

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 27/08/2022



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

Fernanda Fernandez Madeira

Microevolução de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)

São José do Rio Preto
2021

Fernanda Fernandez Madeira

Microevolução de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, 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.

Financiadora: CAPES

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

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Ana Letícia Guerra

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

São José do Rio Preto
2021

M181m Madeira, Fernanda Fernandez
Microevolução de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)
/Fernanda Fernandez Madeira. -- São José do Rio Preto, 2021
180 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientadora: Maria Tercília Vilela Azeredo Oliveira
Coorientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

1. *Triatoma sordida*. 2. Especiação Críptica. 3. Genética de populações. 4.
Cruzamentos experimentais. 5. Taxonomia integrativa. 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.

Fernanda Fernandez Madeira

Microevolução de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae)

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências, 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.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

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

Prof^a. Dr^a. Lilian Castiglioni
FAMERP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luís Lênin Vicente Pereira
UNIJALES - Jales

Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti
UFAC – Câmpus de Rio Branco

Prof. Dr. Carlos Eduardo Almeida
UFBA – Câmpus de Ondina

São José do Rio Preto
27 de agosto de 2021

Dedico o presente trabalho aos meus pais Sheila e Francisco, à minha vó Nadyr, e ao meu marido Renan. Aos meus pais, por tenho o privilégio de ainda tê-los em minha vida após uma breve, mas dura batalha contra a COVID-19. À minha vó, por sempre ter tido orgulho dos vários anos que passei em uma universidade estadual. E ao meu marido, por sempre me apoiar em cada decisão, por comemorar cada pequeno passo, cada artigo científico publicado, e por sempre se interessar por tudo que eu tento explicar sobre o que foi esse trabalho de doutorado. Cada vitória que eu conquisto na vida é graças a todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas oportunidades concedidas nesta encarnação. Obrigada pelos Teus planos para a minha vida sempre serem maiores do que os meus sonhos!

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, pelo acolhimento, conhecimentos compartilhados e por todas as oportunidades de crescer em minha vida acadêmica. Agradeço pela confiança de sempre e por toda a colaboração envolvida na realização desse trabalho.

Aos meus preciosos co-orientadores, Dr^a. Ana Letícia Guerra e Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, por toda orientação e auxílio prestados. À Ana Letícia, querida amiga, que me introduziu ao mundo molecular dos triatomíneos e por ser a grande responsável pelo meu conhecimento no assunto. E, principalmente, ao Kaio, um pesquisador impecável e brilhante, que sempre me ajudou de todas as formas possíveis ao longo da minha trajetória acadêmica desde que entrei no laboratório. Você é uma inspiração para qualquer profissional. A finalização desse trabalho só foi possível graças a vocês.

Aos membros da banca examinadora de defesa, Prof^{ra}. Dr^a. Lilian Castiglioni, Prof. Dr. Luís LÊNIN Vicente Pereira, Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti e Prof. Dr. Carlos Eduardo Almeida, por aceitarem o convite e se disponibilizarem para avaliar, contribuir e enriquecer ainda mais a versão final desse trabalho.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pela recepção carinhosa de sempre e pela disponibilização do Insetário de Triatominae, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) da UNESP – Câmpus de Araraquara, permitindo assim a realização e o acompanhamento dos cruzamentos experimentais. Agradeço também ao querido Prof. Dr. Jader de Oliveira, pelos dias de trabalho leves e descontraídos no insetário e pelos auxílios de toda natureza prestados ao longo do presente trabalho.

Aos integrantes atuais e antigos do Laboratório de Biologia Celular, em especial, agradeço aos queridos colegas Amanda, Ana Beatriz, Ana Letícia, Giovana, Isadora, Luiza, Nathália, Kaio e Yago. Obrigada pela convivência, pelo apoio de toda natureza e pela possibilidade de crescimento pessoal e profissional. Agradeço também à equipe híbridos (Amanda, Bia, Kaio, Jader e Yago), um time composto de pessoas muito especiais e competentes, que sempre trazem muitas risadas, guinchos e momentos de descontração nas viagens para o insetário de Araquara. O trabalho, quando realizado dessa maneira, é tão prazeroso, que não me importaria de continuar cuidando dos cruzamentos experimentais até os 15 anos do Otto. Sem vocês os desafios desse trabalho seriam muito mais difíceis de resolver. Muito obrigada amigos!

Aos meus amigos de graduação e da vida, Denise, Daniele, Jacqueline e Natan, sempre juntos desde o primeiro ano e sempre unidos (e desunidos) em grupos de seminários e trabalhos. Obrigada por tornar essa parte da minha trajetória acadêmica mais leve e significativa. Saibam que, com certeza, vocês foram e continuarão sendo parte importante da minha vida.

Ao IBILCE/UNESP pelo espaço físico, estrutura e todo apoio que proporciona o desenvolvimento de nossas pesquisas. Mais do que isso, agradeço à essa instituição por todas as experiências que pude viver ao longo dos últimos dez anos, e também pela oportunidade de conhecer pessoas incríveis e de construir lembranças muito especiais.

Aos professores do curso de graduação em Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biociências do IBILCE/UNESP, que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação; aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, por todos os serviços e auxílios prestados, pelo profissionalismo e pela paciência de sempre.

*À toda a minha família, pelo carinho e amor incondicional. Aos meus pais, Sheila e Francisco, por serem o motivo de eu querer ser um ser humano melhor a cada dia, por sempre me apoiarem em todas as decisões e por se orgulharem sempre do que me tornei. Aos meus avós paternos Carmina (**in memorian**) e Antônio (**in memorian**), e avós maternos Diego (**in memorian**) e Nadyr. Obrigada a cada um de vocês por tantos momentos e pelos ensinamentos que me proporcionaram a vontade de poder dar o meu melhor, de ser o meu melhor (e mesmo de deixar o melhor na hora do adeus).*

Aos meus “filhos peludinhos”, Meg, Clarinha e Bento, por trazerem a felicidade e o amor mais sincero ao meu cotidiano e por manter a minha sanidade mental.

Ao meu marido Renan. Me falta vocabulário para dizer o quanto eu te amo. Amigo, namorado, marido, pai de shih-tzu e futuro pai dos meus filhos. A cada ano que passa, mais títulos ele acumula. Morro de orgulho da nossa história e de tudo que conquistamos até aqui. Já fizemos muito, temos muito mais ainda a fazer. Ser sua companheira é um privilégio do qual eu nunca quero abrir mão.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse momento e para o meu crescimento profissional e pessoal, o meu mais sincero muito obrigada!

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

“Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas”. (Ayrton Senna)

“O que temos, nós deixamos.

O que somos, nós levamos.”

(Divaldo Pereira Franco)

RESUMO

Triatoma sordida (Stål, 1859) é considerado, atualmente, o vetor da doença de Chagas mais frequentemente capturado no ambiente peridomiciliar no Brasil. Além da sua ampla distribuição geográfica nacional, incluindo 14 estados brasileiros, esta espécie também foi relatada em outros países da América do Sul, como Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. Diversos estudos sinalizam polimorfismos em *T. sordida*, o que levou a sugestão do fenômeno de especiação críptica nessa espécie e, principalmente, a recente caracterização de três possíveis táxons diferentes, a saber, *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida* Argentina e *T. sordida* La Paz. Dessa forma, diante da necessidade de se expandir o conhecimento acerca da questão taxonômica de *T. sordida*, o presente estudo teve como objetivo realizar uma análise integrada de aspectos evolutivos dessa espécie, com ênfase no fenômeno de especiação críptica, por meio da caracterização das populações brasileiras por parâmetros moleculares e citogenéticos, além de análises envolvendo sistemática filogenética, taxonomia integrativa e a realização de cruzamentos experimentais intraespecíficos entre exemplares de *T. sordida* do Brasil, Argentina e Bolívia. Por meio das análises envolvendo marcadores citogenéticos e moleculares, foi verificada a baixa diversidade genética das populações brasileiras de *T. sordida*, evidenciada pelos seguintes fatores: mesmo padrão de bandamento C e CMA3/DAPI, baixa diversidade nucleotídica, alta diversidade haplotípica, baixa distância genética entre todas as localidades analisadas, alto valor do índice F_{st} , e a formação de um clado monofilético das populações brasileiras amostradas e separado de espécimes da Argentina, suportando que todos os espécimes brasileiros podem ser agrupados como *T. sordida sensu stricto*. Com base nas análises de taxonomia integrativa (análises morfológicas, morfométricas, moleculares e cruzamentos experimentais), também demonstramos que o citótipo *T. sordida* da Argentina é uma nova espécie, confirmando o *status* específico de *T. rosai* sp. nov. Além disso, baseando-se na baixa distância genética entre *T. sordida sensu stricto* e *T. sordida* La Paz, associada à ausência de barreiras reprodutivas pré-zigóticas e pós-zigóticas, ausência de disgenesia gonadal e de erros de pareamentos cromossômicos dos híbridos F1 e F2 resultantes, sugerimos que o citótipo *T. sordida* La Paz representa apenas um polimorfismo cromossômico de *T. sordida sensu stricto*.

Palavras-chave: *Triatoma sordida*. Especiação críptica. Genética de populações. Cruzamentos experimentais. Taxonomia integrativa.

ABSTRACT

Triatoma sordida (Stål, 1859) is currently considered the vector of Chagas disease most frequently captured in peridomestic environment in Brazil. In addition to its wide national geographic distribution, including 14 Brazilian states, this species has also been reported in other countries in South America, such as Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay. Several studies indicate polymorphisms in *T. sordida*, which led to the suggestion of the phenomenon of cryptic speciation in this species and, mainly, the recent characterization of three possible different taxa, namely, *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida Argentina* and *T. sordida La Paz*. Thus, in view of the need to expand knowledge about the taxonomic issue of *T. sordida*, the present study aimed to carry out an integrated analysis of evolutionary aspects of this species, with emphasis on the phenomenon of cryptic speciation, through the characterization of Brazilian populations by molecular and cytogenetic parameters, in addition to analyzes involving phylogenetic systematics, integrative taxonomy and the performance of intraspecific experimental crosses between specimens of *T. sordida* from Brazil, Argentina and Bolivia. Through analyzes involving cytogenetic and molecular markers, the low genetic diversity of the Brazilian populations of *T. sordida* was verified, evidenced by the following factors: same pattern of C- and CMA3/DAPI-banding, low nucleotide diversity, high haplotypic diversity, low genetic distance between all the locations analysed, high value of the F_{st} index, and the formation of a monophyletic clade of the Brazilian populations sampled and separated from specimens from Argentina. Therefore, we support that all Brazilian specimens can be grouped as *T. sordida sensu stricto*. Based on integrative taxonomy analyzes (morphological, morphometric, molecular analyzes and experimental crosses), we also demonstrated that the cytotype *T. sordida* from Argentina is a new species, confirming the specific status of *T. rosai* sp. nov. Furthermore, based on the low genetic distance between *T. sordida sensu stricto* and *T. sordida* La Paz, associated with the absence of pre-zygotic and post-zygotic reproductive barriers, absence of gonadal dysgenesis and of chromosomal pairing errors of the F1 and F2 resulting, we suggest that the cytotype *T. sordida* La Paz represents only a chromosomal polymorphism of *T. sordida sensu stricto*.

Keywords: *Triatoma sordida*. Cryptic speciation. Population genetics. Experimental crosses. Integrative taxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida da espécie <i>T. carrioni</i>	31
Figura 2. Exemplo de triatomíneo (<i>Triatoma sordida</i>) defecando (A, seta) e urinando (B, seta) durante o repasto sanguíneo.	31
Figura 3. Holótipo de <i>Triatoma sordida</i> descrito por Stål, em 1859, e depositado no Zoologisches Museum, Berlim, Alemanha.	33
Figura 4. Espécime de <i>Triatoma sordida</i> e sua disposição geográfica no Brasil.	33
Figura 5. Ocupação espacial e nicho ecológico das espécies <i>T. sordida</i> e <i>T. infestans</i>	35
Figura 6. Padrão de heterocromatina (A, C e E) e marcação das sondas DNAr 45S (B, D e F - setas) em <i>T. sordida sensu stricto</i> (A, B), <i>T. sordida</i> Argentina (C, D) e <i>T. sordida</i> La Paz (E, F).	37
Figura 7. Árvore filogenética obtida por Máxima Verossimilhança dos citótipos de <i>T. sordida</i> , com base no gene mitocondrial COI.	37
Figura 8. Esquema do complexo gênico nuclear de DNA ribossomal, com os genes das subunidades do DNAr 18S, 28S e 5.8S, além dos espaços internos transcritos (ITS-1 e ITS-2).	41
Figura 9. Morfologia geral de um barbeiro, com pronoto e escutelo em detalhes.	63
Figura 10. Morfologia de <i>Triatoma rubrofasciata</i>	63
Figura 11. Exemplo de recipientes em que os cruzamentos experimentais foram realizados.	67

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO I

Figure 1. Constitutive heterochromatin pattern and composition of AT-rich and CG-rich DNA observed in <i>T. sordida</i> Brazilians.	80
---	----

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO II

Figure 1. Map of Brazil showing the study sample areas for <i>Triatoma sordida</i> populations.	101
Figure 2. Haplotype frequencies of cytochrome b in Brazilian samples. The scale bar shows the percentage of each haplotype per location indicated in the horizontal boxes.	101

Figure 3. Bayesian inference trees reconstructed from cyt b (A) and nd1 (B) sequences. The numbers above the branches represent clade support higher than 70. A cytochrome b sequence of *Triatoma infestans* and an nd1 sequence of *T. brasiliensis* were used as outgroups, respectively..... 102

Figure 4. Haplotype frequencies of nd1 gene in Brazilian samples. The scale bar shows the percentage of each haplotype per location indicated in the horizontal boxes. 103

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO III

Figure 1. *Triatoma rosai* sp. nov. male (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida* male (C) dorsal view, (D) ventral view. 136

Figure 2. *Triatoma rosai* sp. nov. female (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida* female (C) dorsal view, (D) ventral view. 137

Figure 3. Detail of Head: (A) *T. rosai* sp. nov. dorsal view, (B) *T. sordida* dorsal view; Detail of Pronotum: (C) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (D) *T. sordida* dorsal view..... 138

Figure 4. Detail of Head by SEM: (A) *T. rosai* sp. nov. by dorsal view, (B) *T. sordida* by dorsal view; Detail of Pronotum by SEM: (C) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (D) *T. sordida* dorsal view; Detail of scutellum by SEM: (E) *T. rosai* sp. nov. dorsal view (F) *T. sordida* dorsal view. ac: anteclypeus; ge: gena; ju: jugum; oc: ocellus; aa: anterolateral angle; co: collar; hu: humeral angles..... 139

Figure 5. Female external genitalia by SEM: *T. rosai* sp. nov. (A) dorsal view, (C) posterior view, (E) ventral view, *T. sordida*: (B) dorsal view, (D) posterior view, (F) ventral view. Gc 8: gonocoxite; Gc 9: gonapophyse; Gp 8: gonapophyse, VII, VIII, IX: tergites; X: segment. 140

Figure 6. Detail of genital capsule *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida*: (C) dorsal view, (D) ventral view. cg: genital capsule, pa: paramere. 141

Figure 7. Paramere of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view; (C) Median process of the pygophore; Paramere of *T. sordida*: (D) dorsal view, (E) ventral view; (F) Median process of the pygophore..... 141

Figure 8. Phallus of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) ventral view, *T. sordida*: (C) dorsal view, (D) ventral view. bpa: basal plate arm, aa: articulatory apparatus, es: endosomal struts. 142

Figure 9. Phallus of *T. rosai* sp. nov.: (A) dorsal view, (B) lateral view, (C) ventral view; *T. sordida*: (D) dorsal view, (E) Lateral view, (F) ventral view. en: endosoma, dps: dorsal phallothecal sclerite, es: endosoma struts..... 142

Figure 10. Occurrence of *T. rosai* sp. nov. in Argentina provinces. Made with QGIS..... 143

Figure 11. Tree obtained by Bayesian Inference for the concatenated genes COI, cyt b, 28S, 16S and ITS-1. The numbers in the nodes represent the bootstrap values..... 143

Figure 12. Holotype of *T. sordida* described by Stål in 1859 (as *Conorhinus sordidus*) and deposited in the Zoologisches Museum, Berlin, Alemanha, A – Dorsal view; B – Lateral view. 144

LISTA DE FIGURAS – CAPÍTULO IV

Figure 1. Experimental crosses between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*: A. *T. sordida sensu stricto* female (right) x *T. sordida* La Paz male (left); B. *T. sordida* La Paz female (left) x *T. sordida sensu stricto* male (right). Bar: 1 cm. 159

Figure 2. Notphied testicle of hybrid of *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*, demonstrating the absence of gonadal dysgenesis. A. Testicle of *T. sordida* La Paz; B. Testicle of hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz female x *T. sordida sensu stricto* male; C. Testicle of hybrid F2 of the crosses between *T. sordida* La Paz male x *T. sordida sensu stricto* female. Bar: 10 mm. 159

Figure 3. Meiotic metaphases of hybrids F1 resulting from the experimental crosses between *T. sordida* La Paz and *T. sordida sensu stricto*. A and B. Metaphases with correct pairing of the homeologous chromosomes; A. Hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz female x *T. sordida sensu stricto* male; B. Hybrid F1 of the crosses between *T. sordida* La Paz male x *T. sordida sensu stricto* female; X: sex chromosomes X, Y: sex chromosomes Y. Bar: 10 µm. 159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae na literatura. ...	44
Tabela 2. Localidades dos estados e biomas das populações analisadas citogeneticamente...	53
Tabela 3. Estados e municípios amostrados nas análises populacionais, número de indivíduos analisados em cada localidade (N), ambiente natural e código de identificação (<i>Voucher</i>) do espécime coletado.....	54
Tabela 4. Sequências dos <i>primers</i> dos genes analisados.	57
Tabela 5. Espécies analisadas, distribuição geográfica e número de acesso do GenBank para	66
Tabela 6. Cruzamentos experimentais “interespecíficos” e intraespecíficos realizados entre <i>T. sordida</i> provenientes do Brasil, Argentina e Bolívia.	66

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO I

Table 1. Geographical origin of the specimens used in the study and their corresponding biomes.....	79
--	----

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO II

Table 1. States and locations sampled, number of individuals analyzed in each location (N), natural environment and identification code (voucher) of the collected <i>Triatoma sordida</i> specimens.	98
Table 2. Description of cytochrome b polymorphisms identified in <i>Triatoma sordida</i> samples from Brazil.....	99
Table 3. Description of nd1 gene polymorphisms identified in <i>Triatoma sordida</i> samples from Brazil.....	100

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO III

Table 1. Species, geographic distribution and molecular markers used in the phylogenetic studies.	134
Table 2. Measurement averages and significance of <i>T. sordida sensu stricto</i> and <i>T. rosai</i> sp. nov. In bold we present statistically significant measurements.....	134
Table 3. Genetic distance based on cyt b mitochondrial gene. In bold we present the Genetic distance between <i>T. rosai</i> sp. nov. and <i>T. sordida sensu stricto</i>	135
Table 4. Experimental crosses performed between <i>T. sordida sensu stricto</i> and <i>T. rosai</i> sp. nov.	135

LISTA DE TABELAS – CAPÍTULO IV

Table 1. Experimental crosses performed between <i>T. sordida</i> La Paz and <i>T. sordida sensu stricto</i>	158
Table 2. Genetic distance between <i>T. sordida</i> La Paz and <i>T. sordida sensu stricto</i> for mitochondrial (Cyt B and ND1) and nuclear (ITS-1) genes.	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIC	do inglês <i>Akaike information criterion</i>
AMOVA	do inglês <i>Analysis of Molecular Variance</i>
ARG	Argentina
ATP	do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>
BR	População de Brasília de Minas (Minas Gerais)
BLAST	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOL	Bolívia
BRA	Brasil
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	População de Catuti (Minas Gerais)
CMA3	do inglês <i>Chromomycin A3</i>
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COI, II, III	do inglês <i>Cytochrome c oxidase subunit I, II, III</i>
COR	População de Corumbá (Mato Grosso do Sul)
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
Cyt B	do inglês <i>Cytochrome B</i>
DAPI	do inglês <i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole</i>
DN	Doenças negligenciadas
DNA	do inglês <i>Desoxirribonucleic Acid</i>
DNAg	DNA genômico
DNAmt	DNA mitocondrial
DNAr	DNA Ribosomal
DNAt	DNA transportador
ESS	do inglês <i>Effective Sample Size</i>
et al.	e outros, do latim <i>et al</i>
F1-F2-F3	Primeira, segunda e terceira geração
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFAR	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FISH	do inglês <i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
F	Estatística D de Wright

F_{CT}	Diferenciação entre indivíduos entre grupos
F_{SC}	Diferenciação entre populações do mesmo grupo
F_{ST}	Diferenciação entre indivíduos dentro de populações
FI	Fator de impacto
GO	População de Posse (Goiás)
GTR	do inglês <i>Generalised Time Reversible model</i>
H	Número de haplótipos
Hd	Diversidade haplotípica
HKY	do inglês <i>Hasegawa Kishino-Yano model</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITS	do inglês <i>Internal Transcribed Spacer</i>
K2P	Modelo Kimura-2-parâmetros
MA	População de Monte Azul (Minas Gerais)
MAC	População de Macaúbas (Bahia)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ML	do inglês <i>Maximum Likelihood</i>
MO	Microscopia Óptica
N	Número de indivíduos
N1-N5	Primeiro-quinto instar ninfal
ND1-6	do inglês <i>NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1-6</i>
NCBI	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Ambiente peridoméstico
P.	Gênero <i>Panstrongylus</i>
PAN	População do Pantanal (Mato Grosso do Sul)
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
POR	População de Porteirinha (Minas Gerais)
R.	Gênero <i>Rhodnius</i>
RM	População de Riacho dos Machados (Minas Gerais)
S	Sítios polimórficos ou segregantes
SEA	População de Seabra (Bahia)
SI	População de Santo Inácio (Gentio de Ouro – Bahia)

T.	Gênero <i>Triatoma</i>
TA	População de Tanhaçu (Goiás)
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UV	Ultravioleta
X	Cromossomo sexual X
Y	Cromossomo sexual Y
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>
π	Diversidade nucleotídica
Φ (Phi)	Extensão do cálculo da estatística F de Wright
♂ ou M	Macho
♀ ou F	Fêmea
©	do inglês <i>Copyright</i>
®	Marca registrada
™	do inglês <i>Trade mark</i>
cm	Centímetro (unidade de medida: 10^{-2} metro)
ml	Mililitro (unidade de volume: 10^{-3} litro)
mm	Milímetro (unidade de medida: 10^{-3} metro)
min	Minutos
ng	Nanograma (unidade de medida: 10^{-9} grama)
pb	Pares de base
s	Segundos
V	Volt (unidade de tensão elétrica)
°C	Graus Celsius (medida de temperatura)
μL	Micro litro (unidade de volume: 10^{-6} litro)
μm	Micrômetro (unidade de medida: 10^{-6} metro)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	29
1.1. Doenças Negligenciadas e a Doença de Chagas.....	29
1.2. Aspectos gerais dos triatomíneos e da espécie em estudo	32
1.2.1. A questão taxonômica de <i>T. sordida</i>	35
1.3. Estudos genéticos.....	38
1.3.1. Delimitação de espécie com base em dados moleculares.....	38
1.3.2. Espécies Críptica	39
1.3.3. Marcadores Moleculares.....	39
1.3.4. Genética de populações	42
1.3.5. Cruzamentos Experimentais	43
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1. Obtenção do material biológico	53
3.1.1. Espécimes utilizados nas análises citogenéticas.....	53
3.1.2. Espécimes utilizados nas análises populacionais	54
3.1.3. Espécimes utilizados nos cruzamentos experimentais e nas análises filogenéticas, morfológicas e morfométricas	55
3.2. Análises Citogenéticas	55
3.2.1. Preparação Cromossômica	55
3.2.2. Bandamento C e CMA3/DAPI.....	55
3.2.3. Orceína Lacto-Acética.....	55
3.2.4. Análise do material biológico.....	56
3.3. Análises Moleculares	56
3.3.1. Extração do DNA Genômico.....	56
3.3.2. Reação de Amplificação	57
3.4. Análises populacionais.....	59
3.4.1. Análise das sequências obtidas.....	59
3.4.2. Estatística Descritiva	59

3.4.3.	Distância Genética	60
3.4.4.	Análise de Variância Molecular (AMOVA)	60
3.4.5.	Análises Filogenéticas	60
3.5.	Avaliação do status específico de <i>T. sordida</i> Argentina	61
3.5.1.	Identificação morfológica e descrição	61
3.5.2.	Análises morfológicas	62
3.5.3.	Análises morfométricas	64
3.5.4.	Reconstrução filogenética.....	64
3.6.	Cruzamentos experimentais.....	66
3.6.1.	Delineamento do estudo	66
4.	RESULTADOS.....	70
4.1.	Capítulo I - Genetic structure of Brazilian populations of <i>Triatoma sordida</i> (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) by means of chromosomal markers	70
4.2.	Capítulo II - Revisiting the genetic variability of Brazilian peridomestic populations of the Chagas disease vector <i>Triatoma sordida</i> (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae).....	81
4.3.	Capítulo III - <i>Triatoma rosai</i> sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of Argentinian Chagas disease vector described based on integrative taxonomy)	109
4.4.	Capítulo IV - <i>Triatoma sordida</i> (Stål, 1859) from La Paz, Bolivia (Hemiptera, Triatominae): an incipient species or an intraspecific chromosomal polymorphism?	146
5.	CONCLUSÕES	161
	REFERÊNCIAS	163

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Negligenciadas e a Doença de Chagas

As doenças negligenciadas (DN) constituem um grupo diversificado de enfermidades que prevalecem em condições tropicais e subtropicais de 149 países, e afetam mais de um bilhão de pessoas que vivem em situação de pobreza em todo o mundo (WHO, 2020a). Atualmente, existem mais de vinte enfermidades consideradas como DN que podem ser ocasionadas por vírus (dengue, chikungunya e raiva), bactérias (úlceras de Buruli, hanseníase, tracoma e treponematoses endêmicas), parasitos (doença de Chagas, esquistossomos, dracunculíase, equinococose, trematodíases transmitidas por alimentos, doença do sono, leishmanioses, filariose linfática, oncocercose, helmintíases e teníase/cisticercose), fungos (micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas), ectoparasitos (sarna) e, até mesmo, pelo envenenamento por picada de serpente (WHO, 2020a).

Além do número elevado de óbitos (cerca de meio milhão de mortes anualmente), as DN levam a diversas condições (por exemplo, incapacidades, desfiguração, prejuízos no crescimento infantil e no desenvolvimento cognitivo) que podem se intensificar com a pobreza nas regiões afetadas (WHO, 2010, 2013; HOTEZ et al., 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere que o controle efetivo dessas enfermidades pode ser alcançado quando diferentes abordagens de saúde pública são combinadas e aplicadas, ou seja, as ações devem ser guiadas pelo conhecimento entoepidemiológico das DN e, sobretudo, pela disponibilidade de medidas apropriadas para detectar, prevenir e controlar essas moléstias (WHO, 2020a).

A maioria das DN concentra-se nas regiões pobres da África, Ásia e América Latina (HOTEZ, 2011). Entre os países latino-americanos, o Brasil é responsável por uma grande parcela dessas doenças, a saber, 86% dos casos de hanseníase, cerca de 40% dos casos de dengue, 96% dos casos de esquistossomose, 39% dos casos de leishmaniose tegumentar, 93% dos casos de leishmaniose visceral e 25% dos casos de doença de Chagas (HOTEZ et al., 2008, 2014; LINDOSO; LINDOSO, 2009; MARTINS-MELO et al., 2016).

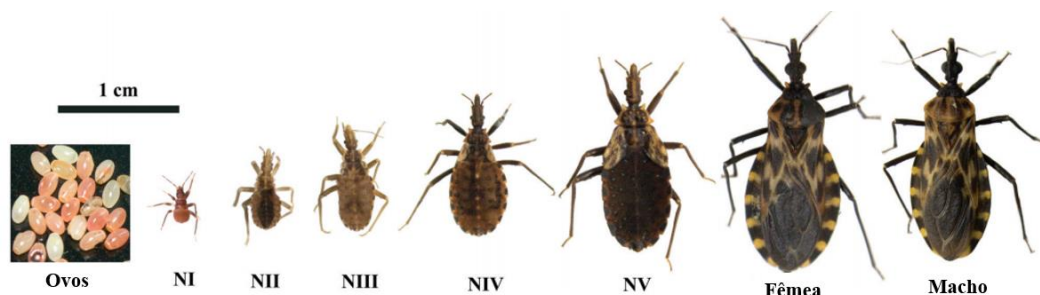
A doença de Chagas, descrita por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, em 1909, é uma parasitose sistêmica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) que representa um grande problema de saúde pública (NOUVELLET; CUCUNUBÁ; GOURBIÈRE, 2015). Essa doença é considerada potencialmente fatal (WHO, 2020b) e afeta, principalmente, pessoas que vivem em países em

desenvolvimento (BERMUDEZ et al., 2016). Estima-se que oito milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi* e, embora a maioria dos casos ocorra na América Latina, a doença se espalhou para áreas não endêmicas (WHO, 2020b), sendo relatada em diversos países, tais como Canadá, Estados Unidos, Japão, Austrália, Nova Zelândia, Suíça, Itália e Espanha (SORIANO-ARANDES et al., 2016). Nas Américas, cerca de 70 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, sendo estimados, por ano, 30.000 novos casos de infecção e 14.000 mortes por complicações chagásicas (PAHO, 2017).

A transmissão do agente etiológico *T. cruzi* pode ocorrer de diversas maneiras como, por exemplo, por meio de transplante de órgãos de doadores infectados, acidentes laboratoriais ou ingestão de alimentos e líquidos contaminados (cana-de-açúcar, açaí e carne crua). A transmissão também pode se dar de forma congênita (verticalmente entre a mãe e a criança) ou ocorrer por meio de transfusão de sangue, sendo essas formas consideradas importantes alvos de atenção na redução da disseminação da doença, visto que estão relacionadas com a infestação em áreas urbanas e não endêmicas (ANGHEBEN et al., 2015; HOWARD et al., 2015). No entanto, o principal modo de transmissão é o vetorial, o qual ocorre por meio dos triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) (WHO, 2020b), insetos popularmente conhecidos como “barbeiros” (DIAS; LARANJA; NOBREGA, 1945), devido ao seu hábito de picarem a face descoberta de pessoas adormecidas (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA; CERON, 2004).

A contaminação dos triatomíneos e a transmissão do parasita ocorrem durante a sua hematofagia, a qual é obrigatória em todas as fases da vida dos triatomíneos após a sua eclosão [ninfas de primeiro (N1) a quinto instar (N5) e adultos de ambos os sexos (Figura 1)]. Os insetos podem se contaminar ao se alimentarem do sangue de mamíferos infectados pelo *T. cruzi* e, assim, veicular o parasito desde a N1 até a fase adulta (SOARES et al., 2014; URDANETA-MORALES, 2014). Como possuem o hábito de defecar (Figura 2A, seta) e urinar (Figura 2B, seta) durante a alimentação, os triatomíneos infectados podem transmitir o protozoário a partir do contato das fezes e da urina contaminadas com a pele danificada do hospedeiro após a picada do inseto. A transmissão também pode se dar pelos os olhos, boca e por eventuais rupturas presentes na pele do indivíduo quando o mesmo, instintivamente, coça e provoca o espalhamento das fezes e da urina contaminadas (WHO, 2020b).

Figura 1. Ciclo de vida da espécie *T. carrioni*. Os estágios do desenvolvimento são ilustrados da esquerda para a direita, compreendendo os ovos (sendo a coloração rosa indicativa da probabilidade de eclosão), ninfa de primeiro ínstar (N1), segundo ínstar (N2), terceiro ínstar (N3), quarto ínstar (N4), quinto ínstar (N5), e as formas adultas fêmea e macho.



Fonte: PADILLA et al., 2019, adaptado.

Figura 2. Exemplo de triatomíneo (*Triatoma sordida*) defecando (A, seta) e urinando (B, seta) durante o repasto sanguíneo.



Fonte: OLIVEIRA, 2020.

A falta de progresso na descoberta de novas drogas no tratamento dos pacientes chagásicos ainda permanece um desafio na cura da doença de Chagas, uma vez que a terapêutica com os anti-tripanosomatídeos (Benznidazol e Nifurtimox) é ainda a única disponível desde a década de 60 (VERMELHO; RODRIGUES; SUPURAN, 2020), sendo efetiva apenas na fase aguda da doença [e, considerando-se que essa fase, geralmente, é assintomática ou com sintomas inespecíficos – como febre e mal estar, raramente resultando em chagoma (nódulo de pele) ou sinal de Romaña (edema na pálpebra) (BERN, 2015) –, o

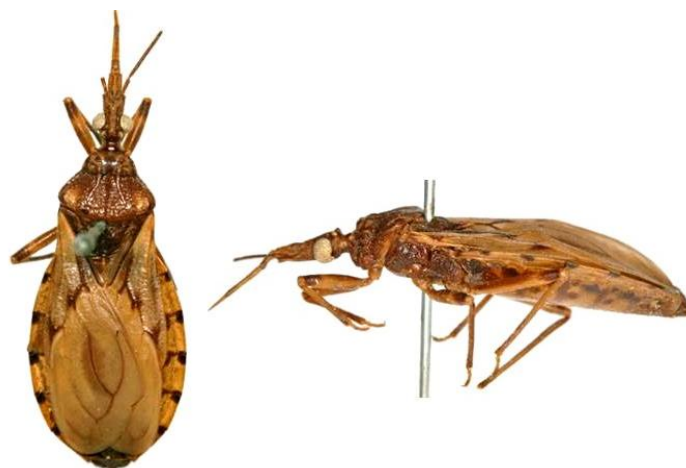
paciente só descobre que tem a Chagas quando já está na fase crônica da doença]. Dessa forma, a OMS ressalta que o controle de vetores é considerado como a principal medida para diminuir a incidência da doença de Chagas (WHO, 2020b).

1.2. Aspectos gerais dos triatomíneos e da espécie em estudo

Atualmente, existem 157 espécies descritas na subfamília Triatominae [sendo 154 espécies vivas e três espécies fósseis (*T. dominicana*, *P. hispaniolae* e *Paleotriatoma metaxytaxa*)], agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ALEVI et al., 2020; GALVÃO, 2020; DALE; JUSTI; GALVÃO, 2021; ZHAO; GALVÃO; CAI, 2021). Desse total, são conhecidas 66 espécies que ocorrem no Brasil (GURGEL-GONÇALVES et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2019). Embora existam espécies com maior ou menor grau de importância na transmissão da doença de Chagas [com destaque para *Triatoma infestans* Klug, 1834, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa; Espínola, 1964 e *T. sordida* (Stål, 1859), que são de grande importância vetorial por habitarem regiões domiciliares e apresentarem ampla distribuição geográfica no Brasil (SILVEIRA, 2011; COURA, 2015; DIAS et al., 2016)], todos os triatomíneos, de ambos os sexos e em qualquer fase do desenvolvimento após a eclosão (N1, N2, N3, N4, N5 e adultos), são considerados como potenciais vetores dessa doença (GALVÃO, 2014).

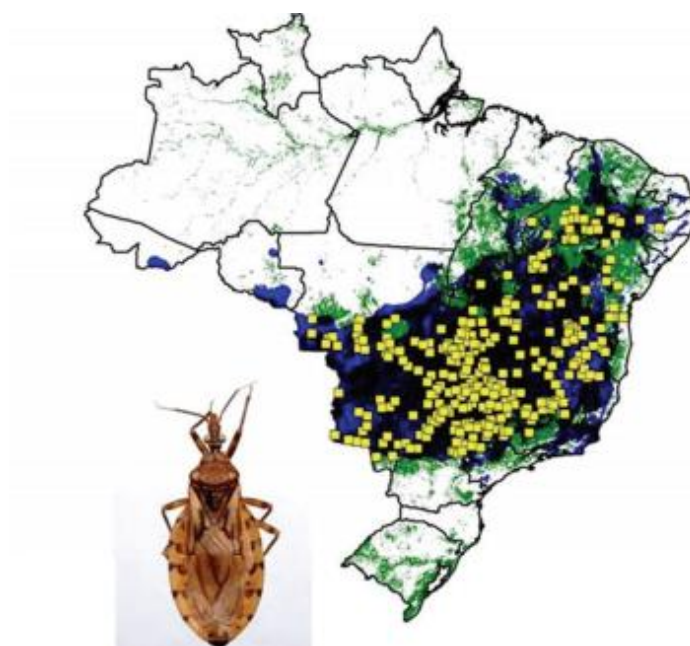
Triatoma sordida (Stål, 1859) (Figura 3) é considerada, atualmente, a espécie mais frequentemente capturada no ambiente peridomiciliar no Brasil (DIOTAIUTI et al., 1998; GALVÃO, 2014), além de ser predominante nos estados associados a regiões de cerrado, bem como sudeste, centro-oeste e áreas de transição para a Amazônia (GALVÃO, 2014). Sua distribuição inclui os estados do Acre, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Tocantins (Figura 4) (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012; RAMOS et al., 2018). Embora o cerrado brasileiro seja considerado como o centro de dispersão de *T. sordida* (FORATTINI et al., 1983), esse vetor também é encontrado em outros países da América Latina - Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (GORLA et al., 1993; GALVÃO, 2014; PANZERA et al., 2015).

Figura 3. Holótipo de *Triatoma sordida* descrito por Stål, em 1859, e depositado no Zoologisches Museum, Berlim, Alemanha.



Fonte: Imagem cedida pelo Dr. Jürgen Deckert, curador do museu.

Figura 4. Espécime de *Triatoma sordida* e sua disposição geográfica no Brasil.



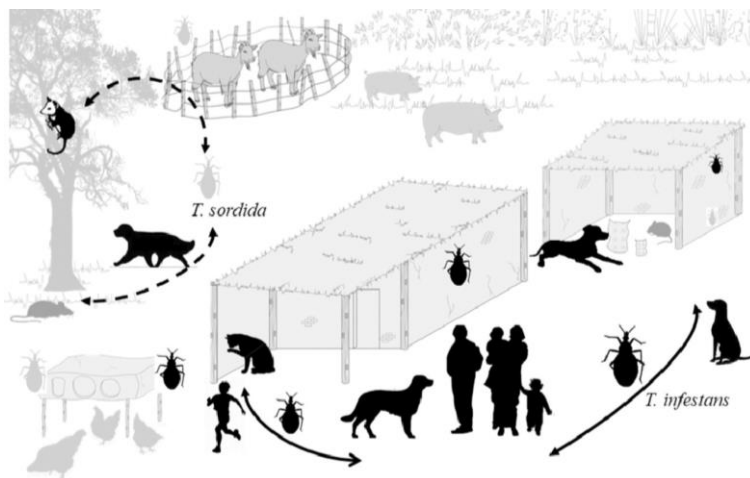
Fonte: GURGEL-GONÇALVES et al., 2012, adaptado.

T. sordida possui um amplo nicho ecológico (SILVEIRA et al., 2001), que lhe permite habitar vários ecótopos e utilizar diversas fontes alimentares (FORATTINI et al., 1975; DIOTAIUTI et al., 1993). Os principais ecótopos nos quais a espécie é encontrada estão associados com construções de madeira, como cercas, chiqueiros, currais, galinheiros, ocos de árvores, paióis, pilhas de lenha e pombais (CASTRO et al., 1997; PIRES et al., 1997; CARCAVALLO et al., 1998; DUJARDIN; SCHOFIELD; PANZERA, 2002; ROSSI;

DUARTE; GURGEL-GONÇALVES, 2015). Consequentemente, as fontes alimentares dessa espécie (que podem ser exclusivas ou combinadas) estão relacionadas a esses ecótopos, sendo notificada até o momento a sua presença em aves, cachorros, gatos, cavalos, cabras, ovelhas, vacas, porcos, além de animais silvestres associados a esses ambientes, como roedores, gambás, tatus, lagartos e sapos (LENT; WYGODZINSKY, 1979; CASTRO et al., 1997; PIRES et al., 1997; LOROSA et al., 1999a,b,c). Também existem notificações de coletas intradomiciliares de ninfas e adultos da espécie, o que evidencia sua capacidade de invasão das habitações humanas (FORATTINI et al., 1971; LENT; WYGODZINSKY, 1979; DIOTAIUTI et al., 1988; CASTRO et al., 1997; GALVÃO, 2014; ROSSI; DUARTE; GURGEL-GONÇALVES, 2015). Tal amplitude de nicho, associada à grande resistência ao jejum de *T. sordida*, facilita, portanto, sua adaptação a um número cada vez maior de ecótopos (SILVA et al., 2005).

Devido à sua elevada capacidade de disseminação (FORATTINI et al., 1975), essa espécie possui a capacidade de habitar ambientes silvestres, peridomiciliares e domiciliares (LENT; WYGODZINSKY, 1979; CASTRO et al., 1997; NOIREAU et al., 1999; SÁNCHEZ et al., 2020), incluindo-a atualmente entre as prioridades para campanhas de controle de triatomíneos no Brasil (DIOTAIUTI et al., 1995; SILVA et al., 2005; ABAD-FRANCH et al., 2013; RIBEIRO JR. et al., 2019). Os índices de captura de *T. sordida* têm preocupado as autoridades de saúde em áreas de ocupação agrícola nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás (DIOTAIUTI et al. 1995; SILVA et al. 2005; OLIVEIRA; SILVA, 2007; PELLI et al. 2007). A partir da intensificação das campanhas de controle e eliminação dos focos de *T. infestans*, a infestação peridomiciliar assumiu maior importância, e a persistência das infestações neste ambiente por *T. sordida* vem sendo encarada como desafio a ser enfrentado no controle de triatomíneos (DIOTAIUTI et al. 1995). Além disso, o *T. sordida* também pode contribuir para os ciclos de transmissão peridoméstica devido à sua associação com vários mamíferos sinantrópicos, como roedores e gambás (MACCHIAVERNA et al., 2015) (Figura 5).

Figura 5. Ocupação espacial e nicho ecológico das espécies *T. sordida* e *T. infestans*.



Fonte: Rodrigues-Planez et al., 2020.

1.2.1. A questão taxonômica de *T. sordida*

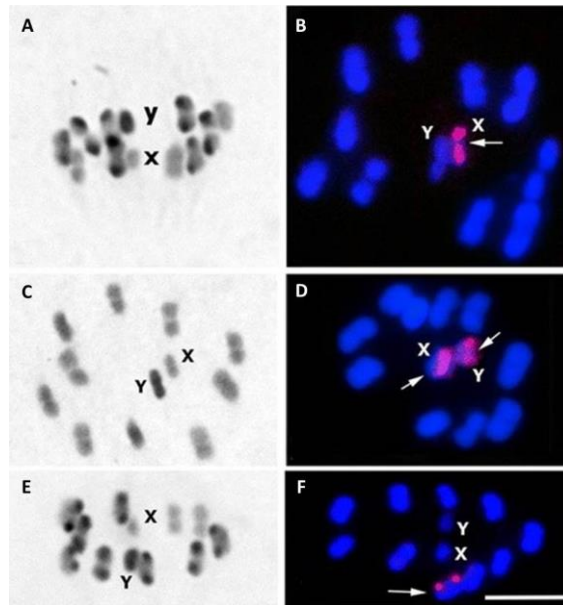
T. sordida foi a primeira espécie descrita do subcomplexo Sordida, inicialmente composto por *T. patagonica* Del Ponte, 1929, *T. guasayana* Wygodzinsky; Abalos, 1949 e *T. garciabesi* Carcavallo et al. (1967), com base em análises morfológicas e distribuição geográfica (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; PANZERA et al., 2015). Entretanto, essas espécies formam um grupo parafilético, pois são agrupadas filogeneticamente com espécies dos subcomplexo *T. matogrossensis* e *T. rubrovaria* (JUSTI et al., 2014; JUSTI; GALVÃO; SCHRAGO, 2016), estabelecendo o clado mais diversificado morfológicamente do complexo *T. infestans* (JUSTI et al., 2014).

Pita et al. (2016), com base em dados cromossômicos, propuseram em seu trabalho uma reorganização dos subcomplexos da América do Sul, sugerindo que o subcomplexo *T. sordida* fosse composto pelas espécies *T. garciabesi*, *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida Argentina* (possível nova espécie), com o acréscimo das espécies *T. jurbergi* Carcavallo et al., 1998, *T. matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953 e *T. vanda* Carcavallo et al., 2002, que pertenciam anteriormente ao subcomplexo *T. matogrossensis*, o qual foi eliminado. Além disso, os autores reagruparam as outras espécies do subcomplexo *T. sordida* (*T. guasayana* e *T. patagonica*) com *T. carcavalloi* Jurberg, Rocha & Lent, 1998, *T. circummaculata* (Stål, 1859), *T. klugi* Carcavallo et al., 2001, *T. limai* Del Ponte, 1929, *T. oliveirai* (Neiva, Pinto & Lent, 1939), *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *T. pintodiasi* Jurberg et al. (2013) no subcomplexo *T. rubrovaria* (PITA et al., 2016).

A validade taxonômica de *T. sordida* e a diferenciação de suas populações sempre foi controversa e permanece em discussão. Com exceção de *T. patagonica*, as espécies do “antigo” subcomplexo Sordida são morfologicamente muito similares (DUJARDIN; PANZERA; SCHOFIELD, 2002; PANZERA et al., 2015), com sobreposição de distribuição geográfica, podendo viver em simpatria e produzir híbridos, o que aumenta significativamente a confusão taxonômica desses vetores (PANZERA et al., 2015) o que acarretou, por exemplo, na sinonimização de *T. garciabesi* com *T. sordida* (LENT; WYGODZINSKY, 1979). No entanto, algumas metodologias mostram-se eficazes para diferenciar esses táxons, como as análises citogenéticas (PANZERA et al., 2015), isoenzimáticas (NOIREAU et al., 1998), morfológicas (LENT; WYGODZINSKY, 1979; GORLA et al., 1993), morfométricas (NATERRO et al., 2017) e moleculares (JUSTI et al., 2014; PANZERA et al., 2015; JUSTI; GALVÃO, 2016), resultando, por exemplo, na revalidação de *T. garciabesi* (JURBERG et al., 1998), após 19 anos de ser inicialmente sinonimizado como *T. sordida* (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

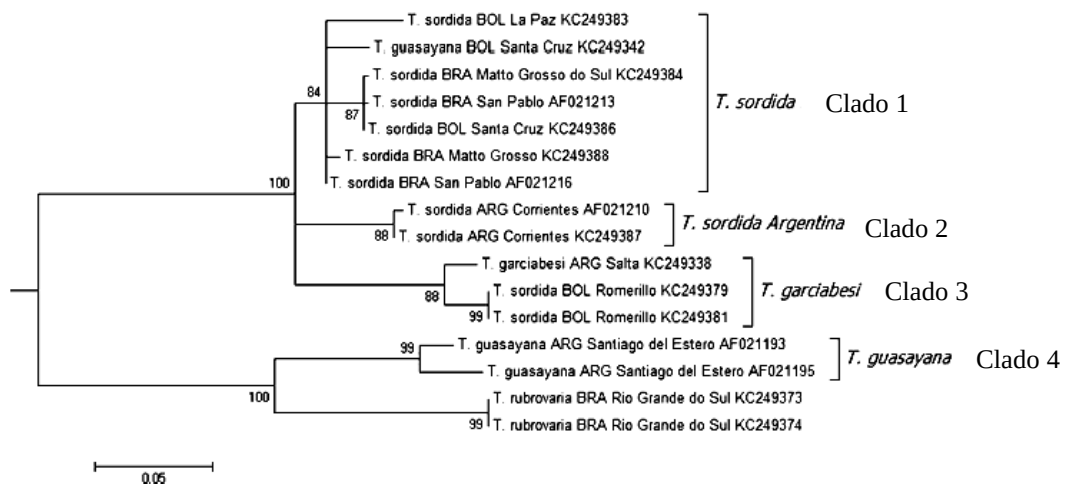
Baseando-se em dados cromossômicos (padrão de heterocromatina constitutiva e marcação por FISH da sonda ribossomal 45S) (Figura 6) e moleculares (gene mitocondrial COI) (Figura 7), Panzera et al. (2015) propuseram a existência de três táxons diferentes (citótipos) entre os exemplares classificados, até o momento, como *T. sordida*: *T. sordida sensu stricto* (I), *T. sordida La Paz* (II) e *T. sordida Argentina* (III), caracterizando o fenômeno de especiação críptica para *T. sordida*. Ainda, mais recentemente, Nattero et al. (2017) diferenciaram *T. sordida Argentina* dos exemplares provenientes do Brasil e da Bolívia a partir de dados morfométricos, ressaltando a importância de estudos adicionais, com marcadores fenotípicos, moleculares e realização de cruzamentos experimentais, para confirmar a validade específica dos táxons.

Figura 6. Padrão de heterocromatina (A, C e E) e marcação das sondas DNAr 45S (B, D e F - setas) em *T. sordida sensu stricto* (A, B), *T. sordida* Argentina (C, D) e *T. sordida* La Paz (E, F). X: cromossomo sexual X, Y: cromossomo sexual Y. Barra: 10 µm.



Fonte: Panzera et al., 2015, adaptado.

Figura 7. Árvore filogenética obtida por Máxima Verossimilhança dos citótipos de *T. sordida*, com base no gene mitocondrial COI. O Clado 1 representa o citótipo I (*T. sordida sensu stricto*) e II (*T. sordida* La Paz). O Clado 2 representa o citótipo III (*T. sordida* Argentina). O Clado 3 reúne espécimes de *T. garciabesi* com alguns erros de identificação depositados no GenBank e o Clado 4 contém exemplares de *T. guasayana*. ARG = Argentina; BOL = Bolívia; BRA = Brasil.



Fonte: Panzera et al., 2015, adaptado.

Todas as populações brasileiras analisadas citogeneticamente, até o momento, foram classificadas como *T. sordida sensu stricto* (MADEIRA et al., 2019). Embora esse citótipo de *T. sordida* seja considerado mais significativo em termos de transmissão da doença de Chagas, principalmente em ambientes domésticos e peridomésticos (PANZERA et al., 2015), estudos caracterizando a diversidade genética dessas populações no Brasil são escassos, restringindo-se à região de Minas Gerais (MONTEIRO et al., 2009; PESSOA et al., 2016).

1.3. Estudos genéticos

1.3.1. Delimitação de espécie com base em dados moleculares

A espécie é tida como uma unidade fundamental para a biologia, entretanto, existem diversos conceitos e definições, os quais consideram diferentes aspectos - biológicos, morfológicos, ecológicos, entre outros - que podem levar a diferenças na delimitação de uma determinada espécie (MAYDEN, 1997; DE QUEIROZ, 2007). Dentre os diversos conceitos existentes, alguns levam em consideração a relação de ancestralidade-descendência, como o Conceito Evolutivo de Espécie, o qual sugere que espécies são linhagens que evoluem separadamente de outras, com suas próprias tendências e histórias evolutivas (SIMPSON, 1951; WILEY, 1978; MAYDEN, 1997) e o Conceito Filogenético de Espécie, que apresenta diferentes classes, porém todas relacionadas com a sistemática filogenética ou cladística, de modo que espécies seriam resultantes de seleção natural, sendo as menores entidades biológicas que são diagnosticáveis e/ou monofiléticas (ROSEN, 1979; NELSON; PLATNICK, 1981; CRACRAFT, 1983; DONOGHUE, 1985; MISHLER, 1985; NIXON; WHEELER, 1990).

A biologia molecular tem sido considerada uma ferramenta muito utilizada em estudos de reconhecimento e delimitação de espécies, considerando aspectos genéticos e filogenéticos. Em Triatominae, diversos estudos têm permitido a separação de espécies crípticas e a determinação da diversidade de espécies, por meio de isoenzimas, citogenética molecular, genes mitocondriais e nucleares (NOIREAU et al., 1998; MARCILLA et al., 2001; PAVAN & MONTEIRO, 2007; BARGUES et al., 2008; DORN et al., 2009; ABAD-FRANCH et al., 2013; PANZERA et al., 2015).

1.3.2. Espécies Crípticas

Espécies crípticas, também conhecidas como espécies isomórficas, são espécies idênticas na sua morfologia externa, podendo diferir em características menores e não visíveis facilmente. Por meio do uso de diferentes marcadores fenotípicos e genéticos, a especiação críptica se mostrou um fenômeno amplamente disseminado pela subfamília Triatominae. A sua existência já foi descrita para diferentes grupos do gênero *Triatoma*, incluindo representantes dos subcomplexos *Brasiliensis*, *Dimidiata*, *Phyllosoma* e *Sordida* (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009; PANZERA et al., 2015).

O fenômeno de especiação críptica foi sugerido por Noireau et al. (1998) pela primeira vez para *T. sordida* de diferentes localidades da Bolívia, com base em análises isoenzimáticas que resultaram em uma alta distância genética. Posteriormente, Panzera et al. (1997, 2015), com base em dados cromossômicos e moleculares, também corroboraram a hipótese quando compararam populações do Brasil, da Bolívia e Argentina, destacando que existem, pelo menos, duas possíveis espécies diferentes associadas a *T. sordida sensu stricto*: *T. sordida Argentina* e *T. sordida La Paz*.

Em relação à diversidade genética das populações brasileiras de *T. sordida*, só existem dois estudos na literatura até o momento que realizaram sua investigação (MONTEIRO et al., 2009; PESSOA et al., 2016), porém ambos restritos à região de Minas Gerais. Ambos os estudos reportaram que a estrutura dessas populações apresentou baixos níveis de diversidade genética, sendo inclusive a diversidade nucleotídica de isolados de *T. sordida* da Bolívia 13 vezes maior em comparação com as amostras brasileiras (PESSOA et al., 2016).

Assim, levando em consideração que espécies crípticas são espécies idênticas do ponto de vista morfológico, podendo ser diferenciadas apenas por ferramentas genéticas (SCHOFIELD; GALVÃO, 2009), sugerimos que existe a necessidade de um estudo genético em âmbito populacional entre os exemplares brasileiros de diferentes estados.

1.3.3. Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são proteínas ou sequências de DNA polimórficas que podem ser usados como indicadores de variação do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Atualmente, essas sequências são tidas como uma das ferramentas mais úteis para estabelecer a classificação natural da subfamília Triatominae

(MAS-COMA; BARGUES, 2009). Os sequenciamentos de DNA ribossômico (DNAr) nuclear e do DNA mitocondrial (DNAm) são considerados métodos que fornecem uma informação mais precisa acerca das características desses vetores (MONTEIRO et al., 2001). Dentre os aspectos da biologia dos triatomíneos que podem ser inferidos pelos dados das sequências de DNA estão: sistemática e taxonomia, origem, taxas e traços evolutivos, biogeografia, classificação de espécimes, caracterização de espécies crípticas, caracterização de híbridos e mudanças populacionais (BARGUES et al., 2002).

1.3.3.1. DNA nuclear

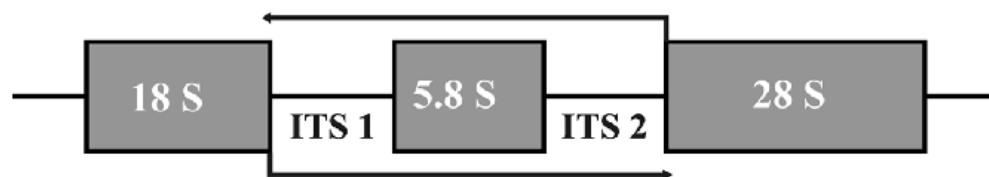
Genes nucleares são considerados como ferramentas importantes para se analisar diversidade e relações filogenéticas em nível específico (MAS-COMA; BARGUES, 2009). O complexo gênico de RNA ribossomal (RNAr) nuclear é uma unidade de repetições em tandem, com uma a muitas centenas de cópias (Figura 8). Este complexo possui muitos domínios, que evoluem a taxas variadas, possuindo, assim, diferentes utilidades filogenéticas (JORGENSEN; CLUSTER, 1988). O DNAr é uma ferramenta utilizada em estudos filogenéticos para vários níveis taxonômicos, uma vez que cópias individuais do DNAr não acumulam mutações de forma independente, pois pertencem a famílias multigênicas, o que resulta em uma importante variação intraespecífica pequena e interespecífica (ONYABE; CONN, 1999).

O DNAr, tal como os espaçadores internos transcritos ITS-1 e ITS-2 (do inglês, *Internal Transcribed Spacer*) (Figura 8), que separam os genes DNAr 18S, 5.8S e 28S (SIQUEIRA et al., 2010), podem ser informativos para análises populacionais (HILLIS et al., 1996). As regiões espaçadoras evoluem em uma proporção muito mais rápida do que as regiões codificantes, considerando que as substituições que ocorrem nessas áreas podem ser consideradas mutações neutras, sem restrições muito fortes (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Enquanto as regiões codificadoras mostram pouca divergência entre espécies relacionadas, as regiões intragênicas apresentam um maior grau de variabilidade (JOBST et al., 1998).

A região intergênica ITS tem sido amplamente utilizada para a inferência de relacionamentos em nível de espécie, inclusive para espécies estreitamente relacionadas, subespécies ou populações. Em especial, os marcadores ITS-1 e ITS-2 são considerados os mais úteis para táxons muito próximos que divergiram relativamente recentemente (<50 milhões de anos atrás) (MAS-COMA; BARGUES, 2009), sendo a região ITS-1 menos

conservada que a região ITS-2 (BARGUES et al., 2000). A região ITS também é tida como uma importante ferramenta evolutiva a ser explorada em organismos próximos e distantes, fornecendo *insights* sobre a evolução de sequências de DNA em geral (HERSHKOVITZ; LEWIS, 1996).

Figura 8. Esquema do complexo gênico nuclear de DNA ribossomal, com os genes das subunidades do DNAr 18S, 28S e 5.8S, além dos espaços internos transcritos (ITS-1 e ITS-2). As setas indicam a posição dos iniciadores usados nas reações de PCR e a região amplificada.



Fonte: SIQUEIRA et al., 2010.

1.3.3.2. DNA mitocondrial

O DNAm_t corresponde a um genoma relativamente simples, de herança materna (sem recombinação) e que apresenta uma taxa de evolução dez vezes mais rápida que as substituições do DNA nuclear, tornando-o uma ferramenta valiosa em estudos de genética populacional, evolução molecular e relações filogenéticas (AVISE et al., 1987). Os erros de replicação e as altas concentrações de compostos de oxigênio, capazes de danificar o DNA, aliados a um sistema de reparo ineficiente, parecem ser os responsáveis pelo acúmulo de mutações no DNAm_t (AVISE et al., 1987). O uso do DNAm_t nas últimas décadas possibilitou a elucidação dos processos evolutivos e passado demográfico de populações e espécies (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

O genoma mitocondrial constitui-se como um genoma circular de tamanho reduzido, possuindo entre 16.000 a 20.000 pares de bases (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Possui genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 RNAs transportadores (RNAts), três subunidades da enzima citocromo c oxidase (COI, COII e COIII), citocromo B (Cyt B), subunidades 6 e 8 de ATP F₀ sintase (ATP6 e ATP8) e sete subunidades da NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L) (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

Embora o DNAm_t seja um marcador amplamente utilizado, seu uso também possui limitações, uma vez que o mesmo elucida estritamente processos históricos matrilineos.

Assim, se as histórias evolutivas entre machos e fêmeas diferirem em uma espécie, este marcador não é capaz de refletir a história da espécie como um todo, mas apenas da porção feminina. Além dessa restrição, alguns autores já argumentaram recentemente que a evolução do DNAm é não-neutra, como proposto inicialmente (BALLARD; WHITLOCK, 2004).

Apesar das críticas a esse marcador, o DNAm ainda é uma ferramenta muito utilizada para estudos da subfamília Triatominae. Os estudos filogenéticos em triatomíneos com genes mitocondriais tiveram início em 1998 (GARCÍA; POWELL, 1998), e são focados, principalmente, em alguns poucos genes como COI, Cyt B e ND1, devido à dificuldade para o desenho de *primers* universais. ND1 é o gene mais conservado dentre os sete genes codificantes da NADH desidrogenase (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Já o Cyt B (citocromo oxidase B) é um gene geralmente utilizado para comparação de espécies próximas geneticamente, devido à sua alta variabilidade na terceira posição do códon (MAS-COMA; BARGUES, 2009). Em triatomíneos, esse marcador é especialmente utilizado para estudos de inferência filogenética, estruturação populacional (PAVAN; MONTEIRO, 2007; PESSOA et al., 2016), para auxiliar a descrição de novas espécies (SOUZA et al., 2016) ou mesmo para a separação de espécies crípticas (PAVAN; MONTEIRO, 2007).

1.3.4. Genética de populações

Elucidar os processos relacionados à origem e manutenção da variabilidade genética nas populações naturais é uma das tarefas realizadas pelos biólogos que trabalham com genética de populações e evolução (LEE; MITCHELL-OLDS, 2011; RODERICK et al., 2012). A genética de populações é uma área de estudo que compreende a origem, quantidade e distribuição da variação genética presente dentro e entre populações, bem como o destino desta variação no tempo e no espaço (TEMPLETON, 2011). Sequências variantes de um mesmo segmento de DNA (ou seja, cópias homólogas) são denominadas haplótipos, podendo ser geradas por meio de mutações ou por recombinação, de modo que a variação genética pode ser estudada por meio destes polimorfismos (FUTUYMA, 2005). Já a interação entre as forças evolutivas de mutação, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural determinam as frequências alélicas nas populações ao longo do tempo e também no espaço, sendo o agrupamento de populações diferenciadas conhecido como estrutura populacional (HARTL; CLARK, 2010; TEMPLETON, 2011).

Entretanto, os trabalhos com a utilização de ferramentas moleculares em genética

populacional de triatomíneos têm sido desenvolvidos em sua maioria em um contexto filogeográfico (MONTEIRO et al. 1999; MONTEIRO et al. 2004), sendo atualmente poucos os estudos direcionados à identificação das populações de triatomíneos que vivem em peridomicílio, com a capacidade de invadir e colonizar domicílios. No Brasil, *T. sordida* tem recebido uma atenção especial devido à sua ampla distribuição, tendência a invadir ambientes domésticos, associação com a reinfestação de ambientes tratados com inseticida (PESSOA et al., 2015) e pela sua competência vetorial (LOROSA et al., 2000). Ainda, em um recente estudo de modelamento de nicho ecológico, revelou-se a possibilidade dessa espécie ter uma distribuição ainda maior do que se imaginava, estando presente em outros biomas além do Cerrado, como Caatinga e Pantanal (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012). Para um planejamento e execução efetivos de iniciativas de controle vetorial, é importante investigar os níveis de variação genética, a estrutura populacional e o fluxo gênico entre populações dessa espécie (PESSOA et al., 2016).

Atualmente, em Triatominae, estudos combinados de vários genes para a mesma espécie de triatomíneo são tidos como esporádicos (MAS-COMA; BARGUES, 2009; JUSTI et al., 2014; JUSTI et al., 2016). Dessa forma, a combinação de genes nucleares de DNAr como ITS-1 e ITS-2, conjuntamente com genes de DNAm, como COI, Cyt B e ND1, tem sido considerada a melhor abordagem para estudos envolvendo espécies, subespécies, híbridos e populações de triatomíneos (MAS-COMA; BARGUES, 2009).

1.3.5. Cruzamentos Experimentais

A realização de cruzamentos experimentais pode auxiliar no entendimento da taxonomia, sistemática e dos mecanismos de isolamento que limitam o fluxo gênico, assim como possibilita avaliar o papel da hibridização natural na geração de novas variantes genéticas (que podem levar à evolução adaptativa e/ou a fundação de novas linhagens evolutivas) (ARNOLD, 1997; PÉREZ et al., 2005). Diversos estudos com cruzamentos experimentais foram conduzidos em triatomíneos (MAZZOTTI; OSÓRIO, 1941, 1942; USINGER, 1944, 1966; ABALOS, 1948; RYCKMAN, 1962; CORRÊA e ESPÍNOLA, 1964; UESHIMA, 1966; ESPÍNOLA, 1971; CARVALHEIRO; BARRETTO, 1976; FRANCA-RODRÍGUEZ et al., 1979; GALÍNDEZ et al., 1994, PÉREZ et al 2005; SCHREIBER et al., 1974; CERQUEIRA, 1982; HEITZMANN-FONTENELLE, 1984; COSTA et al., 2003; MARTÍNEZ-IBARRA et al., 2005, 2008, 2011, 2016a,b; CORREIA et al., 2013; DÍAZ et al., 2014; MENDONÇA et al., 2014, 2016; CAMPOS-SOTO et al., 2016; NEVES et al., 2020)

(Tabela 1), sendo a maioria dos estudos relacionados com a análise da viabilidade dos híbridos em primeira geração (F1) ou, no máximo, em segunda geração (F2). Embora essas análises apresentem grande valor científico, principalmente para os cruzamentos resultantes em ovos inférteis (isolamento reprodutivo pré-zigótico) ou híbridos F1 inviáveis (isolamento reprodutivo pós-zigótica por inviabilidade do híbrido), conduzir os cruzamentos até, pelo menos, a terceira geração (F3) mostra-se de grande importância, pois existem diversos fatores relacionados com o isolamento reprodutivo pós-zigótico que podem inviabilizar os híbridos a partir da F2 [como, por exemplo, o desmoronamento do híbrido, descrito recentemente na subfamília Triatominae (MENDONÇA et al., 2014; ALEVI et al., 2018)] e, dessa forma, corroborar o conceito biológico de espécie, a saber, “espécies são grupos de populações naturais que se inter cruzam real ou potencialmente e que são isoladas reprodutivamente de outros grupos (produzindo qualquer incompatibilidade reprodutiva entre os parentais, esterilidade dos híbridos ou ambos)” (MAYR et al., 1963; DOBZHANSKY, 1970).

Tabela 1. Cruzamentos experimentais realizados na subfamília Triatominae na literatura.

Cruzamentos experimentais				Resultado	
-	<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
♂	<i>Triatoma infestans</i>	X	<i>Triatoma platensis</i>	♀	F1 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 sordida</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
-	<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 melanocephala</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma melanocephala</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma vitticeps</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma vitticeps</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</i>	♀	Inférteis

♂	<i>Triatoma brasiliensis</i>	X	<i>Triatoma tibiamaculata</i>	♀	Inférteis
♂	<i>Triatoma tibiamaculata</i>	X	<i>Triatoma brasiliensis</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
♂	<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

F1: primeira geração híbrida, F2: segunda geração híbrida, N3: ninfa de terceiro instar, N5: ninfa de quinto instar. ♂: macho, ♀: fêmea. Fonte: Ravazi, 2019.

Cruzamentos híbridos foram realizados para espécies que, assim como *T. sordida*, apresentam variação intraespecífica, e resultaram em ausência (PANZERA et al., 2004; DIAS et al., 2014) e presença (GARCÍA et al., 2013) de isolamento reprodutivo: cruzamentos de *T. infentans* proveniente de regiões Andinas e não Andinas, por exemplo, não apresentaram barreiras de isolamento reprodutivo e alteração na meiose (PANZERA et al., 2004); cruzamentos de *R. nasutus* (*dark*) com o padrão típico de *R. nasutus* também não apresentaram barreiras que inviabilizassem a prole desses triatomíneos (DIAS et al., 2014). Todavia, *T. dimidiata* de diferentes localidades foram cruzados e observou-se barreiras reprodutivas (GARCÍA et al., 2013), sendo que, recentemente, duas novas espécies foram descritas a partir dos polimorfismos de *T. dimidiata* que apresentavam barreiras reprodutivas: *T. mopan* Dorn et al. (2018) e *T. huehuetenanguensis* Lima-Cordón et al. (2019) (DORN et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019).

1.3.5.1. Mecanismos de isolamento reprodutivo pré-zigóticos

a) Isolamento ecológico

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 - *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; WYGODZINSKY, 1951). O único elo que permite a relação entre essas espécies são os galinheiros (ABALOS, 1948; BARRETTO, 1976).

b) Isolamento mecânico

Na subfamília Triatominae, o isolamento mecânico está associado com a incompatibilidade das genitálias e acontece com certa frequência entre os cruzamentos experimentais, sobretudo, na maioria das vezes, em 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, o que ressalta a importância de análises morfológicas para a caracterização das genitálias no caso de inviabilidade dos ovos nos cruzamentos interespecífica.

c) Isolamento gamético

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* Sherlock & Serafim, 1967 e *T. infestans* (CERQUEIRA, 1982) e entre *T. brasiliensis* e *T. petrocchiae* Pinto & Barreto, 1925 (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. Dessa forma, destacamos a importância dessas análises para os cruzamentos que não resultam em F1.

1.3.5.2. Mecanismos de isolamento reprodutivo pós-zigóticos

a) Inviabilidade do híbrido

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; HYPISA et al., 2002)].

b) Esterilidade do híbrido

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 apresentaram 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., 1974) (que apresentaram espermátides e espermatozoides gigantes e anômalos).

c) Desmoronamento do híbrido

Como já mencionado anteriormente, esse tipo de isolamento pós-zigótico foi recentemente descrito para os triatomíneos e está relacionado com a inviabilidade híbrida a partir da F2, ressaltando, mais uma vez, a importância das análises da viabilidade híbrida até, pelo menos, a segunda geração. Mendonça et al. (2014) analisaram a espermatogênese de híbridos em F1 [resultantes do cruzamento experimental entre *T. lenti* e *T. sherlocki* Papa et al. (2002)] 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).

O conceito de especiação críptica apontado para *T. sordida* por Noireau et al. (1998) está pautado em espécies morfológicamente indistinguíveis que foram classificadas dentro de apenas um táxon nominal (BICKFORD et al., 2007). Esse conceito já foi erroneamente considerado como sinônimo de espécies irmãs, as quais conotam ancestralidade comum e não necessariamente relação morfológica (SÁEZ; LOZANO, 2005; BICKFORD et al., 2007). Além disso, espécie críptica também foi associada de forma errada com eventos recentes de especiação que ainda não resultaram na fixação de diferenças morfológicas (KNOWLTON, 1993; GUSTAFSSON et al., 2014; STRUCK et al., 2018).

Do ponto de vista cromossômico, molecular, izoensimático e pelo padrão de hidrocarbonetos cuticulares, *T. sordida* se diferencia em mais de um táxon (PANZERA et al., 1997, 2015; NOIREAU et al., 1998; CALDERÓN-FERNÁNDEZ e JUÁREZ, 2013). Contudo, embora todos os autores assumam que a variação intraespecífica observada em *T. sordida* seja resultado de especiação críptica, estudos morfológicos são necessários para comprovar esse evento evolutivo (uma vez que divergências morfológicas derrubam a hipótese de especiação críptica), pois a única comparação morfológica realizada em *T. sordida* proveniente de diferentes países (Brasil, Bolívia e Argentina) foi realizada por Nattero et al. (2017) que diferenciaram *T. sordida* da Argentina dos exemplares provenientes do Brasil e da Bolívia a partir de dados morfométricos da asa, ressaltando a importância de estudos adicionais para confirmar a validade específica do(s) novo(s) táxon(s). Além disso, com base na diferenciação fenotípica de *T. sordida* da Argentina quando comparada às outras localidades, Nattero et al. (2017) sugerem que a(s) nova(s) espécie(s) putativa(s) de *T. sordida* pode(m) não ser críptica(s).

5. CONCLUSÕES

- a) Por meio de marcadores citogenéticos (Bandamento-C e CMA₃/DAPI), foi verificado que todas as populações brasileiras de diferentes biomas de *T. sordida* analisadas apresentam uma diversidade genética extremamente baixa, uma vez que todos os espécimes, independentemente da localidade, apresentaram as mesmas características:
- Bandamento-C: vários corpos heterocromáticos observados durante a prófase meiótica inicial, sendo um deles formado pelos cromossomos sexuais associados rodeado por algumas regiões heterocromáticas autossômicas; a maioria dos autossomos apresentam um bloco C-heterocromático em uma extremidade cromossômica e o cromossomo X pode apresentar um pequeno bloco C durante a metáfase meiótica;
 - Bandamento CMA₃/DAPI: vários corpos ricos em CG dispersos no núcleo da prófase meiótica inicial, sendo um deles formado pela associação do cromossomo sexual X circundado por alguns autossomos e apenas o cromossomo sexual Y rico em regiões AT.
- b) Por meio de marcadores moleculares mitocondriais (Cyt B e ND1), foi corroborada a baixa diversidade genética das populações brasileiras de *T. sordida*, evidenciada pelos seguintes fatores: baixa diversidade nucleotídica, alta diversidade haplotípica, baixa distância genética entre todas as localidades, alto valor do índice F_{st} , assim como a formação de um clado monofilético de todas as populações brasileiras amostradas e separado de espécimes da Argentina. Portanto, todos os espécimes brasileiros podem ser agrupados como *T. sordida sensu stricto*, o citótipo de maior importância na transmissão doméstica e peridoméstica da doença de Chagas.
- c) Com base na taxonomia integrativa, por meio de análises morfológicas, morfométricas, moleculares e cruzamentos experimentais, combinados com dados disponíveis na literatura, demonstramos que o citótipo *T. sordida* da Argentina é uma nova espécie, confirmando o *status* específico de *T. rosai* sp. nov.
- d) Com base na distância genética extremamente baixa, associada à ausência de barreiras reprodutivas pré-zigóticas e pós-zigóticas, sugerimos que *T. sordida* La Paz representa apenas um polimorfismo cromossômico de *T. sordida sensu stricto* e não um novo táxon, como o caso do citótipo *T. sordida* Argentina.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F.; PAVAN, M. G.; JARAMILLO-O, 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, supl. 1, 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 Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional de Tucumán**, 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.
- ALEVI, K. C. C.; OLIVEIRA, J.; GARCIA, A. C. C.; CRISTAL, D. C.; DELGADO, L. M. G.; BITTINELLI, I. F.; REIS, Y. V.; RAVAZI, A.; OLIVEIRA, A. B. B.; GALVÃO, C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; MADEIRA, F. F. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. **Insects**, v. 11, n. 830, 2020.
- ALEVI, K. C. C.; PINOTTI, H.; ARAÚJO, R. F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A.; MENDONÇA, V. J. Hybrid collapse confirm the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, p. 475-477, 2018.
- ALMEIDA, L. M.; CARARETO, C. M. A. Gonadal hybrid dysgenesis in *Drosophila sturtevantii* (Diptera, Drosophilidae). **Ilheringia**, v. 92, p. 71-79, 2002.
- ANGHEBEN, A.; BOIX, L.; BUONFRATE, D.; GOBBI, F.; BISOFFI, Z.; PUPELLA, S.; GANDINI, G.; APRILI, G. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. **Blood Transfusion**, v. 13, n. 4, p. 540-550, 2015.
- ARNOLD, M. L. **Natural Hybridization and Evolution**. University Press, New York, Oxford, 215 pp, 1997.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 2000, 447 pp.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual review of ecology and systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BALLARD, J. W.; WHITLOCK, M. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 729-744, 2004.

- BARGUES, M. D.; KLISIEWICZ, D. R.; GONZALEZ-CANDELAS, F.; RAMSEY, J.; MONROY, C.; PONCE, C.; SALAZAR-SCHETTINO, P. M.; PANZERA, F.; ABAD-FRANCH, F.; SOUSA, O. E.; SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J. P.; GUHL, F.; MAS-COMA, S. Phylogeography and genetic variations of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2: e233, 2008.
- BARGUES, M. D.; MARCILLA, A.; DUJARDIN, J. P.; MAS-COMA, S. **Triatominae vectors of Chagas disease**: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. In: Alvar, J., Baker, J.R. (Eds.), *Molecular Tools for Epidemiological Studies and Diagnosis of Leishmaniasis and Selected Other Parasitic Diseases*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 96, p. 159–164, 2002.
- BARGUES, M. D.; MARCILLA, A.; RAMSEY, J. M.; DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; MAS-COMA, S. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 567–573, 2000.
- 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.
- BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.
- BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 456-466, 2015.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, p. 148-155, 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.
- CARCAVALLO, R. U.; GALÍNDEZ-GIRÓN, I.; JURBERG, J.; LENT, H. **Atlas of Chagas disease vectors in the Americas/Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**, Editora Fiocruz, 1999.
- CARVALHEIRO, J. R.; BARRETTO, M. P. Estudos sobre reservatórios e vetores 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, P. H. **Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)**. 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-23092011-112658/pt-br.php>. Acesso: 17 de dezembro de 2019.
- CASTRO, G. B.; MACHADO, E. M. M.; BORGES, E. C.; LOROSA, E. S., ANDRADE, R. E; DIOTAIUTI, L.; AZEREDO, B. V. M. *Trypanosoma cruzi* Peridomiciliar Transmission by *Triatoma sordida* in the Municipality of Patis, Gerais State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 434, 1997.
- CERQUEIRA, R. L. **Estudos sobre populações de triatomíneos silvestres encontrado em Santo Inácio – Bahia**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 68p, 1982.
- CHAGAS, C. R. J. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n. sp, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- 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.
- COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-a comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 277–282, 2015.
- CRACRAFT, J. **Species concepts and speciation analysis**. In: JOHNSTON, R. F. (Ed.). Current ornithology. vol. 1. Boston: Springer, 1983. cap. 6, p. 159-187.
- DALE, C.; JUSTI, S. A.; GALVÃO, C. *Belminus santosmalletae* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae): New Species from Panama, with an Updated Key for *Belminus* Stål, 1859 Species. **Insects**, n. 12, v. 686, p. 1-12, 2021.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 1-4, 2012.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879-886, 2007.

- DE VAIO, E. S.; GRUCCI, B.; CASTAGNINO, A. M.; FRANCA, M. E.; MARTINEZ M. E. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). **Genetica**, v. 67, p. 185-191, 1985.
- DIAS, E.; LARANJA, F. S.; NOBREGA, G. Doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 42, n. 3, p. 495–581, 1945.
- DIAS, F. B. S.; JARAMILLO-O, N.; DIOTAIUTI, L. Description and characterization of the melanic morphotype of *Rhodnius nasutus* Stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 637–641, 2014.
- DIAS, J. C. P.; RAMOS, A. N.; GONTIJO, E. D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; COURA, J. R. et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 3–60, 2016.
- 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.
- DIOTAIUTI, L.; CARNEIRO, M.; LOIOLA, C. C. P.; SILVEIRA NETO, H. V.; COUTINHO, R. M.; DIAS, J. C. P. Alternativa de controle do *Triatoma sordida* no triângulo mineiro. I. Borrifação parcial (intradomicílio) no município de Douradoquara, MG, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, p. 199-203, 1988.
- DIOTAIUTI, L.; LOIOLA, C. F.; FALCÃO, P. L.; DIAS, J. C. P. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n. 03, p. 237-245, 1993.
- DIOTAIUTI, L.; PEREIRA, A. S.; LOIOLA, C. F.; FERNANDES, A. J.; SCHOFIELD, J. C.; DUJARDIN, J. P.; DIAS, J. C. P.; CHIARI, E. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 443-448, 1995.
- DOBZHANSKY, T. **Genetics of the Evolutionary Process**, New York: Columbia University Press, pp. 71-93, 1970.
- DONOGHUE, M. J. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. **Bryologist**, v. 88, n. 3, p. 172-181, 1985.
- DORN, P. L.; CALDERON, C.; MELGAR, S.; MOGUEL, B.; SOLORZANO, E.; DUMONTEIL, E.; RODAS, A.; DE LA RUA, N.; GARNICA, R.; MONROY, C. Two Distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) Taxa Are Found in Sympatry in Guatemala and Mexico. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 3, v. 3: e393, 2009.
- DORN, P. L.; JUSTI, S. A.; DALE, C.; STEVENS, L.; GALVÃO, C.; LIMA-CORDÓN, R.; MONROY, C. Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Zookeys**, v. 775, p. 69-95, 2018.

DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, J.; PANZERA, F. Los vectores de la enfermedad de Chagas. **Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer**, 2002.

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

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491, 1992.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMPRAPA-CENARGEN, 200 p., 1998.

FORATTINI, O. P.; FERREIRA, O. A.; RABELLO, E. X.; BARATA, J. M.; SANTOS, J. L. F. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XVII. Desenvolvimento da domiciliação triatomínea regional, em centro de endemismo de *Triatoma sordida*. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, p. 159-199, 1983.

FORATTINI, O. P.; FERREIRA, O. A.; ROCHA E SILVA, E. O.; RABELLO, E. X. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase americana. VI. Persistência do *Triatoma sordida* após alteração ambiental e suas possíveis relações com a dispersão da espécie. **Revista de Saúde Pública**, v. 8, p. 265-82, 1974.

FORATTINI, O. P.; FERREIRA, O. A.; ROCHA e SILVA, E. O.; RABELLO, E. X. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana. VII. Permanência e mobilidade do *Triatoma sordida* em relação aos ecótopos artificiais. **Revista de Saúde Pública**, v. 9, p. 467-476, 1975.

FORATTINI, O. P.; ROCHA e SILVA, E. O. R.; FERREIRA, O. A.; RABELLO, E. X.; PATTOLI, D. G. B. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana. III — Dispersão local de triatomíneos, com especial referência ao *Triatoma sordida*. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, p. 193-205, 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.

FRANCO, D. P. **Autodescobrimento**: Uma busca interior (Série Psicológica Joanna de Ângelis Livro 6). Salvador: Leal Livraria, 143 p., 2018.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. 618 p.

- FUTUYMA, D. J. **The origin of genetic variation**. In: _____ (Ed.). *Evolution*. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. p. 161-188.
- 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.
- 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.
- GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil** – Série Zoologia: Guias e Manuais de Identificação. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 288 p., 2014.
- GALVÃO, C. Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, quase três séculos de história. In: OLIVEIRA, J.; ALEVI, K. C. C.; CAMARGO, L. M. A.; MENEGUETTI, D. U. O. (org.). **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores**. Stricto Sensu: Rio Branco, 2020, pp. 9-37.
- 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.
- GARDIM, S.; ALMEIDA, C. E.; TAKIYA, D. M.; OLIVEIRA, J.; ARAÚJO, R. F.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 74-79, 2014.
- GONZÁLEZ-BRÍTEZ, N. Population dynamics of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) related to *Trypanosoma cruzi* in Paraguay with emphasis on *Triatoma sordida*. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 11, n. 2, p. 105-11, 2013.
- GONZÁLEZ-BRÍTEZ, N.; CARRASCO, H. J.; PURROY, C. E. M.; FELICIANGELI, M. D.; MALDONADO, M.; LÓPEZ, E.; SEGOVIA, M. J.; ARIAS, A. R. Genetic and morphometric variability of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the eastern and western areas of Paraguay. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. 149, p. 1-9, 2014.
- GORLA, D. E.; JURBERG, J.; CATALÁ, S. S.; SCHOFIELD, C. J. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 379-385, 1993.
- GRAND, W. S.; BOWEN, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, v. 89, p. 415-426, 1998.
- GUERRA, A. L. **Análise molecular do subcomplexo Brasiliensis (Hemiptera, Triatominae)**. 2016. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/136463>>. Acesso: 18 de dezembro de 2019.

- GUERRA, A. L.; BORSATTO, K. C.; TEIXEIRA, N. P. D.; MADEIRA, F. F.; OLIVEIRA, J. ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ALEVI, K. C. C. Revisiting the homoploid hybrid speciation process of the *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 (Hemiptera, Triatominae) using cytogenetic and molecular markers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 4, p. 911-913, 2019.
- GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVAO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A. T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.
- GURGEL-GONCALVES, R.; KOMP, E.; CAMPBELL, L. P.; KHALIGHIFAR, A.; MELLEBRUCH, J.; MENDONÇA, V. J.; OWENS, H. L.; DE LA CRUZ FELIX, K.; PETERSON, A. T.; RAMSEY, J. M. Automated identification of insect vectors of Chagas disease in Brazil and Mexico: the Virtual Vector Lab. **PeerJ – Life & Environment**, 5:e3040, 2017.
- GUSTAFSSON, A. L. S.; SKREDE, I.; ROWE, H. C.; GUSSAROVA, G.; BORGÉN, L.; RIESEBERG, L. H.; BROCHMANN, C.; PARISOD, C. Genetics of cryptic speciation within an arctic mustard, *Draba nivalis*. **PLoS One**, v. 9, p. e93834, 2014.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.
- 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.
- HERSHKOVITZ, M.A.; LEWIS, L. A. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 9, p. 1276-1295, 1996.
- HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 655 p. 1996.
- HOBEL, G.; GERHARDT, H. C. Reproductive character displacement in the acoustic communication system of green frogs (*Hyla cinerea*). **Evolution**, v. 57, p. 894-904, 2003.
- HOLLANDER, J.; SMADJA, C. M.; BUTLIN, R. K.; REID, D. G. Genital divergence in sympatric sister snails. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, p. 210-215, 2013.
- HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, p. 601-606, 2014.
- HOTEZ, P. J. The giant anteater in the room: Brazil's neglected tropical diseases problem. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.2, e177, 2008.

- HOWARD, E. J.; XIONG, X.; CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; BUEKENS, P. Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis. **BJOG**, v. 121, n. 1, p. 22–33, 2015.
- HYPISA, 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 and Evolution**, v. 23, p. 447-457, 2002.
- JOBST, J.; KING, K.; HEMLEBEN, V. Molecular evolution of the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationship among species of the family Cucurbitaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 204-219, 1998.
- JORGENSEN, R.; CLUSTER, P. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 1238–1247, 1988.
- JURBERG, J.; GALVÃO, C.; LENT, H.; MONTEIRO, F.; LOPES, M. C.; PANZERA, F.; PÉREZ, R. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prozen & Ronderos, 1967 (Hemiptera, Reduviidae). **Entomologia y Vectores**, v. 5, p. 107-122, 1998.
- JUSTI, S. A.; GALVÃO, C.; SCHRAGO, C. G. Geological Changes of the Americas and their Influence on the Diversification of the Neotropical Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-22, 2016.
- JUSTI, S. A.; RUSSO, C. A.; MALLET, J. R. S.; OBARA, M. T., GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 149, 2014.
- KIMURA, M. J. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies do nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.
- KNOWLTON, N. Sibling species in the sea. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 24, p. 189-216, 1993.
- LEE, C. R.; MITCHELL-OLDS, T. Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 4631–4642, 2011.
- LENT, H.; WYGODZYNSKY, 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. 123520, 1979.
- LIMA-CORDÓN, R. A.; MONROY, M. C.; STEVENS, L.; RODAS, A.; RODAS, G. A.; DORN, P. L.; JUSTI, S. A. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, v. 820, p. 51-70, 2019.
- LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 247-253, 2009.

- LOROSA, E. S.; ANDRADE, R. E.; PEREIRA, C. A.; SANTOS, S. M.; JURBERG, J. Estudo das fontes alimentares *Triatoma sordida* (Stal, 1859) do Estado do Mato Grosso do Sul através da comparação das técnicas de precipitina e imunodifusão dupla. **Entomologia y Vectores**, v. 6, p. 156-165, 1999a.
- LOROSA, E. S.; ANDRADE, R. E.; PEREIRA, C. A.; SANTOS, S. M.; JURBERG, J. Identificação das fontes alimentares de *Triatoma sordida* (Stal, 1859), (Hemiptera Reduviidae) na região norte de Goiás, Brasil, através da técnica de precipitina. **Entomologia y Vectores**, v. 6, p. 291-304, 1999b.
- LOROSA, E. S.; BULHÕES, D. M.; CUNHA, V.; ANDRADE, R. E.; FIGUEREDO, J. F.; JURBERG, J. Study on the Feeding Behavior of *Triatoma Sordida* (Stal 1859) (Hemiptera – Reduviidae) Captured in Mato Grosso State Brazil using the precipitin technique and degree of infectivity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 250, 1999c.
- LOROSA, E. S.; CAHET, D. M. B.; ANDRADE, R. E.; FIGUEIREDO, J. F.; JURBERG, J. O uso da técnica de precipitação no estudo do comportamento alimentar e grau de infectividade em *Triatoma Sordida* (Stal, 1859) (Hemiptera – Reduviidae), coletados no estado de Mato Grosso, Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 7, p. 227-237, 2000.
- MACCHIAVERNA, N. P.; GASPE, M. S.; ENRIQUEZ, G. F.; TOMASSONE, L.; GÜRTLER, R. E.; CARDINAL, M. V. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma sordida* before and after community-wide residual insecticide spraying in the Argentinean Chaco. **Acta Tropica**, v. 143, p. 97-102, 2015.
- MADEIRA, F. F.; REIS, Y. V.; BITTINELLI, I. F.; DELGADO, L. M. G.; OLIVEIRA, J.; MENDONÇA, V. J.; MOREIRA, F. F. F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ALEVI, K. C. Genetic structure of Brazilian populations of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Triatominae) by means of chromosomal markers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, p. 907-910, 2019.
- MARCILLA, A.; BARGUES, M. D.; RAMSEY, J. M.; MAGALLON-GASTELUM, E.; SCHETTINO, P. M. S.; ABAD-FRANCH, F.; DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J.; MASCOMA, S. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas' disease. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 18, p. 136-142, 2001.
- MARTÍNEZ-IBARRA, J. A.; GRANT-GUILLÉN, Y.; DELGADILLO-ACEVES, I. N.; ZUMAYA-ESTRADA, F. A.; ROCHA-CHÁVEZ, G.; SALAZAR-SCHETTINO, 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.; MORALES-CORONA, Z. Y.; MORENO-RUIZ, M. G.; DEL RIEGO-RUIZ, R.; MUNDO-BARAJAS, M. A. Híbridos naturales y fértiles entre especies del complejo *Meccus phyllosomus* (Hemiptera: Reduviidae) en Jalisco, México. **Entomological Society of Mexico**, v. 4, p.734-738. 2005.

- 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. 202-206, 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* (Hemiptera: Reduviidae) and Their Hybrids. **Medical and Veterinary Entomological**, v. 53, p. 928-934, 2016a.
- 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.
- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, p. 817–824, 2012.
- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, p. 103-110, 2016.
- MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. **Acta tropica**, v. 110, p. 112-136, 2009.
- MAYDEN, R. L. **A hierarchy of species concepts**: the denouement in the saga of the species problem. In: CLARIDGE, M. F.; DAWAH, H. A.; WILSON, M. R. (Ed.). *Species: the units of biodiversity*. London: Chapman & Hall, 1997. cap. 19, p. 381-423.
- MAYR, E. **Animal Species and Evolution**. Harvard University Press, Cambridge, 1963.
- MAZZOTTI, L.; OSORIO, M. T. Resultados obtenidos en cruzamientos con especies diferentes de *Triatoma*. **Revista da Faculdade de Bogotá**, 10: 159-160, 1941.
- MAZZOTTI, L.; OSORIO, M. T. Cruzamientos experimentales entre varias especies de triatomas. *Medicina*, v. 22, p. 215-222, 1942.
- 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.
- MENDONÇA, V. J.; SILVA, M. T. A.; ARAÚJO, R. F.; JÚNIOR, J. M.; JÚNIOR, M. B.; ALMEIDA, C. E.; COSTA, J.; GRAMINHA, M. A. S.; CICARELLI, R. M. B.; ROSA, J. A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* Complex. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 858-864, 2009.
- MISHLER, B. D. The morphological, developmental, and phylogenetic basis of species concepts in bryophytes. **Bryologist**, v. 88, n. 3, p. 207-214, 1985.
- MONTEIRO, F. A.; DONNELLY, M. J.; BEARD, C. B.; COSTA, J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 46-56, 2004.
- MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A.; BEARD, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends in Parasitology**, v.17, p. 344–347, 2001.
- MONTEIRO, F. A.; JURBERG, J.; LAZOSKI, C. Very Low Levels of Genetic Variation in Natural Peridomestic Populations of the Chagas Disease Vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in Southeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 2, p. 223-227, 2009.
- MONTEIRO, F. A.; PEREZ, R.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; GALVAO, 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. 229-238, 1999.
- NASCIMENTO, J. D.; RAVAZI, A.; ALEVI, K. C. C.; PARDO-DIAZ, C.; SALGADO-ROA, F. C.; ROSA, J. A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; OLIVEIRA, J.; HERNÁNDEZ, C.; SALAZAR, C.; RAMÍREZ, 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, e0211285, 2019.
- NATTERO J., PICCINALI R.M., LOPES C.M., HERNANDEZ M.L.; ABRAHAN L; LOBBIA P.A.; RODRÍGUEZ C.S., CARBAJAL-DE-LA-FUENTE N.A. Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 412, p.1-14, 2017.
- NELSON, G.; PLATNICK, N. I. **Systematics and biogeography**: cladistics and vicariance. New York: Columbia University Press, 1981. xi+567 pp.

- NEVES, J. M. S.; SOUZA, P. S.; OLIVEIRA, J.; RAVAZI, A.; MADEIRA, F. F.; REIS, Y. V.; BORTOLOZO, A. B.; PINOTTI, H.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ROSA, J. A.; ALEVI, K. C. C. Prezygotic isolation confirms the exclusion of *Triatoma melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata* of the *T. brasiliensis* subcomplex (Hemiptera, Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 79, p. 104149, 2020.
- NIXON, K. C.; WHEELER, Q. D. An amplification of the phylogenetic species concept. **Cladistics**, v. 6, n. 3, p. 211-223, 1990.
- NOIREAU, F.; GUTIERREZ, T.; ZEGARRA, M.; FLORES, R.; BRENIÈRE, F.; CARDOZO, L.; DUJARDIN, J. P. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the bolivian Chaco. **Tropical Medicine & International Health**, v. 3, n. 5, p. 364-372, 1998.
- NOUVELLET, P.; CUCUNUBÁ, Z. M.; GOURBIÈRE, S. Ecology, Evolution and Control of Chagas Disease: A Century of Neglected Modelling and a Promising Future. **Advances in Parasitology**, v. 87, p. 135–191, 2015.
- OLIVEIRA, A. B. B. **Citotaxonomia de *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e influência desse agente etiológico nas células de *Triatoma infestans* (Klug, 1834)**. 2020. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/193512>>. Acesso em: 30 de junho de 2021.
- OLIVEIRA, A. W.; SILVA, I. G. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 204-208, 2007.
- OLIVEIRA, J.; ALEVI, K. C. C. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, p. 434-435, 2017.
- OLIVEIRA, J.; AYALA, J. M.; JUSTI, S. A.; ROSA, J. A.; GALVÃO, C. Description of a new species of *Nesotriatoma* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Journal of Vector Ecology**, v. 43, p. 148-157, 2018.
- ONYABE, D. Y.; CONN, J. E. Intragenomic heterogeneity of a ribosomal DNA spacer (ITS2) varies regionally in the neotropical malaria vector *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). **Insect Molecular Biology**, v. 8, p. 435–442, 1999.
- PADILLA, N. A.; MONCAYO, A. L.; KEIL, C. B.; GRIJALVA, M. J.; VILLACÍS, A. G. Life Cycle, Feeding, and Defecation Patterns of *Triatoma carrioni* (Hemiptera: Reduviidae), under Laboratory Conditions. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, n. 3, p. 617-624, 2019.
- PAHO. **Chagas in the Americas**. 2017. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13566:chagas-in-americas&Itemid=40721&lang=pt. Acesso: 15 de junho de 2020.
- PANZERA, F.; DUJARDIN, J. P.; NICOLINI, P.; CARACCIO, M. N.; ROSE V.; TELLEZ, T. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. **Emerging Infection Disease**, v. 10, p. 438-446, 2004.

- PANZERA, F.; HORNOS, S.; PERERA, 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, p. 732-739, 1997.
- PANZERA, F.; PITA, S.; NATTERO, J.; PANZERA, Y.; GALVÃO, C.; CHAVEZ, T.; CHAVEZ, T.; DE ARIAS, A. R.; TÉLLEZ, L. C.; NOIREAU, F. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1, 2015.
- PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, p. 751-758, 2007.
- PELLI, A.; DA SILVA, M. A.; SARMENTO, F. R.; MARTINS, E.; DA MATA, S. A.; DOMINGUES, M. A.; RAMIREZ, L. E. Population parameters for *Triatoma sordida* Stal, 1859: the most frequent vector for Chagas disease in the Triangulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 25-28, 2007.
- PÉREZ DE ROSAS, A. R.; SEGURA, E. L.; FICHERA, L.; GARCIA, B. A. Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. **Genetica**, v. 133, n. 3, p. 247-60, 2008.
- 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, n. 7, p. 1401-12, 2007.
- PÉREZ, R.; HÉRNANDEZ, 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.
- PESSOA, G. C. D. A.; OBARA, M. T.; REZENDE, J. C.; DE MELLO, B. V.; FERRAZ, M. L.; DIOTAIUTI, L. Deltamethrin toxicological profile of peridomestic *Triatoma sordida* in the North of Minas Gerais, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 08, p. 263-269, 2015.
- PESSOA, G. C. D. A.; SOUSA, T. N. D.; SONODA, I. V.; DIOTAIUTI, L. Assessing the mitochondrial DNA diversity of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 322-329, 2016.
- PINTO, C. Classification de genres d'hémiptères de la famille Triatomidae (Reduviidae). **Boletim Biológico**, v. 8, p. 103-114, 1927.
- PIRES, H. H. R.; BORGES, E. C.; LOROSA, E. S.; ANDRADE, R. E.; DIOTAIUTI, L. Peridomiciliary infestation of *Triatoma sordida* in the municipality of Serra do Ramalho, Bahia state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 431, 1997.

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

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.

RAMBAUT, A. **FigTree** – Tree Figure Drawing Tool Version v.1.4.3. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>, 2016.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, W.; DRUMMOND, A. J. **Tracer** – MCMC Trace Analysis Tool Version v. 1.6.0. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>, 2013.

RAMOS, L. J.; SOUZA, J. L.; SOUZA, C. R.; OLIVEIRA, J.; ROSA, J. A.; CAMARGO, L. M. A.; CUNHA, R. M.; MENEGUETTI, D. U. O. First report of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre and Brazilian Western Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n.1, p. 77-79, 2018.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

RAVAZI, A. **Estudo sobre hibridização na tribo Rhodniini (Hemiptera, Reduviidae): dinâmica evolutiva, viabilidade reprodutiva, caracterização morfo-molecular e suas implicações taxonômicas**. 2019. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/181029>>. Acesso em: 30 de junho de 2021.

RIBEIRO JR, G.; SANTOS, C. G. S.; LANZA, F.; REIS, J.; VACCAREZZA, F.; DINIZ, C.; MIRANDA, D. L. P.; ARAÚJO, R. F.; CUNHA, G. M.; CARVALHO, C. M. M.; FONSECA, E. O. L.; SANTOS, R. F.; SOUSA, O. M. F.; REIS, R. B.; ARAÚJO, W. N.; GURGEL-GONÇALVES, R.; REIS, M. G. Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 12, p. 604, 2019.

RILEY, R. The secondary pairing of bivalents with genetically similar chromosomes. **Nature**, v. 185, p. 751-752, 1966.

RODERICK, G. K.; CROUCHER, P. J. P.; VANDERGAST, A. G.; GILLESPIE, R. G. Species differentiation on a dynamic landscape: shifts in metapopulation genetic structure using the chronology of the hawaiian archipelago. **Evolutionary Biology**, v. 39, p. 192-206, 2012.

RODRÍGUEZ-PLANES, L. I.; GASPE, M. S.; ENRIQUEZ, G. F.; GÜRTLER, R. E. Impacts of residual insecticide spraying on the abundance and habitat occupancy of *Triatoma sordida* and co-occurrence with *Triatoma infestans*: A three-year follow-up in northeastern Argentina. **Acta Tropica**, v. 202, 105251, 2020.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

- 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, 1992.
- ROSEN, D. E. Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: revisionary studies and comparative biogeography. **Bulletin American Museum of Natural History**, v. 162, p. 267-376, 1979.
- ROSSI, J. C. N.; DUARTE, E. C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Factors associated with the occurrence of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) in rural localities of Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 192-200, 2015.
- ROZAS, J.; FERRER-MATA, A.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; GUIRAO-RICO, S.; LIBRADO, P.; RAMOS-ONSINS, S. E.; SÁNCHEZ-GRACIA, A. Dna SP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, p. 3299-3302, 2017.
- RYCKMAN, R. E. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North América (Hemiptera: Reduviidae) (Rodentia: Cricetidae). **University California Public Entomology**, v. 27, p. 93-240, 1962.
- SÁEZ, A.; LOZANO, E. Body doubles. **Nature**, v. 433, p. 111, 2005.
- SÁNCHEZ, Z.; GUILLÉN, L.; PINEDA, D.; PAREDES, B.; RUSSOMANDO, G. Técnicas moleculares integradas a la vigilancia entomológica de vectores de la enfermedad de Chagas: Estudio del vector secundario *Triatoma sordida* en la Región Oriental del Paraguay. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud**, v. 18, n. 1, p. 76-83, 2020.
- 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.
- SCHMID, M. Chromosome banding in Amphibia. IV. Differentiation of GC and AT-rich regions in Anura. **Chromosoma**, v. 77, p. 83-103, 1980.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: A software for population genetics data analysis. v. 2.000. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, 2000.
- SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta tropica**, v. 110, n. 2, p. 88-100, 2009.
- 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, n. 1-2, p. 141-151, 2006.

SILVA, R. A.; SCANDAR, S. A.; PAULIQUÉVIS-JÚNIOR, C.; SAMPAIO, S. M.; RODRIGUES, V. L. Ampliação de raio de pesquisa de triatomíneos na atividade de atendimento às notificações em área de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 339-43, 2005.

SILVEIRA, A. C. Entomological survey (1975-1983). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, suppl. 2, p. 26-32, 2011.

SILVEIRA, A. C.; PEÑARADA-CARRILLO, R.; LOROSA, E. S.; LEITE, J.; VINHAES, M. C.; CASTRO, C.; PRATA, A.; MACÊDO, V. Evaluation of the impact of chemical control measures and entomological surveillance on Chagas' disease in the counties of Mambáí and Buritinópolis, Goiás State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, 549-557, 2001.

SIMPSON, G. G. The species concept. **Evolution**, v. 5, n. 4, p. 285-298, 1951.

SIQUEIRA, F. F.; SANDES, S. H. C.; CAMPOS, S. H. C.; DA FONSECA, C. G.; MARTINS, R. P.; DRUMOND, M. A.; CARVALHO, M. R. S. Análise filogenética do minhocaçu *Rhinodrilus alatus*, Righi 1971 (glossoscolecidae: annelida) baseada em sequências dos genes de rDNA 5.8S, do espaço interno transcrito (its1) e da subunidade i da citocromo C oxidase mitocondrial. **Acta Zoológica Mexicana**, (n.s.), Especial, p. 1-19, 2010.

SOARES, A. C.; ARAÚJO, R. N.; CARVALHO-TAVARES, J.; GONTIJO, N. F.; PEREIRA, M. H. Intravital microscopy and image analysis of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) hematophagy: The challenge of blood intake from mouse skin. **Parasitology International**, v. 63, n. 1, p. 229-236, 2014.

SORIANO-ARANDES, A.; ANGHEBEN, A.; SERRE-DELCOR, N.; TREVIÑO-MARURI, B.; Gómez I Prat, J.; JACKSON, Y. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 5, p. 590-596, 2016.

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

STRUCK, T. H.; FEDER, J. L.; BENDIKSBY, M.; BIRKELAND, S.; CERCA, J.; GUSAROV, V.; KISTENICH, S.; LARSSON, K. H.; LIOW, L. H.; NOWAK, M. D.; STEDJE, B.; BACHMANN, L.; DIMITROV, D. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 33, p. 153-163, 2018.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. Vectorial problematic of the Chagas disease. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 11, n. 1, p. 44-47, 2004.

TARTAROTTI, E.; CERON, C. R. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). **Biochemical genetics**, v. 43, n. 7-8, p. 365-373, 2005.

TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011. 705 pp.

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

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

URDANETA-MORALES, S. Chagas' disease: an emergent urban zoonosis. The caracas valley (Venezuela) as an epidemiological model. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. 265, p. 1-13, 2014.

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, R. E. The Biosystematics of Triatominae. **Annual Review of Entomology**, v. 11, p. 309-329, 1966.

VERMELHO, A. B.; RODRIGUES, G. C.; SUPURAN, C. T. Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 2, p. 145-158, 2020.

WHELAN, S.; LIÒ, P.; GOLDMAN, N. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 5, p. 262-272, 2001.

WILEY, E.O. The evolutionary species concept reconsidered. **Systematic Zoology**, v. 27, n. 1, p. 17-26, 1978.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/disease/en>>. Acesso: 14 de maio de 2021, 2020b.

WHO. **Neglected tropical disease**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso: 14 de maio de 2021, 2020a.

WHO. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2013.

WHO. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2010.

WRIGHT, S. Vol. 4: **Variability within and among natural populations**. Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: University of Chicago Press, 1978.

YANG, Z.; RANNALA, B. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, p. 303–314, 2012.

ZHAO, Y; GALVÃO, C.; CAI, W. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. **ZooKeys**, v. 1012, p. 71-93, 2021.