSE, M.; ALMEIDA, C.E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3478, p. 62-76, 2012.

ROSA, J.A.; JUSTINO, H.H.G.; NASCIMENTO, J.D.; MENDONÇA, V.J.; ROCHA, C.S.; CARVALHO, D.B.; FALCONE, R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ALEVI, K.C.C.; OLIVEIRA, J. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, v. 625, p. 1-25, 2017.

RYCKMAN, R.E. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North América (Hemiptera: Reduviidae) (Rodentia: Cricetidae). *Univ Calif Publ Entomol*, v. 27, p. 93-240, 1962.

SCHREIBER, G.; PELLEGRINO, J. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici). **Scienza Genetica**, vol. 3, p. 215-226, 1950.

SCHEREIBER, G.; PINHO, A.C.; PARENTONI, R.; SALGADO, A.A.; GODOI-JR, T.L. Cytogenetics of Triatominae: II Spermatogenesis in hybrid between *Triatoma infestans* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 31, p. 1-9, 1974.

SOUZA, E.S.; ATZINGER, N.C.B.V.; FURTADO, M.B.; OLIVEIRA, J.; DAMIELI, J.N.; VENDRAMINI, D.P.; GARDIM, S.; ROSA, J.A. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. N. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Pará State, Brazil. *Zookeys*, 621: 45-62, 2016a.

SOUZA, R.C.M.; CAMPOLINA-SILVA, G.H.; BEZERRA, C.M.; DIOTAIUTI, L.; GORLA, D.E. Does *Triatoma brasiliensis* occupy the same environmental niche space as *Triatoma melanica*? **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 3-61, 2016b.

USINGER, R.L. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their Public Health Significance. **Public Health Bulletin**, 1944.

USINGER, R.L.; WYGODZINSKY, P.; RYCKMAN, E.R. The Biosystematics of Triatominae. **Annual Review of Entomology**, v. 11, p. 309-329, 1966.

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

WHO - World Health Organization. **Chagas Diseases American Trypanosomiasis**. Disponível em: < <http://www.who.int/chagas/en/>>. Acesso em: 30/11/2018, 2018.

WIGGLESWORTH, V.B. The physiology of excretion in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). I Composition of the urine. **Journal of Experimental Biology**, v. 8, p. 411-451, 1931.