

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ANIMAL

TESE

ASPECTOS BIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE
Triatoma jatai **Gonçalves, Teves-Neves, Carbajal-de-la-Fuente, Santos-**
Mallet, Lopes, 2013 e *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE)

Simone Caldas Teves

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA ANIMAL

ASPECTOS BIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE
Triatoma jatai Gonçalves, Teves-Neves, Carbajal-de-la-Fuente, Santos-
Mallet, Lopes, 2013 e *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE)

SIMONE CALDAS TEVES

Sob a Orientação da Professora

Jacenir Reis dos Santos Mallet

e Co-orientação da Professora

Teresa Cristina Monte Gonçalves

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Biologia Animal**, Área de concentração Biodiversidade Animal, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal.

Seropédica, RJ

Outubro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T353a Teves, Simone Caldas, 1983-
ASPECTOS BIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE
Triatoma jatai Gonçalves, Teves-Neves, Carbajal-de-la
Fuente, Santos-Mallet, Lopes, 2013 e Triatoma
costalimai Verano & Galvão, 1959 (HEMIPTERA:
REDUVIIDAE: TRIATOMINAE) / Simone Caldas Teves. -
2018.
126 f.

Orientadora: Jacenir Reis dos Santos Mallet.
Coorientadora: Teresa Cristina Monte Gonçalves.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Biologia Animal, 2018.

1. Morfologia Comparada de Triatomíneos. 2.
Biologia Comparada de Triatomíneos. 3. Filogenia de
Triatomíneos. 4. Trypanosoma cruzi. 5. Biodiversidade.
I. Mallet, Jacenir Reis dos Santos, 1958-, orient.
II. Gonçalves, Teresa Cristina Monte, 1956-, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Biologia Animal. IV. Título.

SIMONE CALDAS TEVES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Animal, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal em 08 de Outubro de 2018, área de concentração em Biodiversidade Animal.

TESE APROVADA EM 08/10/2018

Banca Examinadora:

.....
Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet – UFRRJ/ IOC

.....
Dra. Ana Laura Carbajal de la Fuente – CONICET / UBA

.....
Dr. Cleber Galvão – IOC/FIOCRUZ

.....
Dra. Helena Keiko Toma – UFRJ

.....
Dra. Suzete Araujo Oliveira Gomes – UFF

Dra. Catarina Macedo Lopes – IOC/FIOCRUZ Suplente e revisora

Dra. Carolina Nascimento Spiegel – UFF - Suplente

Dedico esse trabalho aos meus pais João Teves e Silvia de Oliveira Caldas Teves, minhas essências, por gratidão; A meus filhos Miguel e Mateus, meus amores, como incentivo para que construam um futuro melhor e ao meu amor Maurino Antonio de Souza, como reconhecimento pela incansável parceria.

“Se a meta principal de um capitão fosse preservar seu barco, ele o conservaria no porto para sempre.”

São Tomás de Aquino

“O que vale em ciência, são os fatos e, mais cedo ou mais tarde, eles vêm à tona, com a força irresistível da verdade.”

Otávio de Magalhães

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e sabedoria para enfrentar todas as etapas deste curso de doutorado.

Aos meus pais, João e Silvia, meus filhos Miguel e Mateus, meus irmãos, Rodrigo e João Luis e familiares que sempre me incentivaram aos estudos. Muito obrigada!

Ao meu amor Maurino Antonio de Souza pela parceria, especialmente nesta reta final de escrita da tese.

Às amigas-irmãs Bianca Gamboa Marques e Sabrina Lopes Lucena pelo apoio e incentivo.

À amiga-irmã e colega de profissão Amanda de Queiroz Bastos, que me apresentou a pós-graduação em Biologia Animal na UFRRJ, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis. Muito obrigada!

À Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet, orientadora e chefe do Laboratório, pela orientação e oportunidade de cursar o doutorado na UFRRJ. A vivência em uma grande universidade foi uma experiência maravilhosa. Muito obrigada!

Em especial a minha orientadora de sempre Teresa Cristina Monte Gonçalves por todos os ensinamentos e dedicação para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa. Realmente não há nada que resista ao trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Catarina Macedo Lopes, pelo apoio técnico-científico, amizade e por estar presente, mesmo nos momentos mais difíceis. É realmente muito gratificante poder ser a própria “palavra viva”. Sigo aprendendo.

À Bruna Lucia de Oliveira Nascimento pelo apoio técnico. Ensinando também se aprende e é sempre muito bom aprender com você.

À Dra. Ana Laura Carbajal de La Fuente, pelo suporte científico e incansável parceria. Muchas gracias!

Ao Dr. Carlos Eduardo Almeida da Universidade Estadual de Campinas pela colaboração, juntamente com a Dra. Sueli Gardim da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, para os estudos filogenéticos.

À Dra. Helena Keiko Toma, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo suporte técnico-científico e colaboração. É sempre muito bom aprender com você!

À Dra. Danielle Misael de Souza pela colaboração e amizade. É muito bom trabalhar com você.

À Iza Alencar e a todos os técnicos da Secretaria de Saúde do Tocantins que deram suporte no trabalho de campo.

Às colegas técnicas do laboratório Raquel Alexandra Bertoldo, Maria de Lourdes Nascimento e Cátia Cristina Dias. O suporte técnico foi excelente!

À Dra. Simone Patrícia Carneiro de Freitas pelo suporte científico e incentivo.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação e o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

TEVES, Simone Caldas. **ASPECTOS BIOLÓGICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DE *Triatoma jatai* Gonçalves, Teves-Neves, Carbajal-de-la-Fuente, Santos-Mallet, Lopes, 2013 e *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959 (HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE)**. 2018. Tese (Doutorado em Biologia Animal, Biodiversidade Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A espécie rupestre *Triatoma jatai* ocorre em simpatria com *Triatoma costalimai* no município de Paranã, estado brasileiro do Tocantins. Embora tenha sido encontrada no intradomicílio, não há registro de espécimes infectados por *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Agrupada no subcomplexo *T. matogrossensis*, apresenta dimorfismo alar, com fêmeas braquiúpteras e machos macrópteros, pouco encontrado em espécies do gênero *Triatoma*, o que pode resultar num perfil diferenciado de dispersão e adaptação a novos ecótopos. A espécie *T. costalimai* também tem sido encontrada no Sudeste e Sul do Tocantins, nos ecótopos silvestre, peridomiciliar e domiciliar, algumas vezes com altos índices de infecção por *T. cruzi*. As alterações antrópicas nos ambientes naturais, somadas a características inerentes ao bioma Cerrado, podem propiciar a dispersão de triatomíneos infectados para o domicílio com risco de infestação e transmissão vetorial de *T. cruzi* ao homem. O objetivo deste trabalho foi estudar aspectos morfológicos, biológicos e moleculares de *T. jatai* e *T. costalimai*; o risco de colonização do domicílio e o estabelecimento de ciclo do parasito nos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins – TO. Os espécimes foram capturados em 2015 em ecótopos silvestre e peridomiciliar. Foi realizada a pesquisa por *T. cruzi* pela microscopia óptica e cultura axênica com caracterização molecular dos isolados em unidades discretas de tipagem (DTUs), estudo de estruturas associadas à locomoção por morfometria clássica, ciclo biológico e análise filogenética das duas espécies com outras da América do Sul a partir de fragmentos de genes mitocondriais. Em Paranã, foram capturadas ninfas de *T. jatai*, em ambiente silvestre, sem infecção por *T. cruzi*. Em Aurora do Tocantins, foram capturados ninfas e adultos de *T. costalimai* em afloramentos rochosos em ambientes silvestre e peridomiciliar, com alto índice de infecção por *T. cruzi* DTU I (64,15%) sendo caracterizado um ciclo silvestre do parasito em ambiente peridomiciliar na sede do município. As fêmeas de *T. jatai* apresentaram tamanho corporal e comprimento do fêmur (perna 3) maiores que dos machos, o que pode ser um indício de adaptação para a locomoção por caminhada, contudo, somente pela morfologia comparativa com as espécies *T. costalimai* e *T. sherlocki*, não foi possível inferir sobre a capacidade de dispersão pelo voo. O ciclo biológico dos espécimes em laboratório foi longo, principalmente para *T. costalimai*, ainda em andamento, e com alto índice de mortalidade de ninfas de quinto estágio. A análise filogenética a partir de genes mitocondriais mostrou *T. jatai* como espécie irmã de *T. costalimai* com distância genética maior do que entre outras espécies válidas, assim como a separação em clado exclusivo. A continuidade e aprimoramento das pesquisas relativas a participação destas espécies no ciclo natural de *T. cruzi*, sobre o potencial de dispersão para novos ecótopos, assim como a capacidade de desenvolvimento em ambientes artificiais somado as respectivas relações evolutivas pode gerar dados para a vigilância entomológica e o controle da transmissão vetorial do parasito.

Palavras-chave: Morfologia, Ciclo biológico, *Trypanosoma cruzi*, Tocantins.

ABSTRACT

TEVES, Simone Caldas. Biological, morphological and molecular aspects of *Triatoma jatai* Gonçalves, Teves-Neves, Carbajal-de-la-Fuente, Santos-Mallet, Lopes, 2013 e *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959 (HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE). 2018. Thesis (Doutorado em Biologia Animal, Biodiversidade Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The rock species *Triatoma jatai* occurs in sympatry with *Triatoma costalimai* in the city of Paranã, Brazilian state of Tocantins. It was found inside the house, although there has been no record of specimens infected with *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. Grouped in the *T. matogrossensis* subcomplex, it presents a dimorphism, with brachiptera females and macropter males, that is sparsely found in species of the genus *Triatoma*, which can result in a distinctive profile of dispersion and adaptation to new ecotypes. The *T. costalimai* species has also been found in the Southeastern and Southern Tocantins, in the wild, peridomiciliary and domiciliary ecotypes, sometimes with high rates of *T. cruzi* infection. Anthropogenic alterations in natural environments, coupled with characteristics inherent to the Cerrado biome, may lead to the dispersion of infected triatomines to the domicile with risk of infestation and vector transmission of *T. cruzi* to humans. The objective of the present work was to study the morphological, biological and molecular aspects of *T. jatai* and *T. costalimai*, the risk of domicile colonization and to determine the parasite cycle in Paranã and Aurora do Tocantins - TO municipalities. The specimens were captured in 2015 both in the wild and peridomiciliary ecotypes. The research of *T. cruzi* was carried out by optical microscopy and axenic culture with molecular characterization of the isolates in discrete typing units (DTUs), the study of structures associated with locomotion by classical morphometry, biological cycle and phylogenetic analysis of the species with others of America South from fragments of mitochondrial genes. In Paranã, *T. jatai* nymphs were captured in a wild environment, without *T. cruzi* infection. Nymphs and adults of *T. costalimai* were captured in rocky outcrops in the wild and peridomiciliary environments, with high rate of *T. cruzi* DTU I infection (64.15%). A wild cycle of the parasite was characterized in a peridomiciliary environment in the town. Females of *T. jatai* presented greater body size and leg femur length than males, which may be an indication of adaptation to walking locomotion. However, comparative morphology with *T. costalimai* and *T. sherlocki* does not allow inferring about their flight dispersion ability. The specimens in the laboratory show a long biological cycle, particularly for *T. costalimai* (still in progress) and with a high mortality rate of fifth stage nymphs. Phylogenetic analysis from mitochondrial genes showed *T. jatai* as a sister species of *T. costalimai* with greater genetic distance than among other valid species, as well as exclusive clade separation. The continuity and improvement of research on the role of these species in the cycle of *T. cruzi* and on the potential of dispersion for new ecotypes, as well as the capacity of development in artificial environments added to the respective evolutionary relations can generate data for the entomological vigilance and the control of vector transmission of the parasite.

Key words: Morphology, Life cycle, *Trypanosoma cruzi*, Tocantins.

ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA – Comissão de Ética de Uso de Animais

CO II – Citocromo Oxidase II

Cyt B – Citocromo B

DTU – Discrete Typing Unit

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICICT – Instituto de Comunicação e informação científica e tecnológica em Saúde

IOC/ FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz

kDNA – DNA do cinetoplasto

LIT – Liver Infusion Triptose

MLEE – Eletroforese enzimática multi locus

MS – Ministério da Saúde

NNN - Neal, Novy, Nicolle

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de base

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

rDNA – DNA ribossomal

RNA – Ácido Ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

SESAU – Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins

SISBIO – Sistema de Atendimento para autorização de coleta de material biológico

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

Tco – *Triatoma costalimai*

Tja – *Triatoma jatai*

TO – Tocantins

TP – Total, percentual

UR – Umidade Relativa

Tsh – *Triatoma sherlocki*

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OS TRIATOMÍNEOS.....	2
1.2 A DOENÇA DE CHAGAS E O PARASITO <i>Trypanosoma cruzi</i>.....	10
1.3 AS ESPÉCIES <i>Triatoma jatai</i> E <i>Triatoma costalimai</i>.....	17
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 - ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS ESTRUTURAS ASSOCIADAS À LOCOMOÇÃO DE ADULTOS.....	21
2.2 CICLO DE DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO DE TRIATOMÍNEOS.....	23
2.3 ANÁLISE DE GENES MITOCONDRIAIS NA SISTEMÁTICA DE TRIATOMÍNEOS.....	29
2.4 BIOQUÍMICA DA DIVERSIDADE INTRAESPECÍFICA DE <i>T. cruzi</i> E SEU PERFIL NO BIOMA CERRADO.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 ESPÉCIMES DE ESTUDO.....	37
3.1.1 – OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE ESTUDO.....	37
3.1.2 – AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i> E ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA.....	40
3.1.3 – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>T. cruzi</i>.....	44
3.1.3.1 – EXTRAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES MINI-EXON E 24S – ALFA.....	44
3.1.3.2 – DETERMINAÇÃO DO DTU POR PCR – RFLP.....	45

3.1.3.3 – DETERMINAÇÃO DO DTU POR AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE 2 DE CITOCROMO OXIDASE II, GENES 24S ALFA E ESPAÇADOR INTERGÊNICO (SL IR).....	48
3.2 – ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS ESTRUTURAS ASSOCIADAS À LOCOMOÇÃO DE ADULTOS.....	50
3.3 – CICLO DE DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO DE <i>T. jatai</i> e <i>T. costalimai</i>	51
3.4 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>T. jatai</i> com outras espécies da América do Sul.....	52
4. RESULTADO.....	54
4.1- ESPÉCIMES DE ESTUDO.....	54
4.1.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE ESTUDO, AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i> E ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA.....	54
4.1.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE <i>T. cruzi</i>	56
4.1.2.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES MINI-EXON E 24S-ALFA.....	56
4.1.2.2 – DETERMINAÇÃO DO DTU POR PCR – RFLP.....	56
4.1.2.3 – DETERMINAÇÃO DO DTU POR AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE 2 DE CITOCROMO OXIDASE II, GENES 24S ALFA E ESPAÇADOR INTERGÊNICO (SL-IR).....	58
4.2 MORFOLOGIA DE ESTRUTURAS ASSOCIADAS À LOCOMOÇÃO DE ADULTOS.....	59
4.3 CICLO DE DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO DE <i>T. jatai</i> e <i>T. costalimai</i>	68
4.4 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>T. JATAI</i> COM OUTRAS ESPÉCIES DA AMÉRICA DO SUL.....	71

5. DISCUSSÃO.....	73
5.1 ESPÉCIMES DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DE <i>T. cruzi</i>.....	73
5.2 ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS ESTRUTURAS ASSOCIADAS À LOCOMOÇÃO DE ADULTOS.....	75
5.3 CICLO DE DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO DE <i>T. jatai</i> e <i>T. costalimai</i>.....	77
5.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>T. jatai</i> COM OUTRAS ESPÉCIES DA AMÉRICA DO SUL.....	80
6. CONCLUSÃO.....	84
7. RECOMENDAÇÕES DE PESQUISA.....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXOS.....	106
A – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE LÂMINAS.....	106
B – PROVA DO ARTIGO RELACIONADO AO TÓPICO 4.1.2.....	107
C – TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA, MÁXIMA E MÍNIMA DURANTE O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DO CICLO DE DESENVOLVIMENTO DE <i>T. jati</i> E <i>T. costalimai</i>.....	111
D - RELAÇÃO TEMPERATURA E UMIDADE, MÁXIMA E MÍNIMA DURANTE O PERÍODO DE OBSERVAÇÃO DO CICLO DE DESENVOLVIMENTO DE <i>T. jatai</i> E <i>T. costalimai</i>. VALORES DE TEMPERATURA EM °C E UMIDADE %. TEMP: TEMPERATURA; TEMP MAX: TEMPERATURA MÁXIMA; TEMP MIN:TEMPERATURA MÍNIMA.....	112
E – ARTIGO PUBLICADO RELACIONADO AO TÓPICO 4.4.....	113
F - ARTIGO PUBLICADO PELA AUTORA RELACIONADO COM ESTA TESE, MAS QUE NÃO INTEGRA A MESMA.....	119

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de desenvolvimento de um triatomíneo contendo ovos, ninfas de 1º a 5º estágio e adultos fêmea e macho de <i>Triatoma costalimai</i>	5
Figura 2: Formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> no hospedeiro vertebrado. A: Esfregaço sanguíneo contendo formas tripomastigotas sanguíneas; B: Músculo cardíaco de camundongo infectado com <i>T. cruzi</i> , formas amastigotas (seta preta).....	13
Figura 3: Formas de <i>Trypanosoma cruzi</i> visualizadas em meio acelular. A e B: 1 – Formas epimastigotas, 2 – Forma tripomastigota metacíclica.....	14
Figura 4: Desenho esquemático do ciclo de <i>Trypanosoma cruzi</i> em triatomíneos, humanos e outros mamíferos.....	16
Figura 5: Adultos das espécies <i>Triatoma jatai</i> e <i>Triatoma costalimai</i>	18
Figura 6: A - Localização do Estado do Tocantins; B – Municípios trabalhados: a – Paranã, b – Aurora do Tocantins.....	37
Figura 7: Localização dos pontos de captura no município de Paranã (TO) em relação à localidade-tipo de <i>T. jatai</i>	38
Figura 8: Localização dos pontos de captura Aurora 02 (Aur02) e Aurora 04 (Aur04) no município de Aurora do Tocantins (TO).....	39
Figura 9: Localização do ponto Aurora 04 (Aur04) localizado na sede do município de Aurora do Tocantins (TO).....	39
Figura 10: Coleta das fezes dos triatomíneos para pesquisa por <i>T. cruzi</i> . A - Colocação do triatomíneo alimentado em microtubo de 1,5ml cortado ao fundo acoplado a um segundo microtubo de 2,0 ml para a coleta das fezes; B - Com o auxílio de uma pinça, realização de uma massagem abdominal para estímulo da defecação; C – Coleta das fezes para o exame parasitológico.	41

Figura 11: Procedimento para detecção e isolamento de <i>T. cruzi</i> . Legenda: A e B – Preparação para iniciar a compressão abdominal do triatomíneo; C- Compressão abdominal; D- Diluição das fezes em solução tamponada; E- Montagem do material entre lâmina e lamínula; F- Observação da lâmina ao microscópio óptico; G- Semeadura do material fecal em meio de cultura.....	43
Figura 12: Protocolo para genotipagem usando de três passos: análise de polimorfismo do gene da subunidade 2 (COII) da enzima mitocondrial citocromo oxidase, amplificação do domínio divergente D7 do gene rRNA 24Sa e amplificação da região Intergênica líder emendada (SL-IRac).....	50
Figura 13: Desenho esquemático dos caracteres corporais mensurados para estudo das estruturas morfológicas associadas ao voo. A: Triatomíneo: Linha branca representa comprimento total do corpo; B: Pronoto e escutelo: LAP - Lobo anterior do pronoto; LPP – Lobo posterior do pronoto, linhas pretas representam as medidas de largura; C: Asa anterior: Linha branca CA representa a medida de comprimento da asa e LA largura da asa.....	51
Figura 14: Percentual de positividade para <i>T. cruzi</i> nos diferentes estádios de desenvolvimento de espécimes de <i>T. costalimai</i> capturados em Maio de 2015 em Aurora do Tocantins – TO.....	54
Figura 15: Eletroforese em Gel de agarose 2,5% da PCR para o gene de mini-exon das amostras de <i>T. cruzi</i> isolados de <i>T. costalimai</i> oriundos do município de Aurora do Tocantins – TO.....	56
Figura 16: Eletroforese em Gel de agarose 2,5% da PCR para o gene de 24s alfa das amostras de <i>T. cruzi</i> isolados de <i>T. costalimai</i> oriundos do município de Aurora do Tocantins – TO...56	56
Figura 17: Eletroforese em Gel de agarose 4% do produto da digestão do fragmento do gen 1f8 com a enzima de restrição Alw211 das amostras de <i>T. cruzi</i> isoladas de <i>T. costalimai</i> oriundos de Aurora do Tocantins – TO.....	57

Figura 18: Eletroforese em Gel de agarose 1,5% do produto da digestão do fragmento do gen gp72 com a enzima de restrição Taq das amostras de <i>T. cruzi</i> isoladas de <i>T. costalimai</i> oriundos de Aurora do Tocantins - TO.....	57
Figura 19: Eletroforese em Gel de agarose 1,5% do produto da digestão do fragmento do gen HSP60 com a enzima de restrição EcoRV das amostras de <i>T. cruzi</i> isoladas de <i>T. costalimai</i> oriundos de Aurora do Tocantins - TO.....	57
Figura 20: Eletroforese em Gel de agarose 1,5% do produto da digestão do fragmento do gen histone H3 com a enzima de restrição AluI das amostras de <i>T. cruzi</i> isoladas de <i>T. costalimai</i> oriundos de Aurora do Tocantins – TO.....	58
Figura 21: Eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5 % do produto para o gene SL – IR das amostras de <i>T. cruzi</i> isoladas de <i>T. costalimai</i> oriundos de Aurora do Tocantins - TO.....	58
Figura 22: Tamanho corporal (em mm) de fêmeas e machos de <i>T. jatai</i>	60
Figura 23: Comprimento (C) do fêmur da perna 3 (em mm) de fêmeas e machos de <i>T. jatai</i>	60
Figura 24: Médias do tamanho corporal (em mm) de fêmeas (F) e machos (M) das espécies <i>T. jatai</i> (Tja), <i>T. costalimai</i> (Tco) e <i>T. sherlocki</i> (Tsh).....	62
Figura 25: Medidas do pronoto (em mm) de fêmeas (F) e machos (M) das espécies <i>T. jatai</i> (Tj), <i>T. costalimai</i> (Tc) e <i>T. sherlocki</i> (Ts). A – Comprimento; B – Largura do lobo anterior; C – Largura do lobo posterior.....	63
Figura 26: Medidas das asas (em mm) de fêmeas (F) e machos (M) das espécies <i>T. jatai</i> (Tja), <i>T. costalimai</i> (Tco) e <i>T. sherlocki</i> (Tsh). A – Comprimento; B – Largura.....	64
Figura 27: Medidas do comprimento (em mm) do fêmur de fêmeas (F) e machos (M) das espécies <i>T. jatai</i> (Tja), <i>T. costalimai</i> (Tco) e <i>T. sherlocki</i> (Tsh). A – Perna 1; B – Perna 2; C – Perna 3.....	65

Figura 28: Medidas do comprimento da tíbia de fêmeas (F) e machos (M) das espécies *T. jatai* (Tja), *T. costalimai* (Tco) e *T. sherlocki* (Tsh). A – Perna 1; B – Perna 2; C –Perna 3.....66

Figura 29: Medidas do comprimento do artículo tarsal de fêmeas (F) e machos (M) das espécies *T. jatai* (Tja), *T. costalimai* (Tco) e *T. sherlocki* (Tsh). A – Perna 1; B – Perna 2; C –Perna 3.....67

Figura 30: Inferência Bayesiana de análise combinada de *Triatoma jatai* com base em genes 16S e COI.....72

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Percentual de espécimes examinados e taxa de infecção natural por <i>Trypanosoma cruzi</i> , segundo espécies de triatomíneos. Brasil, 2007 a 2011.....	7
Tabela 2: Avaliação da taxa de positividade de lâminas de exames parasitológicos de triatomíneos capturados no Estado do Tocantins, 2004 a 2006.....	8
Tabela 3: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo Região, Unidade da Federação de residência e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2017.....	12
Tabela 4: Subcomplexo, espécies e origem dos espécimes de triatomíneos utilizados neste trabalho.....	53
Tabela 5: Códigos de acesso do GeneBank das sequências de <i>Triatoma</i> e grupo externo utilizados nas análises filogenéticas.....	53
Tabela 6: Espécimes de <i>T. costalimai</i> capturados em Aurora do Tocantins em Maio de 2015 e percentual de infecção por <i>T. cruzi</i>	55
Tabela 7: Espécimes de <i>T. costalimai</i> e <i>T. jatai</i> capturados em diferentes ecótopos nos municípios de Aurora do Tocantins e Paranã - TO em Outubro de 2015.....	55
Tabela 8: Medidas (em mm) de estruturas relacionadas à locomoção de machos e fêmeas de <i>T. jatai</i>	59
Tabela 9: Valores médios (em mm) das estruturas relacionadas à locomoção das espécies <i>T. jatai</i> , <i>T. sherlocki</i> e <i>T. costalimai</i>	61
Tabela 10: Tempo de desenvolvimento (em dias) de <i>Triatoma jatai</i> e <i>T. costalimai</i> criadas em condições de laboratório.....	69
Tabela 11: Número de repastos realizados por <i>Triatoma jatai</i> e <i>T. costalimai</i> criadas em condições de laboratório.....	70
Tabela 12: Taxa de mortalidade considerando os estádios ninfais em <i>T. jatai</i> e <i>T. costalimai</i>	70

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Levantamento bibliográfico em ordem cronológica de estudos bionômicos realizados sob condições ambientais artificiais de espécies de triatomíneos que ocorrem naturalmente no estado do Tocantins.....	25
Quadro 2: Sequências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos obtidos no gene mini-exon.....	45
Quadro 3: Sequências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos obtidos no 24s alfa.....	45
Quadro 4: Sequências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos obtidos na PCR.....	46
Quadro 5: Digestão do produto da PCR com enzimas de restrição.....	46
Quadro 6: Perfil de restrição para os DTU's de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
Quadro 7: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene COIL.....	49
Quadro 8: Digestão do produto da PCR com enzima de restrição.....	49
Quadro 9: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 24 S alfa.....	49
Quadro 10: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação da região intergênica (SL – IR).....	49

1. INTRODUÇÃO

A reconhecida participação dos triatomíneos no ciclo de desenvolvimento do parasito *Trypanosoma cruzi* e na transmissão vetorial da doença de Chagas vem sendo estudada desde 1909, quando Carlos Chagas descreveu pela primeira vez os aspectos da doença, do agente infeccioso, de seus reservatórios e apresentou os triatomíneos como vetores de transmissão do parasito ao homem.

Inúmeras pesquisas vêm mostrando aspectos morfológicos, biológicos e moleculares das diferentes espécies deste inseto, principalmente daquelas de importância epidemiológica. Neste trabalho, será realizado um estudo da morfologia de adultos, biologia e posicionamento filogenético de *Triatoma jatai* e, da espécie de morfologia próxima a esta, *Triatoma costalimai*, ambas obtidas no Estado do Tocantins, relacionando suas características aos respectivos potenciais como vetores da doença de Chagas.

Esta tese será apresentada segundo orientações técnicas da universidade, na forma de texto corrido, com as seguintes partes: Introdução, Revisão de literatura, Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências bibliográficas, com anexos ao final. Na introdução serão apresentados os aspectos gerais sobre os triatomíneos, a doença de Chagas, o parasito *Trypanosoma cruzi* e as espécies de estudo, que justificam a elaboração deste trabalho. Finalizando a introdução estão listadas as hipóteses, afirmativas a serem deferidas ou contestadas e para tanto os respectivos objetivos. A revisão de literatura apresentará um histórico, relacionando os principais trabalhos, relativos as hipóteses de trabalho. Na metodologia serão apresentados os materiais e métodos utilizados. O resultado será composto pelos resultados obtidos, apresentados em forma de tópicos, semelhantes as metodologias aplicadas. A discussão irá relacionar os resultados obtidos com dados da literatura. Por fim serão apresentadas as conclusões, as referências bibliográficas e, anexos os artigos gerados nesta tese assim como um artigo relacionado publicado em co-autoria.

1.1 OS TRIATOMÍNEOS

Os triatomíneos, insetos de reconhecida importância epidemiológica pela atuação como vetores do parasito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), causador da doença de Chagas, encontram-se classificados na ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Esta subfamília é composta por 154 espécies descritas incluindo três fósseis distribuídas em 18 gêneros, 5 tribos, 8 complexos e 8 subcomplexos (Galvão & Paula, 2015; Rosa et al, 2017; Oliveira et al, 2018; Poinar, 2019).

A identificação taxonômica dos triatomíneos adultos tem sido feita com base na chave dicotômica de Lent & Wygodzinsky (1979). Atualizações taxonômicas geraram outras chaves incluindo espécies descritas posteriormente (Gonçalves et al, 2013; Costa et al, 2013; Galvão & Dale, 2015). Contudo, outras ferramentas têm sido utilizadas para fins taxonômicos, principalmente para diferenciação de espécies próximas, cuja identificação não seja possível somente com os critérios morfológicos clássicos, tais como o estudo das estruturas fálicas, da ultraestrutura de caracteres de valor taxonômico, a análise comparativa de estruturas por morfometria geométrica e análises moleculares.

Menos de 30% das espécies conhecidas tiveram suas formas imaturas descritas e, a maior parte destas, não foi analisada do ponto de vista da morfologia comparada, o que inviabiliza, até o momento, a elaboração de uma chave englobando a diversidade dos triatomíneos (Rocha & Santos, 2015).

Até o momento, foram elaboradas sete chaves dicotômicas nos diferentes estádios ninfais: Uma para espécies mais comuns de ocorrência no Brasil (Galvão, 1956); duas chaves para gêneros de triatomíneos (excluindo *Bolboderia*), uma baseada em ninfas de primeiro estágio e outra de 5º estágio (Lent & Wygodzinsky, 1979); e quatro chaves para todos os estádios de algumas espécies brasileiras do complexo Oliveirai, uma para o 1º e 2º estádios, em conjunto, e outras três para o 3º, 4º e 5º estádios respectivamente (Rocha et al, 2009).

Os gêneros com maior número de espécies de importância epidemiológica são *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma*. No ambiente silvestre, geralmente, as espécies de *Rhodnius* são arbóreas associadas a palmeiras, enquanto que as de *Panstrongylus* são predominantemente encontradas em tocas ou cavidades de árvores e as do gênero *Triatoma* estão associadas com rochas, ninhos e troncos. Essa especialização de ecótopos foi resultado de uma longa trajetória evolutiva. Contudo, exceções são observadas como, por exemplo, a espécie *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 que ocorre em bromélias e buracos de árvores ao invés de palmeiras, *Panstrongylus lignarius* Walker, 1837 que pode ocorrer livre sobre a copa das árvores e não somente em tocas ou cavidades de árvores e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 que pode ocorrer em associação com a planta *Mimosa tenuiflora*, também conhecida como jurema preta (Freitas et al, 2004) ou em buracos de árvores ao invés de rochas (Gaunt & Miles, 2000; Galvão & Gurgel-Gonçalves, 2015; Almeida et al, 2015).

Diferentes hipóteses sobre a história evolutiva dos triatomíneos apontam para formação monofilética, polifilética ou parafilética. A origem monofilética do grupo foi proposta com base no hábito alimentar estritamente hematofágico tendo-se como caracteres

apomórficos o rostro reto e fino, apoiado na gula, com terceiro segmento capaz de fletir para cima durante a alimentação, devido à presença da conexão membranosa entre o segundo e terceiro segmento do rostro, as antenas filiformes inseridas lateralmente e a ausência de glândulas abdominais dorsais nas ninfas (Lent & Wygodzinsky, 1979). Pesquisas com base em caracteres morfológicos, e em filogenia com base em análise de sequências de DNA mitocondrial confirmam a origem monofilética para o grupo (Soares et al, 1998; Gaunt & Miles, 2000; Hypsa et al, 2002; Weirauch 2008; Weirauch & Munro, 2009).

Contudo, a origem polifilética proposta para o grupo foi baseada em características ecológicas e biogeográficas (Schofield, 1988) nas quais a evolução teria ocorrido a partir de reduvídeos predadores originados a partir de diferentes linhagens. Este fato explicaria determinados comportamentos como o hábito alimentar e a estreita relação com determinados hospedeiros vertebrados. Neste caso, as sinapomorfias seriam devidas às mudanças convergentes do hábito alimentar predador para a hematofagia. Estudos morfológicos (Catalá, 1997; Catalá & Schofield, 1994; Barata, 1998) bioquímicos e moleculares corroboraram essa hipótese (Schofield & Dolling, 1993; Carcavallo et al, 1999; Gorla et al, 1997; Garcia et al, 1998; Dujardin et al, 1999a; Schofield & Dujardin, 1999; Bargues et al, 2000; Monteiro et al, 2000; Schofield, 2000; Paula et al, 2005; Hwang & Weirauch, 2012).

Em termos biológicos, os triatomíneos caracterizam-se por apresentar desenvolvimento hemimetábolo ou paurometábolo e serem insetos hematófagos cujo ciclo de vida, de ovo a adulto, passa por cinco fases imaturas denominadas ninfas (Figura 1). As ninfas se diferenciam dos adultos pela ausência de ocelos, asas e fossetas esponjosas (este último com exceção dos gêneros *Parabelminus* e *Microtriatoma*), tarsos dímeros e pela imaturidade sexual. No primeiro estágio apresentam uma coloração mais clara, e não apresentam manchas conexivais. Conforme muda para os estádios seguintes aumentam de tamanho, as manchas conexivais tornam-se mais evidentes e a coloração vai se definindo. A partir do 3º estágio começa a surgir o esboço da teca alar, futuras asas dos adultos. Nas ninfas de 4º e 5º estádios as tecas alares se tornam mais aparentes, o pronoto tem forma de escudo, e a esclerotização do abdômen é incompleta (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galíndez Girón et al, 1998; Aldana et al, 2000; Rocha & Santos, 2015). Nas ninfas de 5º estágio já se inicia a diferenciação sexual externa (Lent & Jurberg, 1965; Gonçalves et al, 1985).

A hematofagia é obrigatória para todas as fases imaturas dos triatomíneos assim como para machos e fêmeas. Algumas espécies podem defecar durante ou logo após a alimentação, enquanto outras defecam após abandonar a fonte de alimento, longe do local da sucção. Este fato classifica as diferentes espécies como bons ou maus vetores do parasito *T. cruzi*, uma vez que as formas infectantes são expelidas nas fezes dos insetos infectados (Chagas, 1909). Supostamente, os triatomíneos também podem apresentar como comportamento ancestral, o predatismo (entomofagia). Neste caso, se alimentam da hemolinfa de outros insetos (Lorosa et al, 2000; Almeida et al, 2002).

A dispersão das diferentes espécies e populações de triatomíneos, silvestres ou que estão em processo de domiciliação pode ocorrer como resultado das ações antrópicas que ocorrem em comunidades naturais que resultam na redução da fauna e flora silvestres, e conseqüentemente no deslocamento destes em busca de alimento e abrigo (Forattini, 1980). Esse processo de dispersão dos triatomíneos, seja passiva (por exemplo, quando transportados

pelo homem e por animais) ou ativa (na busca de novos hospedeiros ou ecótopos), é de importância no âmbito de saúde pública, uma vez que tem possibilitado o encontro de espécies silvestres, infectadas com o parasito *T. cruzi* no intra e peridomicílio. Conseqüentemente, tendo-se o homem como nova opção de hospedeiro, aumenta-se o risco da transmissão vetorial do *T. cruzi*.

Apenas os adultos apresentam asas e, portanto, a possibilidade de voar, contudo na maior parte da vida destes insetos a locomoção ocorre por caminhada tendo em vista a estreita relação estabelecida entre os insetos e hospedeiros, no caso de ninhos, tocas ou domicílios, o que dispensaria o voo (Abraham et al, 2011; Lazzari, 2015). Contudo, quando há escassez de hospedeiros, ou seja, das fontes alimentares, os triatomíneos podem fazer longos voos de dispersão (Lehane & Schofield,1981).

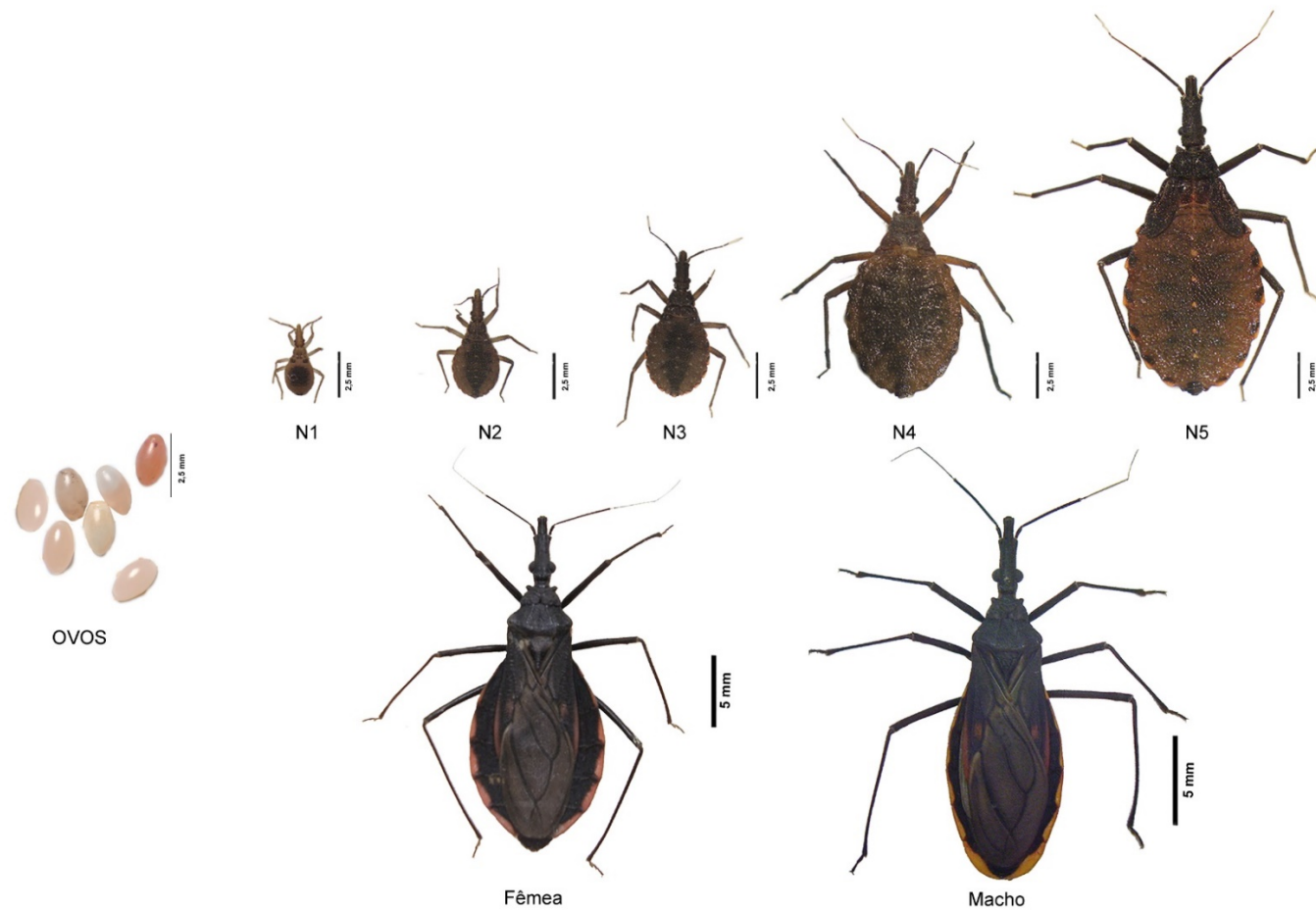


Figura 1: Ciclo de desenvolvimento de um triatomíneo contendo ovos, ninfas de 1º a 5º estágio e adultos fêmea e macho de *Triatoma costalimai*.
Foto: Catarina Macedo.

Para algumas espécies braquiípteras ou semi-braquiípteras é comprovada a incapacidade de voo, por questões anatômicas, neste caso a locomoção dos adultos ocorre por caminhada. A capacidade de voo desses insetos, portanto, está associada não somente as características anatômicas, mas fisiológicas e ecológicas (Almeida et al, 2012).

As oscilações dos fatores climáticos também atuam nos processos seletivos e de distribuição geográfica dos triatomíneos (Galvão et al, 1998; Bahrndorff et al, 2006). Associados a esses parâmetros está a plasticidade gênica que determina o grau de tolerância e adaptação das espécies à novos ambientes (Dujardin et al, 1999b). Forattini (1980) apresentou a distribuição de algumas espécies de importância epidemiológica de triatomíneos de acordo com os ecossistemas brasileiros. As espécies *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 e *T. pseudomaculata*, autoctones na Caatinga, incluindo a área de transição do agreste, semi-árido nordestino e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) introduzido no semi-árido. *Triatoma sordida* (Stål, 1859) no bioma Cerrado. *P. megistus* no Tropical Atlântico subdividido nas áreas setentrional e meridional do Sistema da Serra do Mar, e do Planalto Paulista, mineiro e paranaense. E na região Sul do Brasil, em regiões de pradarias Mistas Subtropicais a espécie *Triatoma infestans* (Klug, 1834). Alguns estudos contudo, já mostram as espécies *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) como importante vetor na Mata Atlântica (Sangenis et al, 2015), e *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) na região Sul no bioma Pampas (Almeida et al, 2000).

Gurgel-Gonçalves e colaboradores (2012) utilizaram modelos de nichos ecológicos para avaliar a distribuição de diferentes espécies de triatomíneos no Brasil de acordo com localização geográfica, biomas e condições climáticas. Estes verificaram que algumas espécies teriam maior valência ecológica sendo encontradas em diferentes biomas como *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), *P. megistus* e *T. sordida*. Outras espécies seriam específicas de determinados biomas como *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959 no Cerrado, *Triatoma petrocchiai* Pinto & Barreto, 1925 na Caatinga, *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926) na Mata Atlântica e *T. rubrovaria* no Pampas.

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), entre 2007 e 2011, foram registrados no Brasil mais de 770.000 triatomíneos capturados por meio da vigilância entomológica passiva ou ativa, constituindo uma diversidade de 62 espécies, distribuídas entre o intradomicílio e peridomicílio, destacando-se as seguintes espécies: *P. geniculatus*, *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923), *P. megistus*, *Rhodnius nasutus* Stål, 1859, *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927, *Rhodnius pictipes* Stål, 1872, *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *Triatoma maculata* (Erichson, 1848), *T. pseudomaculata*, *T. rubrovaria*, *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773), *T. sordida* e *T. vitticeps*. Destes insetos capturados, 76,8% foram examinados para pesquisa de infecção por *T. cruzi* resultando numa taxa de infecção natural total de 2,7% (Tabela 1) (SVS/MS, 2015).

Contudo, nos últimos anos, mais cinco espécies de triatomíneos de ocorrência no Brasil foram descritas, *Triatoma jatai* Gonçalves et al, 2013, *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013, *Rhodnius montenegrensis* Rosa et al, 2012, *Rhodnius marabaensis* Souza et al, 2016 e *Rhodnius taquarussensis* Rosa et al, 2017, aumentando essa diversidade de triatomíneos no Brasil para um total de 68 espécies. Além disso, duas espécies foram revalidadas sendo estas *Triatoma macromelasoma* e *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Costa et al, 2013; Mendonça et al, 2016).

Tabela 1: Percentual de espécimes examinados e taxa de infecção natural por *Trypanosoma cruzi*, segundo espécies de triatomíneos. Brasil, 2007 a 2011.

Espécie	Exemplares examinados (%)	Taxa de infecção natural (%)
<i>T. vitticeps</i>	90,1	52,0
<i>R. robustus</i>	67,3	33,3
<i>P. lutzii</i>	22,7	29,4
<i>R. pictipes</i>	85,5	24,1
<i>P. megistus</i>	78,0	8,4
<i>P. geniculatus</i>	82,5	8,2
<i>T. rubrovaria</i>	54,5	5,9
<i>T. rubrofasciata</i>	74,6	4,5
<i>R. neglectus</i>	90,8	3,8
<i>T. brasiliensis</i>	64,8	2,7
<i>T. pseudomaculata</i>	74,2	2,1
<i>R. nasutus</i>	88,4	1,9
<i>T. sordida</i>	85,0	0,8
<i>T. maculata</i>	53,2	0,4
<i>T. infestans</i>	62,8	0,0
Total	76,8	2,7

Fonte: SVS/MS. Atualizado em maio/2014.

O estado do Tocantins, localidade de origem dos espécimes analisados neste presente estudo, está situado na região Norte do Brasil, apresenta 139 municípios e uma extensão territorial de 277.620,9 km² cujos limites geográficos são: Goiás (Sul), Piauí (Leste), Maranhão (Noroeste), Bahia (Sudeste), Pará (Noroeste) e Mato Grosso (Sudoeste). O relevo do estado é predominantemente formado por planícies, embora sejam encontrados planaltos e depressões, principalmente na região Sul, com pouca variação de altitude (a maior parte do estado não ultrapassa a altitude de 500 metros em relação ao nível do mar) sendo o ponto mais elevado na Serra das Traíras (1340 metros de altitude) que está localizada ao sul entre os municípios de Paranã- TO e Cavalcante, estado de Goiás.

Área endêmica para a doença de Chagas, Tocantins encontra-se em zona de transição geográfica entre o bioma Cerrado, presente na maior parte do estado (cerca de 91%) e, ao norte, floresta Amazônica, bioma Amazonia (Silva, 2007; Paiva et al, 2012). A temperatura média no Estado é de cerca de 32°C no período de seca (de Abril a Setembro) e de 26°C no período de chuvas (de outubro a março) sendo que, na região Norte, as temperaturas médias são cerca de 3°C mais altas que na região Sul.

As regiões Sul e Sudeste do Tocantins, onde se localizam os municípios de captura dos espécimes de estudo, Paranã e Aurora do Tocantins, respectivamente, apresentam vegetação composta por árvores baixas, inclinadas, tortuosas com ramificações irregulares típicas do Cerrado e, em alguns trechos, observa-se a presença de afloramentos rochosos calcários, ecótopos silvestres das espécies *T. jatai* e *T. costalimai*. Nestas regiões, a dinâmica ecológica sofre influência antrópica do uso da terra, seja pelas atividades de agropecuária ou construções, seja pelo funcionamento de usinas hidrelétricas como o Aproveitamento

Hidrelétrico Peixe Angical, ENERPEIXE SA e São Salvador assim como por fatores naturais inerentes ao bioma Cerrado como as queimadas naturais.

Por muitos anos, *Triatoma infestans* foi considerado o principal vetor da doença de Chagas no Tocantins, tendo seu último registro de captura no município de Combinado em 2002. A certificação da interrupção da transmissão vetorial por esta espécie foi concedida em 2006, pela Organização Panamericana de Saúde. No período de 2004 a 2006 um total de 11 espécies foi registrado no Estado: *T. costalimai*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata*, *R. neglectus*, *R. pictipes*, *R. robustus*, *P. geniculatus*, *P. megistus*, *P. lignarius*, *Panstrongylus diasi* Pinto & Lent, 1946 e *Panstrongylus lenti* Galvão & Palma, 1968. A avaliação da positividade para tripanosomatídeos por exame parasitológico de fezes dos triatomíneos capturados neste período demonstrou uma tendência decrescente, atingindo menos de 50% da taxa de positividade de 2004 no ano de 2006 (Tabela 2) (Oliveira et al, 2008).

No período de 2005 a 2011, 18.532 triatomíneos foram capturados em 126 dos 139 municípios que compõem o Estado, com predominância das espécies *T. sordida* (61,6%), *R. pictipes* (13,6%), *P. geniculatus* (9,3%) e *R. neglectus* (8,6%). Neste período, a taxa de infectividade dos triatomíneos por *T. cruzi* apresentou uma média total de 6,3% (Macedo et al, 2011).

Em 2015, Galvão e Gurgel-Gonçalves contabilizaram 16 espécies no Estado do Tocantins incluindo *Cavernicola pilosa* Barber, 1937, *Eratyrus mucronatus* Stål, 1859, *Microtriatoma trinidadensis* (Lent, 1951), *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 e *Triatoma jatai* Gonçalves et al, 2013.

Tabela 2: Avaliação da taxa de positividade de lâminas de exames parasitológicos de triatomíneos capturados no Estado do Tocantins, 2004 a 2006.

Ano	Quantidade de espécimes analisados			Taxa de positividade(%)
	Positivos	Negativos	Total	
2004	44	437	481	9,15
2005	77	1.642	1.719	4,48
2006	51	1.385	1.436	3,55
Total	172	3.464	3.636	4,73

Fonte: Núcleo Estadual de Entomologia Médica / SESAU/ TO, 2007.

Estudo mais recente, utilizando dados da Secretaria de Saúde do Tocantins sobre a infecção de triatomíneos por *T. cruzi* em municípios do Sudeste deste Estado, apresentou elevação no índice, de 13,7% em 839 espécimes, somente da espécie *T. costalimai*, capturados no período de 2005 a 2014 (Brito et al, 2017a).

Diante desta realidade, a manutenção de ações padronizadas de vigilância entomológica torna-se essencial para o conhecimento da diversidade de triatomíneos bem como para o monitoramento e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Estado.

1.2 A DOENÇA DE CHAGAS E O PARASITO *Trypanosoma cruzi*

Carlos Chagas descreveu pela primeira vez o parasito, apontou os reservatórios naturais e os triatomíneos como agente transmissor da doença de Chagas (Chagas 1909, 1912). Esta doença é resultante de uma infecção causada pelo protozoário *T. cruzi* classificada pela Organização Mundial de Saúde como enfermidade negligenciada (WHO 2012; 2013). Fatores sócio-econômicos e ambientais como a pobreza, condições de moradia e desmatamento estão intimamente relacionados ao ciclo de transmissão desta doença, que apresenta elevada carga de morbimortalidade em países endêmicos como o Brasil (Dias et al, 2002; Coura & Dias, 2009; WHO 2012, 2013; Dias et al, 2016).

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* em todo o mundo, com o maior número de casos na América Latina. Um levantamento, com base em dados de 2010, indicou 5.742.167 pessoas infectadas em 21 países latino-americanos, das quais 3.581.423 (62,4%) eram residentes em nações da iniciativa dos países do Cone Sul, destacando-se Argentina com 1.505.235, Brasil 1.156.821, México 876.458 e Bolívia com 607.186 casos (WHO, 2015).

Segundo Dias e colaboradores (2016), contudo, os dados de prevalência gerados por diferentes pesquisas divergem, assim como os métodos para definição de infecção por *T. cruzi* em vários países, o que dificulta o estabelecimento de uma estimativa exata sobre a prevalência da doença de Chagas nas Américas. Contudo, segundo o mesmo autor, é consenso que o número de infectados ainda é muito expressivo no contexto sanitário e social do Continente, requerendo atenção por parte dos países.

Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil estima-se que existam aproximadamente 12 milhões de portadores da doença crônica nas Américas, com cerca de 2 a 3 milhões no Brasil (SVS/MS, 2015). No período de 2000 a 2017 foram registrados 2811 casos agudos da doença no Brasil, com maior prevalência na região Norte (Tabela 3), por conta dos surtos provenientes de transmissão oral.

O modelo de vigilância epidemiológica da doença de Chagas no Brasil atualmente se diferencia de acordo com os padrões de transmissão das áreas geográficas. Desta forma, tem-se uma região originalmente de risco para transmissão vetorial, que compreende os Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio Grande do Norte, Sergipe, São Paulo e Tocantins, nos quais a vigilância epidemiológica visa detectar a presença e prevenir a formação de colônias domiciliares do vetor. Na região da Amazônia Legal, a vigilância tem como objetivo a detecção precoce de casos agudos e surtos, incluindo os Estados do Acre, Amazonas, Roraima, Rondônia, Pará e parte do Tocantins, Maranhão e Mato Grosso (SVS/MS, 2015).

O perfil epidemiológico da doença de Chagas no estado do Tocantins é constituído pelas condições de moradias, as intensas ações antrópicas que alteram o ambiente favorecendo a domiciliação de triatomíneos juntamente com a transmissão oral que ocorre nos municípios do Norte do Estado. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil, no Estado do Tocantins confirmaram-se 29 casos da doença na

forma aguda para o período 2000 - 2017, dentre estes 20 associados à transmissão oral, 3 a transmissão vetorial e 6 sem identificação da forma de transmissão (Tabela 3).

No período de 2010 – 2013, 59% dos óbitos por doença de Chagas na região Norte do Brasil ocorreram no Estado de Tocantins, onde a média de notificações foi de 54 óbitos/ano (regiões de saúde Sudeste com 25%, Capim Dourado com 23% e Cerrado Tocantins Araguaia 13%) (Oliveira et al, 2016).

O Ministério da Saúde incluiu o Estado de Tocantins em dois modelos de vigilância, um voltado para prevenção da transmissão vetorial e outro que objetiva a detecção precoce de caso agudos, criado para a região da Amazônia Legal (SVS/MS 2015).

Dentre os municípios da região Sudeste, em Aurora do Tocantins, a proximidade entre as moradias e as rochas incrementam o risco da transmissão vetorial por *T. costalimai*. Este município foi classificado em 2006 como de alto grau de risco para a transmissão vetorial com base em indicadores de morbidade (casos agudos ou crônicos autóctones da doença), entomológicos (espécie do vetor, infestação e dispersão) e ambientais (domiciliar e extra-domiciliar) (Oliveira et al, 2008). Isto, por sua vez estaria associado às ações antrópicas nos ecótopos naturais, onde a espécie *T. costalimai* participa naturalmente do ciclo silvestre de *T. cruzi*.

Tabela 3: Casos confirmados de doença de Chagas aguda, segundo Região, Unidade da Federação de residência e forma de transmissão. Brasil, 2000 a 2017.

Região/Unidade da Federação	Formas de Transmissão					Total %	
	Oral	Vetorial	Vertical	Ignorada*	Outras**		
Norte	1879	175	2	575	9	2640	93,92
Acre	8	24	0	0	0	32	1,14
Amapá	152	2	0	19	1	174	6,19
Amazonas	81	22	1	13	1	118	4,20
Pará	1617	121	1	474	6	2219	78,94
Rondônia	0	2	0	2	1	5	0,18
Roraima	1	1	0	1	0	3	0,11
Tocantins	20	3	0	6	0	29	1,03
Nordeste	48	16	1	29	2	96	3,42
Bahia	13	0	0	0	0	13	0,46
Ceará	8	1	0	0	0	9	0,32
Maranhão	19	9	0	9	1	38	1,35
Paraíba	0	0	0	1	0	1	0,04
Pernambuco	0	2	0	15	0	17	0,60
Piauí	0	3	0	1	0	4	0,14
Rio Grande do Norte	8	0	1	2	0	11	0,39
Sergipe	0	1	0	1	0	2	0,07
Sudeste	0	2	2	8	1	13	0,46
Espírito Santo	0	0	0	0	1	1	0,04
Minas Gerais	0	0	0	6	0	6	0,21
Rio de Janeiro	0	1	0	0	0	1	0,04
São Paulo	0	1	1	2	0	4	0,14
Sul	25	0	3	0	1	29	1,03
Rio Grande do Sul	1	0	3	0	1	5	0,18
Santa Catarina	24	0	0	0	0	24	0,85
Centro Oeste	0	16	1	14	2	33	1,17
Distrito Federal	0	0	1	0	0	1	0,04
Goiás	0	10	0	12	2	24	0,85
Mato Grosso	0	5	0	1	0	6	0,21
Mato Grosso do Sul	0	1	0	1	0	2	0,07
Brasil	1952	209	9	626	15	2811	100,00

Legenda: * Consiste em casos sem preenchimento da possível forma de transmissão; ** Transmissão acidental e transfusional. Fonte: SINAN e CGDT/DEVIT/SVS/MS. Atualizado por Simone Teves em Setembro/2018.

O parasito *T. cruzi*, agente causador da doença de Chagas, é um protozoário da Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, que se caracteriza por apresentar uma organela semelhante a mitocôndria chamada cinetoplasto, capaz de autoreplicação e que possui uma condensação de DNA (kDNA) (Clayton, 2002).

O ciclo biológico deste parasito é dito heteroxeno, envolvendo um hospedeiro vertebrado (mamíferos silvestres ou domésticos) no qual o parasito pode se apresentar nas formas amastigotas (intracelular), intermediária e tripomastigota sanguíneas (Figura 2) e outro invertebrado (triatomíneos), no qual o parasito pode assumir as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica (Figura 3), que se diferenciam pelo aspecto geral da célula, posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e região de emissão do flagelo (Hoare, 1964; Brener 1971, 1973; Souza, 1999).

Entretanto, Deane e colaboradores (1984) descreveram o ciclo extracelular de *T. cruzi* nas glândulas anais do marsupial *Didelphis marsupialis*, onde neste mamífero o parasito desenvolve o ciclo observado no inseto vetor.

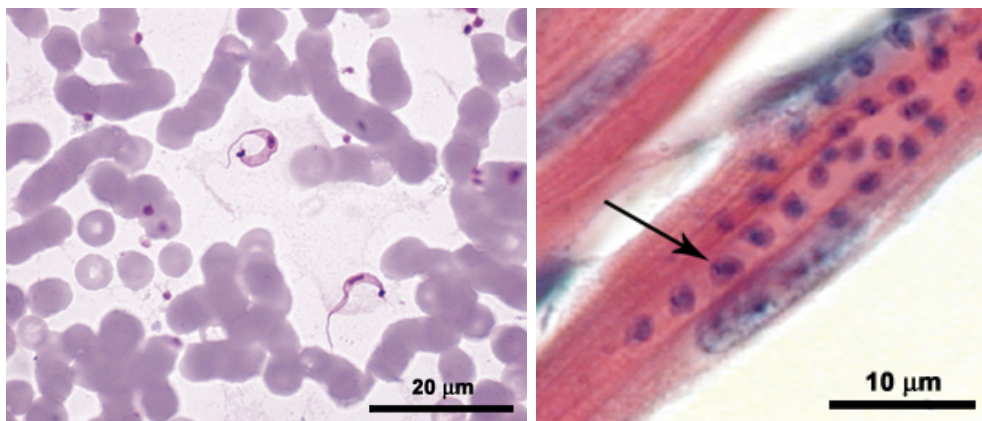


Figura 2: Formas de *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro vertebrado. A: Esfregaço sanguíneo contendo formas tripomastigotas sanguíneas; B: Músculo cardíaco de camundongo infectado com *T. cruzi*, formas amastigotas (seta preta). Fonte: Carvalho, 2017.

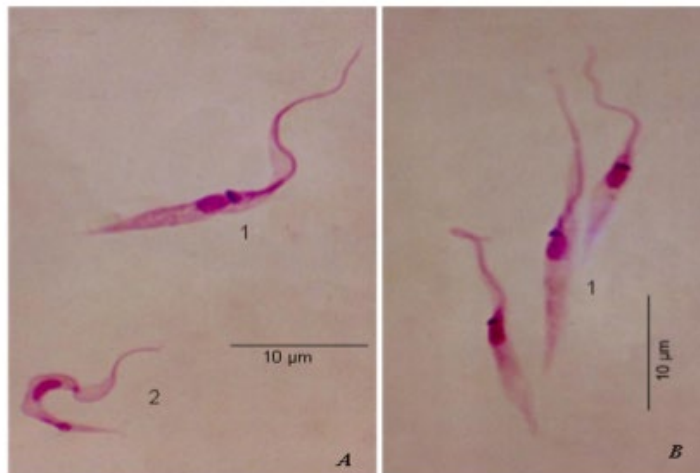


Figura 3: Formas de *Trypanosoma cruzi* visualizadas em meio acelular. A e B: 1 – Formas epimastigotas, 2 – Formas tripomastigota metacíclica. Fonte: Gonçalves, 2000.

A associação do parasito com seus hospedeiros pode ocorrer nos ecótopos doméstico, peridoméstico e silvestre, cuja distribuição geográfica silvestre se estende desde o Sul dos Estados Unidos até o Sul da Argentina e Chile, incluindo o Brasil (Guhl et al, 2000; Jansen et al, 2015).

No ambiente silvestre, o parasito estabelece ciclos de transmissão em diferentes nichos ecológicos e estratos florestais que podem ou não se sobrepor no mesmo fragmento da floresta. Em cada habitat específico de um bioma, diferentes espécies de animais podem atuar como hospedeiros, que atualmente incluem oito ordens de mamíferos (Artiodactyla, Carnivora, Chiroptera, Didelphimorphia, Perissodactyla, Primatas, Rodentia e Cingulata), assim como as inúmeras espécies de triatomíneos podem estar atuando como vetores entre os animais (Rassi et al, 2010; Barros et al, 2017). O entendimento destes ciclos de transmissão de *T. cruzi* constitui um processo contínuo de estudos, mediante a diversidade e plasticidade gênica deste parasito, sua ampla distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros mamíferos e insetos vetores (Lima et al, 2014).

Diferentes abordagens têm sido utilizadas para caracterizar a estrutura populacional de *T. cruzi* de modo a definir a ecologia dos subgrupos. Atualmente, existem sete subgrupos gênicos reconhecidos, denominados unidades discretas de tipagem (Discrete Typing unit – DTU): TcI-TcVI e Tcbat (Lima et al, 2014; Zingales et al, 2012). Essas DTUs possuem perfis moleculares distintos caracterizados com a utilização de enzimas de restrição de diferentes genes. Todos estes subgrupos são encontrados no Brasil sendo mais prevalentes TCI e TCII.

Os triatomíneos se infectam com o parasito *T. cruzi* durante o repasto sanguíneo sobre o hospedeiro mamífero infectado, quando ingerem as formas tripomastigotas sanguícolas. No intestino médio dos triatomíneos, sob condições específicas de pH e temperatura, estas formas diferenciam-se em epimastigotas. Após multiplicação ativa nos intestinos médio e posterior, os epimastigotas sofrem uma nova diferenciação na ampola retal, a metaciclo gênese, adotando a forma tripomastigota metacíclica que constitui a forma infectante para os hospedeiros vertebrados. Estas são eliminadas pelas fezes logo após ou até mesmo durante o

repasto sanguíneo, podendo penetrar nos hospedeiros vertebrados por meio de lesões cutâneas, mucosas ou conjuntiva. As formas tripomastigotas metacíclicas podem invadir diferentes tipos celulares incluindo macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outras. Ao invadir estas células, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas, que se proliferam por divisão binária. Depois de intensa divisão, as formas amastigotas recuperam as formas tripomastigotas sanguícolas que rompem a célula, as quais podem então invadir novas células localizadas no sítio de infecção ou podem atingir a via linfática e sanguínea, e potencialmente atingir diferentes tecidos do hospedeiro, invadindo os mais diversos tipos celulares, em especial células musculares (cardíaca, lisa e esquelética) e ganglionares, o que no caso do homem, ocasiona os diferentes quadros clínicos, agudos ou crônicos da doença de Chagas (Figura 4) (Argolo et al, 2008; Rey, 2013).

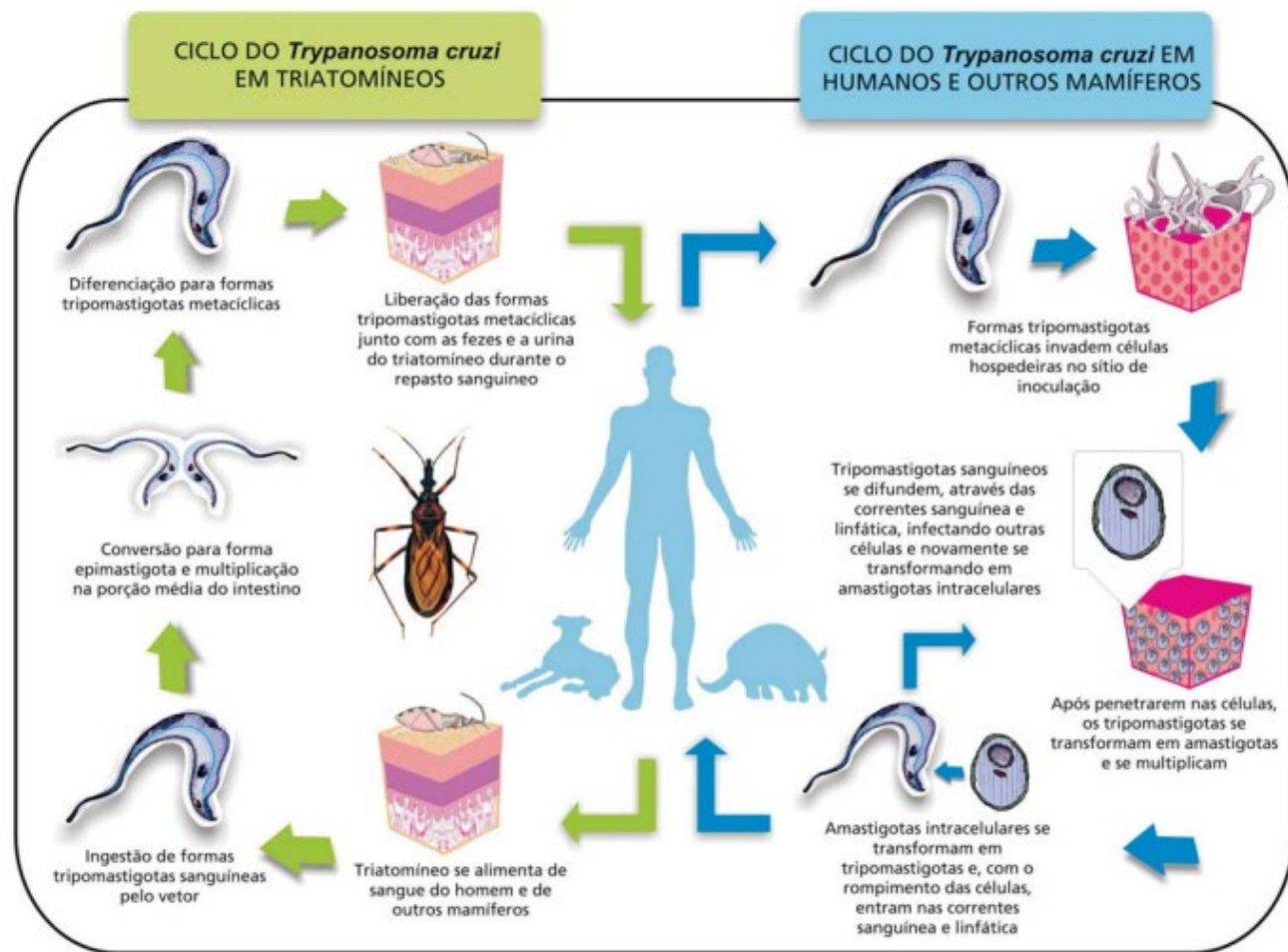


Figura 4: Desenho esquemático do ciclo de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos, humanos e outros mamíferos. Fonte: Argolo et al, 2008.

1.3 AS ESPÉCIES *Triatoma jatai* e *Triatoma costalimai*

A espécie *T. jatai* foi descrita a partir de espécimes capturados em rochas, no ambiente silvestre do município de Paranã-TO, onde também se encontra a espécie *T. costalimai* em simpatria (Gonçalves et al, 2013). Até o momento a espécie *T. jatai* somente foi encontrada no município de Paranã – TO. Contudo, estudos de monitoramento de triatomíneos realizados pela equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera IOC/FIOCRUZ no período de 2004 a 2008 em parceria com a Usina Aproveitamento Hidrelétrico de Peixe Angical e com a Secretaria de Saúde do Tocantins – TO , de 2007 a 2009, possibilitou o encontro de espécimes de *T. costalimai* também nos municípios de Lavandeira, Aurora do Tocantins, Novo Alegre, Novo Jardim e Taguatinga localizados na região Sudeste deste Estado.

Gonçalves e colaboradores (2013) comentaram sobre o registro de três espécimes de *T. jatai*, 1 macho e 2 fêmeas, no intradomicílio, no município de Paranã. Contudo, ainda não houve registro de *T. jatai* infectado por *T. cruzi* (Brito et al, 2017b).

T. costalimai, descrita por Verano & Galvão em 1959, a partir de espécimes coletados em rochas no município de Taguatinga, teve seu primeiro registro de infecção por *T. cruzi* em 1981, em um inseto capturado em rochas no ambiente silvestre no Estado de Goiás (Mello & Borges, 1981). Em 1982, Mello registrou novamente, em mesma localidade, o encontro de espécimes de *T. costalimai*, roedores e marsupiais infectados com *T. cruzi*, sugerindo a participação desta espécie de triatomíneo no ciclo de transmissão silvestre do parasito *T. cruzi*. Outros estudos também registraram esta espécie nos Estados de Goiás (Silva et al, 1992, Oliveira & Silva, 2007, Machiner et al, 2012); Tocantins, neste caso apresentando expressivas taxas de infecção por *T. cruzi* (Gonçalves et al, 2009; Brito et al, 2017); e Bahia (Gurgel-Gonçalves et al, 2012).

Estudos morfológicos dos adultos destas espécies utilizando a microscopia eletrônica de varredura foram realizados por Obara et al (2007) para descrição do escutelo de *T. costalimai* e por Teves-Neves et al (2011) e Teves-Neves (2012) para caracterização morfológica da genitália externa de fêmeas de ambas espécies.

Obara e colaboradores (2007) estudaram a morfologia dos ovos de *T. costalimai* e outras cinco espécies do gênero *Triatoma*. Muller (2013) realizou estudo comparativo da morfologia dos ovos de *T. costalimai* e *T. jatai*, cujas características apresentadas podem ajudar na identificação taxonômica destas espécies.

A biologia de *T. costalimai* foi apresentada por Schofield e colaboradores (1980) e Isac e colaboradores (2000), contudo ainda não se tem trabalhos sobre o desenvolvimento biológico de *T. jatai*.

A similaridade entre as espécies *T. jatai* e *T. costalimai* (Figura 5) começou a ser estudada quando espécimes adultos de triatomíneos, de morfologia próxima a *T. costalimai*, não puderam ser identificados somente pelos caracteres morfológicos clássicos. Sendo assim, um estudo multidisciplinar comparativo da morfologia externa de adultos e da genitália de machos, da morfometria clássica e morfometria geométrica das asas concluiu se tratar de uma nova espécie, permitindo assim a descrição morfológica *T. jatai* (Teves-Neves, 2012; Gonçalves et al, 2013).

Triatoma jatai

Triatoma costalimai



Figura 5: Adultos das espécies *Triatoma jatai* e *Triatoma costalimai*.

Fotos: Catarina Macedo.

Ambas espécies estão agrupadas no subcomplexo *T. matogrossensis* (Schofield & Galvão et al, 2009; Gonçalves et al, 2013), contudo segundo Gardim e colaboradores (2013) a espécie *T. costalimai* não apresentou forte suporte quando relacionados os genes mitocondriais e nucleares em relação as demais espécies do subcomplexo *T. matogrossensis*, nesta análise sugeriu-se a revisão taxonômica do agrupamento, sem incluir *T. jatai*. Pita et al (2016) também questionou este agrupamento assim como verificou um distanciamento molecular da espécie *T. costalimai* em relação as demais espécies com exceção de *T. jatai*.

O estudo da participação das espécies *T. jatai* e *T. costalimai* no ciclo do parasito *T. cruzi* assim como aspectos morfológicos, biológicos e moleculares que compõem sua atuação como vetor, gera dados que servem de suporte para os programas de vigilância entomológica e epidemiológica da doença de Chagas.

Neste contexto, pretendeu-se com a realização deste trabalho testar as seguintes hipóteses:

- As espécies *T. jatai* e *T. costalimai* podem ser encontradas com a infecção natural pelo parasito *T. cruzi* no ambiente silvestre e constituem potenciais vetores da doença de Chagas;
- As fêmeas braquípteras de *T. jatai* tem potencial para dispersão pelo voo quando comparadas suas características morfológicas com as da espécie também braquíptera *T. sherlocki* e com a espécie *T. costalimai*;
- O acompanhamento do ciclo biológico de *T. jatai* e *T. costalimai* em condições de laboratório possibilita prever o risco de adaptação da espécie ao domicílio;
- Caracteres genéticos possibilitam a diferenciação das espécies *T. jatai* e *T. costalimai*.

Portanto, o objetivo principal foi realizar a caracterização morfológica, biológica e molecular das espécies *T. jatai* e *T. costalimai* tendo-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a infecção por *T. cruzi* e respectivo subgrupo (DTU) em espécimes de *T. jatai* e *T. costalimai* provenientes do Estado do Tocantins;
- Estudar a morfologia das estruturas de locomoção de adultos de *T. jatai*;
- Observar o ciclo de desenvolvimento de ovo a adulto de *T. jatai*, em comparação com *T. costalimai* em condições de laboratório;
- Determinar a posição filogenética de *T. jatai* e *T. costalimai* em relação a outras espécies de ocorrência na América do Sul mediante o estudo de genes mitocondriais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura são elencados os principais trabalhos científicos utilizados para o desenvolvimento das hipóteses deste estudo, assim como para avaliação dos métodos escolhidos para análise e interpretação dos resultados.

Para os aspectos morfológicos associados ao voo, com ênfase no dimorfismo alar de *T. jatai* não encontrado na espécie irmã *T. costalimai*, foram selecionados trabalhos relativos à morfologia de triatomíneos e de outros grupos de insetos, uma vez que pela primeira vez estes aspectos são abordados para as espécies de estudo.

O ciclo de desenvolvimento biológico foi analisado com base na literatura referente a espécies de triatomíneos do gênero *Triatoma* de ocorrência no Cerrado e que se desenvolvem sobre as mesmas condições ambientais que *T. jatai* e *T. costalimai*.

Para as análises moleculares foram selecionados os estudos de filogenia de triatomíneos de ocorrência no Brasil, com base no estudo de genes mitocondriais, também utilizados neste estudo para o conhecimento das relações filogenéticas de *T. jatai* e *T. costalimai* com outras espécies representativas dos subcomplexos de triatomíneos segundo Schofield & Galvão, 2009.

Por fim, diante do encontro de espécimes de *T. costalimai* naturalmente infectados para *T. cruzi*, foi realizado um levantamento sobre as principais metodologias que vem sendo utilizadas para caracterização populacional de *T. cruzi* e sobre o perfil dos isolados encontrados nas localidades de Bioma Cerrado.

2.1 - ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS ESTRUTURAS ASSOCIADAS À LOCOMOÇÃO DE ADULTOS

A dispersão dos insetos pode estar associada a vários fatores como a busca pela fonte alimentar, pelo parceiro para a cópula, de um local para oviposição, assim como de novos ecótopos permitindo a fuga de predadores ou de condições ambientais desfavoráveis. Dentro de suas funções ecológicas, portanto, os insetos apresentam características morfológicas externas, como os apêndices, asas e pernas, que garantem a locomoção, seja pelo voo ou por caminhada.

Estudos científicos vêm mostrando o polimorfismo no tamanho das asas em diferentes grupos de insetos associado a funções fisiológicas e ecológicas. A variação morfológica das asas pode estar associada ao tamanho, forma e quantidade de músculos alares bem como caracterizar diferentes morfotipos dentro de uma mesma espécie onde tanto machos ou fêmeas podem apresentar asas totalmente desenvolvidas (macropteros ou alados), asas reduzidas (braquipteros) ou não possuir asas (ápteros), o que certamente influencia no tipo de locomoção utilizada (voo ou caminhada).

Estudo de dípteros da espécie *Drosophila melanogaster* demonstrou que a capacidade de dispersão das moscas aumenta quanto maior o tamanho corporal, assim como que, para as fêmeas, tanto o tamanho corporal quanto a duração do voo influenciam na produção de ovos (Roff, 1977).

No grupo Orthoptera, estudo com as espécies de grilos *Gryllus firmus* Scudder, 1902 e *Allonemobius fasciatus* (De Geer 1773) mostrou que, em ambas, a produção de ovos é diminuída em fêmeas macropteras. Na espécie *A. fasciatus* a característica de perda das asas propicia um aumento na produção de ovos e, em *G. firmus*, o polimorfismo da asa pode estar influenciando o controle genético, cuja diminuição da fecundidade é suficientemente grande para que os genótipos que produzem apenas descendentes macropteros possam persistir em ambientes instáveis, onde a dispersão é necessária para sobrevivência (Roff, 1984).

Roff (1986), a partir de um estudo de revisão de literatura sobre a dispersão de diversas espécies de insetos, afirma que insetos dimórficos de asa são excelentes para um estudo da evolução da dispersão uma vez que a morfologia braquiptera é facilmente reconhecida. Segundo o autor, um aumento da frequência e capacidade adaptativa de um braquiptero em uma população pode resultar em aumento da aptidão para esse tipo de mudança ou resultar na emigração do tipo macroptero, o que geralmente resulta em maior fecundidade do morfotipo braquiptero em relação ao macroptero. A supressão da presença de asas ocorre quando algum hormônio, talvez hormônio juvenil, excede um valor limiar durante um estágio crítico de desenvolvimento.

A dispersão pelo voo de espécies de triatomíneos vem sendo estudada ao longo dos anos, principalmente para a espécie *T. infestans*, em experimentos em laboratório ou no campo relacionando a atividade ou indução do voo principalmente com as características ambientais como condição de temperatura, umidade, fotoperíodo e até mesmo a condição fisiológica do inseto, tais como status nutricional e reprodutivo. Contudo estes estudos envolveram somente espécies macropteras sem a descrição morfométrica de características morfológicas associadas ao voo (Gringorten & Friend, 1979; Erkens, 1981; Lehane & Schofield, 1981, 1982; Schofield & Matheus, 1985; Schofield et al, 1991; Lehane et al, 1992; Schofield et al, 1992; McEwen & Lehane, 1993; McEwen & Lehane, 1994; Galvão et al, 2001; Gurevitz et al, 2006, 2007).

Braendle e colaboradores (2006) discutem os aspectos evolutivos do polimorfismo alar dos afídeos, que são hemípteros fitófagos, cuja variação morfológica das asas, assim como sua presença ou ausência pode ocorrer tanto em machos quanto em fêmeas. Estas espécies desenvolveram morfotipos adaptados a dispersão e possuem um conjunto completo de asas bem como uma fisiologia sensorial e reprodutiva que é adaptada para voar e se reproduzir em um novo local. Por outro lado, os morfotipos não dispersivos são sem asas e mostram adaptações para maximizar a fecundidade. Essas variações morfológicas poderiam ser associadas tanto a fatores genéticos quanto a fatores ambientais garantindo a permanência das espécies em diversos ecótopos e em diferentes variações de temperatura, por exemplo.

Em 2007, Carbajal de la Fuente e colaboradores avaliaram no Bioma Caatinga, com a utilização de armadilha luminosa, a influência de uma fonte de luz como fator atrativo para indução da dispersão pelo voo de triatomíneos das espécies *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*.

As espécies de triatomíneos do gênero *Mepraia* apresentam polimorfismo das asas onde as fêmeas são micrópteras e os machos podem ser tanto micrópteros quanto braquipteros ou macropteros e por isso podem ser utilizadas como modelo para o estudo de adaptações morfológicas relacionadas a atividades de voo. Pesquisas tem associado estudos morfológicos das asas com o fenótipo antenal para espécies deste gênero, considerando-se que a capacidade de explorar mais ambientes pode estar associada a dispersão pelo voo o que resultaria no encontro de maior quantidade de sensilas olfativas em insetos macropteros que em micrópteros (Moreno et al, 2006; Hernandez et al, 2008).

Abrahan e colaboradores (2011) estudaram a capacidade de dispersão de *T. infestans* e demonstraram a dispersão das fêmeas por caminhada o que permitiria locomoção quando estivessem ingurgitadas e os ovários com ovos, o que seria uma característica vantajosa a colonização de novos habitats.

Em 2012, Almeida e colaboradores testaram, pelo estudo de características morfológicas de espécimes das espécies *T. sherlocki*, *T. juazeirensis* e híbridos, a hipótese de que triatomíneos com diferentes graus de braquiopatia apresentam a capacidade de voar e afirmaram que *T. sherlocki*, espécie braquíptera, se locomove por caminhada tendo as pernas aumentadas como característica adaptativa.

Estudos sobre espécies de triatomíneos permitem supor que cabeça e tórax sofrem alterações significativas relacionadas a mudanças nas asas e podem ser indicadores da capacidade de voo. Para a espécie *Mepraia spinolai* (Porter, 1934) em estudo da morfometria geométrica da cabeça, tórax e sensilas antenais olfativas de espécimes com e sem asas da espécie, estes marcadores se mostraram úteis para prever a habilidade de voo em triatomíneos domésticos, especialmente no contexto de reinfestação das casas (Hernandez et al, 2015).

Estudos futuros da avaliação das características morfológicas associadas a locomoção dos triatomíneos envolvendo espécies já registradas no peri e intradomicílio como *T. jatai* e *T. costalimai*, assim como dos diversos fatores ambientais e fisiológicos que induzem a dispersão pelo voo podem auxiliar na elaboração de estratégias de controle da transmissão vetorial da doença de Chagas, principalmente no contexto de infestação e reinfestação domiciliar.

2. 2 CICLO DE DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO DE TRIATOMÍNEOS

O conhecimento das características biológicas dos triatomíneos permite estimar sua capacidade de colonização, principalmente no caso de espécies antropofílicas ou com tendências a domiciliação, assim como geram dados que podem ser utilizados pelos programas de controle vetorial.

As primeiras informações sobre o ciclo biológico de triatomíneos, em laboratório, foram publicadas por Arthur Neiva em 1910, que estudou a bionomia de *Panstrongylus megistus*, na época ainda situado no gênero *Conorhinus*. A observação do desenvolvimento de barbeiros capturados em São Paulo, criados em gaiolas e com alimentação em cobaias, foi descrita em detalhes. Neiva ressaltou a influência da alimentação e temperatura na oviposição, eclosão dos ovos e desenvolvimento das ninfas, assim como apresentou detalhes de coloração, de fisiologia dos insetos após as mudas e relatou que as condições artificiais auxiliaram na evolução dos insetos. As observações envolveram o tempo de desenvolvimento de cada estágio e do ciclo completo de ovo a adulto e de ovo a ovo.

A partir de então, inúmeros trabalhos têm sido realizados para descrição dos aspectos bionômicos de várias espécies de triatomíneos com a caracterização do ciclo biológico, longevidade, fecundidade e fertilidade em condições laboratoriais.

O Bioma Cerrado abrange 12 Estados brasileiros dentre estes o Tocantins, que apresenta 16 espécies registradas até o momento (Galvão & Gurgel-Gonçalves, 2015), das quais cinco do gênero *Triatoma* tiveram o ciclo de desenvolvimento estudados em condições ambientais artificiais (*T. sordida*, *T. pseudomaculata*, *T. costalimai*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*) e uma do gênero *Rhodnius* (*R. neglectus*). Da mesma forma, quatro espécies deste mesmo gênero que apresentam registro de ocorrência em outros Estados com bioma

cerrado, também foram observadas em laboratório (*T. matogrossensis*, *T. williami*, *T. jurbergi* e *T. wygodzinskyi*).

No quadro 1, encontra-se um levantamento de trabalhos que têm sido realizados para o estudo do ciclo biológico destas espécies do gênero *Triatoma* que ocorrem naturalmente no Cerrado e estado do Tocantins, relacionando as condições ambientais de observação, fonte de alimentação e características biológicas observadas.

Quadro 1: Levantamento bibliográfico em ordem cronológica de estudos bionômicos realizados sob condições ambientais artificiais de espécies de triatomíneos que ocorrem naturalmente no estado do Tocantins. (Continua)

Espécie (s)	Condições ambientais	Alimentação	Características biológicas descritas	Autor/Ano
<i>T. sordida</i>	Ambiente	Não informado	Tempo do ciclo de vida	Pinto (1949)
<i>T. sordida</i>	Ambiente	Pombos e cobaios	Tempo do ciclo de vida	Dias (1955)
<i>T. pseudomaculata</i>	Ambiente.	Sangue humano (ninfas de primeiro estágio) e coelho	Tempo de desenvolvimento de cada estágio ninfal, quantidade de repastos, mortalidade, longevidade dos adultos.	Heitzmann-Fontenelle (1972)
<i>T. sordida</i>	T: 23,7°C UR: 74,1%	Pombos	Tempo do ciclo de vida, duração de cada estágio ninfal, mortalidade, período de incubação dos ovos, viabilidade dos ovos.	Mello (1976)
<i>T. sordida</i>	Ambiente	Coelho	Tempo de desenvolvimento de ovos e ninfas, quantidade de repastos, longevidade dos adultos, tempo total do ciclo de vida.	Heitzmann-Fontenelle (1978)
<i>T. sordida</i>	T: 25±3°C UR: 60-80%	Camundongos	Tempo de vida como ninfa e adulto, quantificação dos períodos ante-oviposição, oviposição e pós-oviposição.	Souza et al (1978)
<i>T. sordida</i> <i>R. neglectus</i>	Ambiente	Camundongos e pombos	Primeiro repasto de cada estágio ninfal, quantidade de sangue ingerido em cada fase de desenvolvimento de N1 a adultos machos e fêmeas e resistência ao jejum.	Mello (1980)
<i>T. costalimai</i>	T: 27±3°C UR: 40-80%	Galinha	Tempo de desenvolvimento de ovos e ninfas, mortalidade.	Schofield et al (1980)

Quadro 1: Continuação.

Espécie (s)	Condições ambientais	Alimentação	Características biológicas descritas	Autor/Ano
<i>T. sordida</i>	T: 25°C e 30°C UR: 60-70%	Camundongos	Duração da fase embrionária, do ciclo evolutivo e da fase adulta, necessidade alimentar, número de repastos necessários para obtenção do alimento e o seu crescimento ponderal, resistência ao jejum, mortalidade.	Juarez & Silva (1982)
<i>T. brasiliensis</i>	T: 18-26°C UR: 50-70%	Coelho	Duração dos estádios ninfais e ciclo de vida, longevidade dos adultos, quantidade de repastos em cada estágio e mortalidade.	Heitzmann- Fontenelle (1983/84)
<i>T. matogrossensis</i> <i>T. sordida</i>	T: 25±0,5°C ou 30±1°C UR: 70-5% Fotoperíodo: 12h.	Galinha	Fecundidade e fertilidade, resistência ao jejum, quantidade de sangue ingerido, período de incubação dos ovos e de cada estágio ninfal e período ninfal total, período de pré-postura.	Silva (1985)
<i>T. brasiliensis</i>	T: 25±0,5°C ou 30±1°C UR: 70-5% Fotoperíodo:12 h	Galinha	Período de incubação dos ovos, duração dos estádios ninfais e ciclo de vida, período pré-postura, fecundidade e fertilidade.	Silva (1990)
<i>T. sordida</i>	T: 27±1°C UR: 60-70%	Pombo	Comportamento alimentar, padrões de defecação de ninfas de 5º estágio e adultos.	Crocco & Catalá (1996)
<i>T. sordida</i>	T: 28±3°C UR: 63±10 %	Galinha	Incubação dos ovos, tempo de desenvolvimento dos estádios ninfais, longevidade dos adultos, mortalidade e fecundidade.	Oscherov et al (1996)
<i>T. pseudomaculata</i>	T: 28±1°C UR: 80±5%	Pombo	Tempo de desenvolvimento de ovo a adulto, tempo de início de alimentação, quantidade de alimentação e tempo de defecação.	Gonçalves et al (1997)
<i>T. brasiliensis</i>	T: 29,10°C UR: 71,81%	Camundongos	Período intermuda, resistência ao jejum de populações de <i>T. brasiliensis</i> .	Costa & Marchon-Silva (1998)

Quadro 1: Continuação.

Espécie (s)	Condições ambientais	Alimentação	Características biológicas descritas	Autor/Ano
<i>T. matogrossensis</i>	T: 26±2°C UR: 60±80%	Coelhos e pombos	Tempo de vida do macho e da fêmea (em semanas); o número de ovos postos por semana antes e após a morte do macho e a proporção de ovos eclodidos antes e depois da morte do macho.	Marassá et al (1998)
<i>T. costalimai</i>	T: 28±1°C UR: 65±5% Fotoperíodo: 12 horas	Camundongos	Oviposição, fertilidade, resistência ao jejum, duração dos estádios ninfais, período médio de alimentação.	Isac et al (2000)
<i>T. jurbergi</i>	T: 25±0,5°C ou 30±0,5°C UR: 52±1% Fotoperíodo: 12 horas	Galinha	Tempo de incubação dos ovos, primeiro repasto, duração dos estádios ninfais, período ninfal total, tempo total do ciclo de vida, período pré-postura, posturas, fecundidade e fertilidade.	Gomes & Silva (2000)
<i>T. brasiliensis</i> <i>T. pseudomaculata</i> <i>T. infestans</i>	T: 28±1°C UR: 70±5%	Camundongos	Tempo de ciclo de vida, fecundidade, tempo de soldagem (demora entre a inserção das peças bucais no hospedeiro e o encontro do vaso), ação anticoagulante da saliva.	Guarneri et al (2000)
<i>T. infestans</i> <i>T. brasiliensis</i> <i>T. sordida</i> <i>T. pseudomaculata</i>	T: 28±1°C UR: 65±5%	Ratos ou pombos	Ciclo de vida de ovo a adulto, fecundidade e mortalidade.	Guarneri et al (2000)
<i>T. brasiliensis</i>	T: 28±1°C UR: 16.4, 35.9, 56.8, 71.7 e 87.5% Fotoperíodo: 12horas	Galinha	Eclosão dos ovos, mortalidade, oviposição, alimentação e muda em diferentes umidades relativas.	Guarneri et al (2002)

Quadro 1: Continuação.

Espécie (s)	Condições ambientais	Alimentação	Características biológicas descritas	Autor/Ano
<i>T. brasiliensis</i>	T: 12 a 41°C UR: 65±10% Fotoperíodo: 12horas	Galinha	Eclosão dos ovos, mortalidade, oviposição, alimentação e muda em diferentes temperaturas.	Guarneri et al (2003)
<i>T. pseudomaculata</i> <i>T. wygodzinskyi</i>	T: 28±2°C UR: 70±5%	Camundongo	Tempo de desenvolvimento total de ovo a adulto e de cada estágio ninfal, quantidade de sangue ingerido por repasto e mortalidade em cada estágio ninfal.	Carbajal de la Fuente et al (2010)
<i>T. williami</i>	T: 27±1°C UR: 70±10%	Codorna ou Camundongo	Tempo de desenvolvimento de ovo a adulto, tempo de defecação, tempo de jejum até o primeiro repasto em cada estágio, período de jejum antes da muda, duração da alimentação, número de repastos e mortalidade.	Lunardi et al (2015)

2.3 ANÁLISE DE GENES MITOCONDRIAIS NA SISTEMÁTICA DE TRIATOMÍNEOS

A sistemática molecular, por análise do genoma mitocondrial, vem sendo utilizada ao longo dos anos, exclusivamente ou em conjunto com abordagens morfológicas e morfométricas no estudo da taxonomia e evolução dos triatomíneos. Neste tópico da revisão, serão elencados alguns estudos de sistemática molecular de triatomíneos, com utilização de genes mitocondriais, com ênfase para os subcomplexos do gênero *Triatoma*, o subcomplexo Matogrossensis e as espécies *Triatoma jatai* e *Triatoma costalimai*.

Os primeiros estudos envolvendo genes mitocondriais foram realizados em meados da década de 90, quanto até então, as metodologias empregadas para definição e diferenciação taxonômica das espécies, bem como para estudo da relação evolutiva entre elas, abordavam os caracteres morfológicos, morfométricos e estudos genéticos principalmente por análise de isoenzimas.

Stothard e colaboradores (1998) foram um dos pioneiros no estudo filogenético a partir de genes mitocondriais de triatomíneos, cujo estudo corroborou com a sistemática convencional mostrando a diferenciação dos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* em dois clados evolutivos principais, Rhodniini e Triatomini e demonstrou também distâncias genéticas maiores entre as espécies *R. pictipes* e *R. prolixus* do que entre *Panstrongylus* e *Triatoma*.

Garcia & Powell (1998) estudaram a relação filogenética entre 8 espécies de *Triatoma* pela comparação de sequências de genes mitocondriais 12S, 16S e COI e observaram semelhança entre as espécies *T. infestans* e *T. platensis*, sugerindo um processo de introgessão de DNA ao longo da história evolutiva destas espécies. Segundo estas análises, a espécie primitiva para este grupo de espécies seria *T. vitticeps* e a espécie *T. circummaculata* se aproximava por esta abordagem ao complexo infestans, o que não refletia a classificação morfológica existente.

Lyman e colaboradores (1999), analisaram fragmentos de DNA mitocondrial 16S, rRNA e Citocromo b (Cyt b) de 11 espécies de triatomíneos e observaram a nítida separação entre as tribos Rhodniini e Triatomini em três clados principais: Um contendo as espécies de *Rhodnius*, outro com as espécies de *Triatoma* das Américas do Norte e Central e um terceiro grupo contendo as espécies da América do Sul. Estes observaram também o alinhamento das espécies *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894) no clado de *Triatoma*, indicando a origem parafilética deste gênero.

Em 1999, Monteiro e colaboradores, utilizaram a análise de DNA mitocondrial do gene citocromo b como uma abordagem para definição taxonômica entre as espécies *Triatoma melanosoma* e *T. infestans* e, a partir da alta proximidade gênica observada entre estas, sugeriram se tratar de uma mesma espécie na qual, *T. melanosoma*, seria somente uma população de *T. infestans* com uma variação cromática que havia se fixado.

Em 2001, Garcia e colaboradores estudaram as relações filogenéticas de 18 espécies de triatomíneos com base em sequências de DNA mitocondrial 12S, 16S e COI e observaram a formação de um clado contendo *T. infestans*, *Triatoma platensis* Neiva, 1913 e *Triatoma delpontei* Romaña & Abalos, 1947 e outro contendo *T. sordida* e *Triatoma matogrossensis* Leite & Barbosa, 1951, assim como puderam confirmar a inclusão da espécie *Triatoma*

circummaculata Stal, 1859 no complexo Infestans, embora estivesse em desacordo com a classificação morfológica. Em contrapartida, observaram a proximidade genética entre *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) e *Triatoma mazzotti*, consistente com estudos morfológicos.

Hypsa e colaboradores (2002) combinaram diferentes fragmentos de gene, incluindo DNA mitocondrial 16S e 12S rDNA para estudar a filogenia e evolução de 57 espécies das tribos Rhodniini, Linshcosteini e Triatomini da subfamília Triatominae reunindo pela primeira vez espécies do Novo Mundo e do Velho Mundo.

A análise de DNA mitocondrial citocromo b, foi utilizada para estudo da sistemática e filogeografia de populações da espécie *Triatoma brasiliensis* quando concluiu se tratar de um complexo de espécies com quatro formas cromáticas distintas (*brasiliensis*, *macromelasoma*, *juazeiro* e *melanica*) e foi possível sugerir, pelas distâncias genéticas encontradas, combinadas com estudos utilizando outras metodologias, que *juazeiro*, *melanica* e *brasiliensis* + *macromelasoma* poderiam ser consideradas três espécies (Monteiro et al, 2004).

Sainz e colaboradores (2004) estudaram a filogenia de 32 espécies de triatomíneos pela análise de genes 12S, 16S e citocromo oxidase I, e observaram a inclusão das espécies *T. costalimai*, *Triatoma guazu* Lent & Wygoszinsky, 1979 e *T. circummaculata* no complexo Infestans bem como que esta análise filogenética não apoiou a monofilia das espécies do referido complexo.

Fragmentos de gene citocromo oxidase I e citocromo b foram utilizadas no estudo da relação filogenética de populações das espécies *Triatoma rubida* (Uhler, 1894) e *Triatoma recurva* (Stål, 1868), que mostrou o processo evolutivo destas espécies com a confirmação e validação de subespécies de *T. rubida*, agrupadas com espécies do complexo Phyllosoma, assim como para subespécies de *T. recurva* que se agruparam com espécies do complexo Infestans (Pfeiler et al, 2006).

Em 2009, a análise de fragmentos de DNA mitocondrial (cyt b, 16S) e RNA ribossomal foi utilizada para estudar a filogenia da espécie *Triatoma skerlocki* dentro do grupo dos triatomíneos e permitiu sugerir que, apesar de ser diferenciada dos membros do complexo *T. brasiliensis* em termos morfológicos, esta espécie é um membro deste complexo e constitui uma espécie irmã de *Triatoma melanica* (Mendonça et al, 2009).

Almeida e colaboradores (2009) estudaram por análise filogenética de DNA mitocondrial 12S, 16S e citocromo oxidase a filogenia das espécies *Triatoma carcavalloii* Jurberg, Rocha & Lent, 1998, *T. rubrovaria* e *T. circummaculata*, que compartilham características morfológicas e estavam alocadas segundo caracteres morfológicos nos complexo Infestans, subcomplexo Rubrovaria (as duas primeiras) e complexo Circummaculata, respectivamente. A filogenia mostrou que as espécies *T. carcavalloii* e *T. rubrovaria* constituem espécies irmãs com alta proximidade genotípica de *T. circummaculata* e foi proposto que, devido a esta proximidade genotípica, as três espécies podem constituir o subcomplexo Rubrovaria, complexo Infestans.

Schofield & Galvão (2009) em artigo sobre classificação, evolução e taxonomia de triatomíneos apresentaram uma proposta de agrupamento das espécies de *Triatoma* em complexos e subcomplexos de acordo com características filogeográficas e realizaram uma re-análise de sequências de DNA mitocondrial 16 S utilizadas por Hypsa et al (2002) com a inclusão de novas sequências de reduviídeos predadores.

Mas-Coma & Bargues (2009), em revisão bibliográfica sobre a sistemática molecular de triatomíneos, apresentaram os marcadores mitocondriais e nucleares, discutindo as vantagens e desvantagens de cada um, quando utilizados nos estudos filogenéticos deste grupo.

Rosa e colaboradores (2012) utilizaram análise de fragmento de gene citocromo b, em conjunto com outras metodologias para estudos morfológicos e moleculares, na definição taxonômica da espécie *Rhodnius montenegrensis* e enfatizaram que os dados moleculares devem ser utilizados como ferramentas complementares aos estudos morfológicos na definição taxonômica de uma espécie.

Teves-Neves (2012) realizou a primeira análise de DNA mitocondrial COI e 16S de espécimes de *Triatoma costalimai* oriundos do Estado do Tocantins – Brasil e espécimes de *Triatoma* sp, descrita em 2013 como *T. jatai*, mostrando a estreita relação genética entre eles, em consonância com as análises morfológicas e morfométricas.

Em 2013, Abad-Franch e colaboradores, utilizaram a análise de DNA mitocondrial, citocromo b, em conjunto com análises morfológicas e morfométricas, para a definição da espécie *Rhodnius barreti* cujas distâncias genéticas confirmaram se tratar de uma nova espécie.

Gardim e colaboradores (2013) utilizaram fragmentos de gene citocromo oxidase I, 16S rDNA e citocromo b no estudo das relações filogenéticas entre as espécies do subcomplexo *matogrossensis*. Estes observaram que duas espécies, *T. baratai* e *T. costalimai*, não apresentaram alta proximidade em relação a outros membros deste subcomplexo que se dividiu em três clados, um contendo *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vandae*, *T. garciabesi* e *T. sordida*, outro com *T. guasayana* como grupo irmão do primeiro clado e o terceiro com *T. williamsi*, e *T. guazu*. A partir destas análises, sugeriram uma revisão dos subcomplexos dentro do gênero *Triatoma*.

No estudo das relações filogenéticas entre *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata*, *T. vitticeps* e outras espécies de triatomíneos com foco em membros do subcomplexo *T. brasiliensis* foram utilizados os fragmentos de DNA mitocondrial (Cyt b, citocromo oxidase COI e 16S). As espécies *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* e *T. vitticeps* foram separadas das demais espécies de *Triatoma* da América do Sul, como os membros do complexo Brasiliensis, assim como pode-se observar a aproximação genética de *Panstrongylus megistus* e *T. tibiamaculata* como espécies irmãs sendo sugerida uma revisão dos gêneros de Triatomini, inicialmente estabelecidos por caracteres morfológicos (Gardim et al, 2014).

Souza e colaboradores (2016) utilizaram análise de DNA mitocondrial cyt b, em estudo taxonômico multidisciplinar incluindo caracteres morfológicos, morfométricos e moleculares, para a definição específica de *Rhodnius marabaensis* cuja análise filogenética mostrou a proximidade genética desta espécie com as espécies *R. robustus* e *R. prolixus* e permitiu incluir esta nova espécie no complexo *R. prolixus*.

Belintani (2016) realizou estudo multidisciplinar envolvendo análise genética a partir de marcadores mitocondriais (COI, Cyt b, 16S e 28S) no estudo da filogênese do subcomplexo Sordida e demonstrou a relação próxima das espécies *T. sordida* e *T. garciabesi* com a espécie *T. rubrovaria* assim como a divergência das espécies *T. guasayana* e *T. patagonica* das espécies deste subcomplexo.

Oliveira e colaboradores (2017) realizaram análise de quatro genes mitocondriais (12S, 16S, COI e Cyt b) e análises morfométricas no estudo de espécies do complexo e subcomplexo Brasiliensis com as espécies *T. melanocephala*, *T. lenti*, *T. tibiamaculata*, *T. viticiceps* e *P. megistus* questionando a relação entre essas espécies e a validade do gênero *Panstrongylus* de acordo com as características morfométricas e relações filogenéticas observadas.

Mais recentemente, Monteiro e colaboradores (2018) apresentam uma revisão bibliográfica envolvendo sistemática molecular, relacionam as espécies estudadas por análise filogenética de genes mitocondriais e, a partir de análises moleculares, considerando o conceito filogenético de espécies apresentam uma reorganização dos complexos de espécies considerando-se as linhagens, clados (região biogeográfica), grupo de espécies e complexos. Segundo este agrupamento as espécies do subcomplexo Matogrossensis estão incluídas na linhagem Sul Americana, clado *T. sordida* (eco regiões Cerrado, Caatinga, Pantanal, Chaco, Pampas), grupos de espécies *T. rubrovaria*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*, complexos: *T. rubrovaria* (*T. rubrovaria*, *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. oliveirai*, *T. pintodiasi*, *T. klugi*, *T. patagonica*, *T. limai*, *T. guasayana*); *T. pseudomaculata* (*T. pseudomaculata*, *T. arthurneiva*, *T. wygodzinskyi*, *T. deaneorum*, *T. williamsi*, *T. baratai*, *T. guazu*); e *T. sordida* (*T. sordida* 1, *T. sordida* 2, *T. sordida/garciabesi*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis* e *T. vandae*). Porém, nesta classificação não ficou estabelecido o complexo das espécies *T. jatai* e *T. costalimai* somente tendo sido agrupadas no grupo de espécies *T. pseudomaculata*.

2. 4 BIOQUÍMICA DA DIVERSIDADE INTRAESPECÍFICA DE *T. cruzi* E SEU PERFIL NO BIOMA CERRADO

Chagas (1909) ao descrever a doença que posteriormente recebeu seu nome, apresentou pela primeira vez o parasito *T. cruzi* com a descrição de diferenças morfológicas em formas sanguíneas. Desde então, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de demonstrar a diversidade populacional do parasito, correlacionando-a com as espécies hospedeiras provenientes de diferentes localidades.

Neste levantamento bibliográfico serão apresentadas as principais metodologias bioquímicas e moleculares que vem sendo utilizadas ao longo dos anos para caracterização da diversidade gênica do parasito, assim como trabalhos realizados com isolados obtidos de diferentes hospedeiros e espécies de triatomíneos em estados que apresentam o bioma Cerrado.

Os primeiros trabalhos descreviam as diferenças morfológicas e biológicas dos parasitos de acordo com as espécies hospedeiras e condições ambientais. Dentre as primeiras cepas estudadas estavam CL, FL e MR isoladas de espécimes de *T. infestans*, naturalmente infectados, provenientes de diferentes localidades do Rio Grande do Sul; assim como as cepas ABC e PNM, isoladas por xenodiagnóstico de uma paciente que acredita-se ser o primeiro caso de humano de Chagas descrito por Carlos Chagas (Salgado et al, 1962) e a cepa Y isolada em 1953 por Silva & Nussenzweig por xenodiagnóstico de um paciente com doença de Chagas aguda (Brener & Chiari, 1963; Brener, 1964; 1965).

Diferentes metodologias bioquímicas foram sendo desenvolvidas com o objetivo de caracterizar a diversidade populacional de *T. cruzi* que circulam entre humanos, triatomíneos, animais domésticos e reservatórios.

Toyé (1974) apresentou a metodologia bioquímica por meio da eletroforese de enzimas para caracterização genética indireta de cepas e clones de *T. cruzi* e verificou que esta metodologia permitia a diferenciação entre os isolados.

Desde então, a variação fenotípica do parasito foi sendo estudada com diferentes metodologias, quando Miles e colaboradores (1977, 1978), estudando isolados de *T. cruzi* provenientes dos estados brasileiros Bahia e Pará, também por eletroforese de isoenzimas, descreveram a presença de três zimodemas (grupos de isolados com mesmo perfil enzimático): Z1, Z2 e Z3, onde Z1 e Z3 haviam sido isolados em área silvestre enquanto Z2 havia sido isolado de caso agudo da doença de Chagas, estando associado ao ciclo de transmissão doméstico. Em 1980, a partir do emprego da taxonomia numérica no estudo dos zimodemas foi demonstrada a existência de três grupos distintos coincidentes com os zimodemas 1, 2 e 3 (Ready & Miles, 1980).

Barret e colaboradores (1980) em estudos de amostras procedentes do Estado da Bahia verificaram a presença de parasitos do zimodema 1 no ciclo silvestre associado ao homem, animais domésticos e peridomésticos.

Morel e colaboradores (1980), apresentaram uma outra metodologia para caracterização gênica de isolados de *T. cruzi* com base no polimorfismo de fragmentos de DNA do cinetoplasto (kDNA) com o uso de enzimas de restrição. Os isolados que apresentavam o mesmo perfil de fragmentos de DNA após tratados com enzimas de restrição eram agrupados em esquizodemas. As variações intraespecíficas nas sequências dos minicírculos de kDNA poderiam representar a impressão digital do parasito. A análise de isoenzimas e das sequências de kDNA constituíram a base da proposta da estrutura clonal do parasito *T. cruzi* (Miles et al, 1980).

Em 1981, Miles e colaboradores realizaram uma das primeiras abordagens a partir de amostras da região Central Brasileira que consistiam em isolados de *T. cruzi*, obtidos de pacientes com quadros clínicos de megaesôfago e megacólon cuja caracterização mostrava a presença e predominância de *T. cruzi* Z2, o que levou o autor a correlacionar esta sintomatologia ao zimodema Z2. Também com base no estudo de isoenzimas, Romaña (1982) analisando as amostras de *T. cruzi* isoladas de pacientes de Bambuí – MG, observou a presença de quatro zimodemas distintos (ZA, ZB, ZC e ZD), onde ZA correspondia ao já descrito Z2 e ZB apresentava um padrão heterozigoto produto de hibridização entre ZA e ZC.

Bogliolo e colaboradores (1986) estudaram amostras de *T. cruzi* da América do Sul pela análise de seis enzimas e amostras descreveram seis grandes zimodemas. Estes zimodemas seriam Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD. Também em 1986, Luquetti e colaboradores apresentaram mais um estudo de amostras de *T. cruzi* provenientes da região central do Brasil, estado de Goiás, provenientes de pacientes com quadros clínicos de doença de Chagas crônica, o qual observaram serem parasitos zimodema 2.

Contudo, a complexidade de caracterização dos isolados aumentava quanto mais marcadores enzimáticos fossem utilizados, assim como de acordo com a variedade de hospedeiros e origens das amostras do parasito.

Tibayrenc e colaboradores (1986) e Tibayrenc & Ayala (1988) por análise enzimática de amostras de *T. cruzi* isoladas de uma variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados demonstraram uma alta variabilidade genética e identificaram 43 zimodemas ou clones distintos. Com a caracterização de um mesmo perfil em amostras geograficamente distantes sugeriram *T. cruzi* ser uma população multiclinal. Naquele momento também, alguns estudos demonstravam uma estreita correlação entre zimodemas e esquizodemas, sugerindo que os genes estruturais nucleares que codificam enzimas e o DNA extranuclear (kDNA) poderiam ter tido uma evolução paralela (Carreno et al, 1987).

Sturm e colaboradores (1989) e Ávila e colaboradores (1990) fizeram uma adaptação do protocolo de estudo de kDNA, com a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) iniciando a utilização da técnica de polimorfismo de fragmento de comprimento (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) para estudo do *T. cruzi*.

Macedo e colaboradores (1992) apresentaram uma metodologia com base no estudo do DNA nuclear de *T. cruzi* por hibridização com uma sonda específica, produzindo padrões de bandas típicas de impressões de DNA (DNA fingerprinting) com as quais era possível identificar diferentes cepas do parasito, assim como verificar a heterogeneidade dentro de uma mesma cepa.

A análise da diversidade gênica de *T. cruzi* explorando diferentes regiões do DNA nuclear e extranuclear do parasito foi sendo ampliada com a utilização de diversas técnicas de amplificação de DNA envolvendo uma variedade de marcadores moleculares. Steindel e colaboradores (1993), por exemplo, utilizaram a técnica de amplificação de DNA tipo RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e observaram correlação entre os perfis de amplificação com os respectivos zimodemas das amostras estudadas, sendo a metodologia eficiente para a classificação dos grupos.

Souto & Zingales (1993) realizaram estudo da diversidade gênica a partir da amplificação de RNA ribossomal 24S alfa de isolados do parasito por RT-PCR e demonstraram que esta sequência alvo é específica para *T. cruzi* podendo ser utilizada na diferenciação de outras espécies como *Trypanosoma rangeli*. Como os resultados mostraram a obtenção de dois tipos de fragmentos 125pb ou 110pb para as amostras estudadas, confirmada por hibridização com sondas internas específicas e sequenciamento, permitiram a divisão das cepas de estudo em dois grupos.

Outra metodologia utilizada no estudo de DNA de cinetoplasto (kDNA) foi a LSSP-PCR (Low-Stringency Single Specific Primer), onde a utilização de um único primer específico permitiu caracterizar o polimorfismo intraespecífico na sequência de nucleotídeos de minicírculos de kDNA em uma assinatura específica e reprodutível para os isolados de *T. cruzi*, a partir de tecidos infectados. Esta metodologia poderia ser utilizada em estudos de epidemiologia molecular da doença de Chagas (Pena et al, 1994; Vago et al, 1996).

Souto e colaboradores (1996) analisaram uma ampla amostra de isolados de *T. cruzi* de hospedeiros vertebrados e invertebrados por amplificação por PCR de RNA ribossômico, de gene mini-exon e RAPD. Os dois produtos de amplificação já observados para RNA ribossômico de 110 ou 125pb foram novamente observados assim como dois perfis de amplificação de mini-exon com produtos de 300 ou 350 pb. A partir de então dois grupos foram definidos, assim como confirmados pelo perfil de RAPD: Grupo 1 (125pb rDNA e 300pb mini-exon) e grupo 2 (110pb rDNA e 350pb mini-exon), tendo-se então duas linhagens principais com alta divergência gênica.

Em 1998, Zingales e colaboradores, em estudo de 157 isolados de *T. cruzi* obtidos de humanos, triatomíneos e reservatórios silvestres de 12 estados brasileiros com a amplificação de genes RNA 24S alfa e mini-exon, classificaram os isolados em duas linhagens onde *T. cruzi* linhagem 1 estaria fortemente associado ao ciclo doméstico, enquanto que as linhagens 1 e 2 circulam igualmente no ciclo silvestre.

Em 1998, Tibayrenc discute o conceito de Discrete Typing Units (DTU), utilizado até os dias de hoje, que seriam unidades de pesquisa evolutivas que podem ser equiparadas a linhas filogenéticas distintas. As DTUs eram definidas como marcadores genéticos ('tags') que poderiam ser utilizados em nível de espécie e subespécies para acompanhamento epidemiológicos. A partir destas unidades seria possível realizar estudos genéticos

relacionando os patógenos aos respectivos hospedeiros. No mesmo ano, o sequenciamento direto de DNA começa a ser utilizado para o entendimento da diversidade genética de *T. cruzi* (De Leon et al, 1998).

Nos anos seguintes, diferentes metodologias foram sendo utilizadas para caracterização genética de isolados do parasito e definição de grupos genéticos como a eletroforese de isoenzimas (Barnabé et al, 2000); a combinação de RAPD e eletroforese de isoenzimas (MLEE), com a caracterização de seis DTU's, DTU I e DTUII, este dividido em cinco subgrupos (Brisse et al, 2000); e por amplificação de RNA ribossomal e mini-exon, confirmando a divisão em seis grupos (Brisse et al, 2001).

Em 2002, Mendonça e colaboradores analisaram a diversidade genética entre isolados Z3 da Amazonia Brasileira por análise do polimorfismo de fragmentos de restrição de espaçadores intergênicos (ITSs) de RNA ribossômico e do tamanho do domínio divergente D7 do gene 24Salfa a partir de amostras de *T. cruzi* isoladas de humanos e triatomíneos e definiram dois grupos Z3A e Z3B.

Inúmeras metodologias foram sendo utilizadas, envolvendo diversos marcadores e regiões genômicas do parasito para o estudo da diversidade gênica como o sequenciamento (Telleria et al, 2006; Brandão, 2006; Freitas et al, 2006) e análise de polimorfismo de DNA (Higo et al, 2007; Rozas et al, 2007). A pesquisa de novos marcadores que discriminem os grupos de *T. cruzi*, a partir da técnica de RDA, identificou um clone específico correspondente ao TCI e foi capaz de distinguir cepas do parasito isoladas duas áreas endêmicas (Toma et al, 2007).

Lewis e colaboradores (2009), ao compararem cinco metodologias para pesquisa dos seis tipos de DTU descritos, recomendaram a utilização de pelo menos três marcadores com base em polimorfismos de nucleotídeo nos locos HSP60, de RNA ribossomal e a enzima GPI para a caracterização confiável e rápida de DTU.

Em 2009, Zingales e colaboradores apresentaram uma nomenclatura unificada de DTU's (I a VI) correlacionando os novos grupos com as classificações realizadas até então. A combinação de diferentes metodologias e marcadores tem sido utilizadas nos últimos anos, incluindo a utilização de sequenciamento de DNA ou comparando-se os isolados pela utilização de múltiplos marcadores (Yeo et al, 2011; Pavia et al, 2012; Ramirez et al, 2012; Diosque et al, 2014).

Em 2014, Cominetti e colaboradores realizaram pesquisa por *T. cruzi* e caracterização de isolados obtidos de triatomíneos das espécies *T. sordida*, *T. matogrossensis*, *P. megistus* e *Rhodnius* sp. em diferentes municípios do Mato Grosso do Sul encontrando-se isolados TCI e TCII em ambientes silvestres relacionados ao bioma Cerrado.

A utilização de metodologias, muitas vezes padronizadas a partir da utilização de cepas padrão, poderia não ser aplicável a isolados silvestres. Cura e colaboradores (2015) desenvolveram um método de PCR multiplex em tempo real para detecção dos seis DTU's com a utilização de sondas TaqMan, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e acurácia para classificação dos isolados de *T. cruzi*.

Estudo recente com a revisão de dados a cerca da classificação de *T. cruzi*, demonstra as características de cada DTU e afirma que TCI é predominante (cerca de 60%), nos ciclos silvestre e doméstico, sendo conhecido por apresentar alta diversidade genética e amplamente distribuído geograficamente, compatível com uma evolução a longo prazo. O entendimento da complexidade dos ciclos e participação de numerosos vetores e hospedeiros em uma área, portanto, deve ser realizado a partir de contextualizações integrando as informações bioquímicas e genéticas dos parasitos com suas interações ecológicas, o que parece manter a diversidade dentro dos grupos de *T. cruzi* (Breniere et al, 2016).

Em 2014 um total de 78 isolados de *T. cruzi* I isolados de diferentes hospedeiros e vetores distribuídos em cinco biomas diferentes no Brasil, incluindo o bioma Cerrado, foram analisados pela combinação de análise filogenética de seis genes nucleares, 25 loci microssatélites e um marcador mitocondrial. Pela análise dos marcadores nucleares foi revelada a diversidade genética e o fluxo gênico entre os biomas, incongruência em filogenias e troca genética (Lima et al, 2014).

Barnabé e colaboradores (2016) a partir de análise filogenética de dois genes mitocondriais (CytB e COII) e um nuclear, verificaram que apenas três grupos significativos foram verificados a partir da análise de genes mitocondriais, em vez de sete (que é o caso dos DTUs). Já para a análise de gene nuclear, todos os sete clados esperados não tiveram valores significativos de suporte, onde os DTUs TcV e TcVI eram indistinguíveis assim como TcIII e Tc IV. A partir desses resultados os autores questionaram a estruturação de *T. cruzi* em seis ou sete DTUs. Segundo eles, a tipificação mitocondrial em três grupos atualmente denominados mtTcI, mtTcII e mtTcIII é robusta enquanto que a tipagem nuclear pode levar a um agrupamento questionável, apesar de importante para a detecção de introgressão mitocondrial, estados heterozigotos e composição alélica.

Recentemente, Ramirez e colaboradores (2017) por análise filogenética, obtiveram padrões de *T. cruzi* associados a linhagens específicas e identificaram novos primers que melhoraram a sensibilidade de uma PCR quantitativa baseada em sequencias de DNA satélite. A utilização do sequenciamento de diferentes genes está entre as metodologias sugeridas atualmente no estudo da diversidade gênica do *T. cruzi*.

3 – METODOLOGIA

3.1 - ESPÉCIMES DE ESTUDO

3.1.1 – OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE ESTUDO

Os insetos foram capturados em expedições de campo (licença IBAMA SISBIO 43393-1 de 27/05/2014), de sete dias, nos meses de Maio e Outubro de 2015, nos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins – TO (Figura 6).

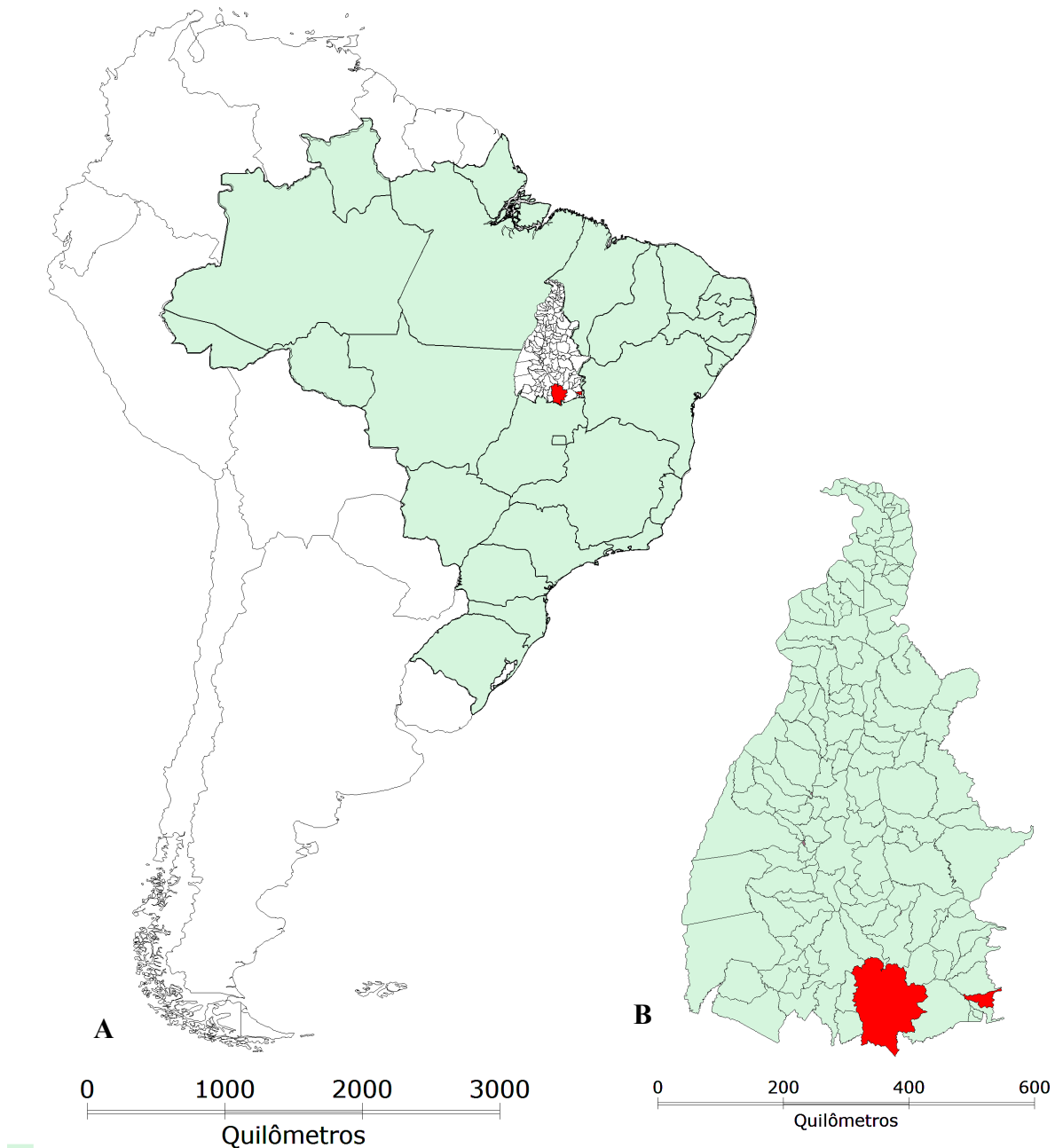


Figura 6: A - Localização do Estado do Tocantins; B – Municípios trabalhados: a – Paranã, b – Aurora do Tocantins. Fonte: Teves-Neves, 2012.

No município de Paranã foram estabelecidos dois pontos de captura em ambiente silvestre denominados 307 e 348, distantes entre si cerca de 5,91 km e 4,8 km do ponto Jatai (localidade tipo de *T. jatai*) (Figura 7). No município de Aurora do Tocantins, as capturas foram realizadas em dois pontos: Aur02, ambiente silvestre localizado em zona rural, e Aur04 localizado dentro do perímetro urbano da cidade (Figuras 8 e 9), distantes aproximadamente 6,26Km.

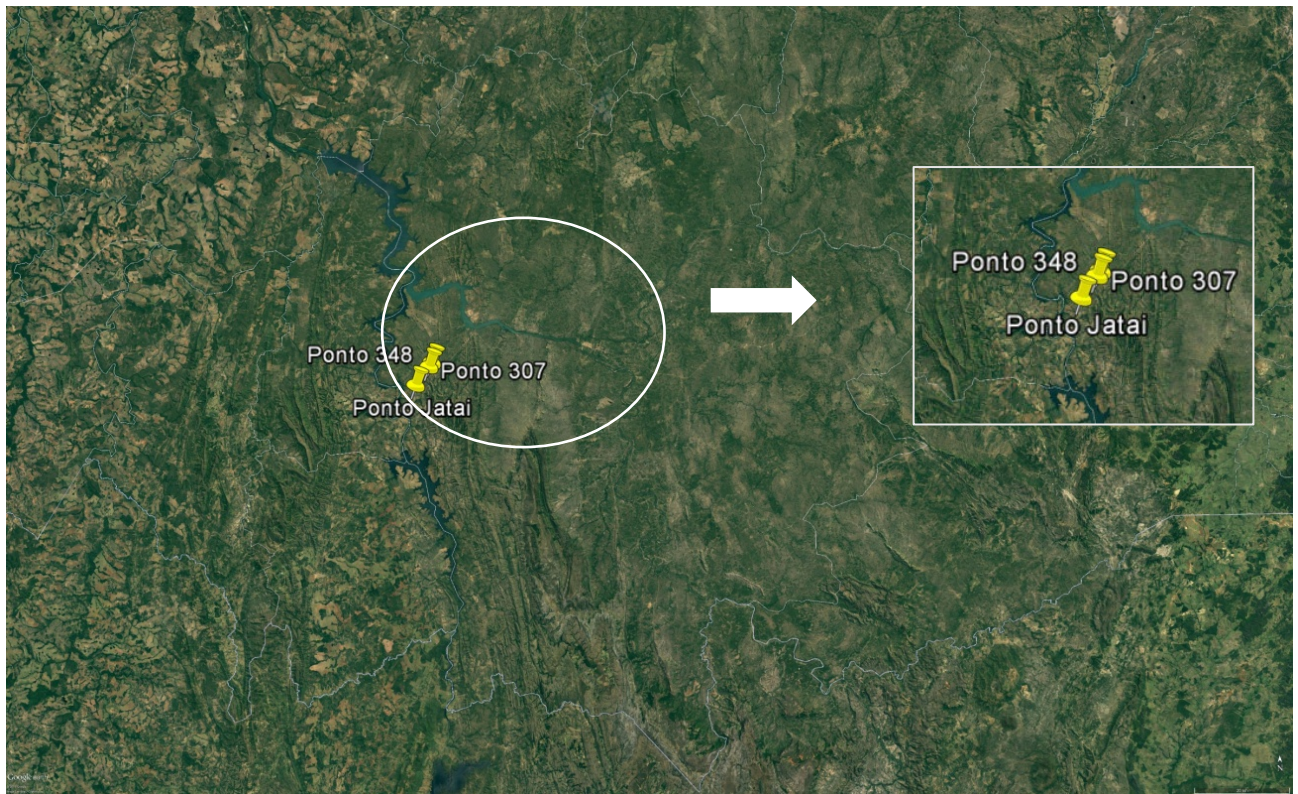


Figura 7: Localização dos pontos de captura no município de Paranã (TO) em relação à localidade-tipo de *T. jatai*.



Figura 8: Localização dos pontos de captura Aurora 02 (Aur02) e Aurora 04 (Aur04) no município de Aurora do Tocantins (TO).



Figura 9: Localização do ponto Aurora 04 (Aur04) localizado na sede do município de Aurora do Tocantins (TO).

As capturas foram realizadas por busca passiva com a utilização de armadilhas tipo Noireau (Noireau et al, 1999) dispostos em ambiente silvestre e de peridomicílio, no período noturno, por 14 horas. Os insetos capturados foram acondicionados em tubos Falcon, contendo papel filtro dobrado “em sanfona” e fechados com tampas com pequenos orifícios. Os tubos foram identificados pelo número do ponto de captura georeferenciado com a utilização de um GPS modelo Etrex Garmin.

No laboratório estes insetos foram mantidos em condições estáveis de temperatura (25-28°C) e umidade (78-82%) com alimentação semanal em camundongos suíços segundo protocolo CEUA-IOC 002/2014.

A identificação taxonômica dos adultos foi realizada segundo os critérios morfológicos descritos por Lent e Wygodzinsky (1979) e com a utilização de chave dicotômica para espécies do Subcomplexo Matogrossensis adaptada por Gonçalves e colaboradores (2013). Os ovos foram quantificados e acondicionados em potes contendo papel filtro cortados em sanfona para formação de colônia.

3.1.2 - AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR *T. CRUZI* E ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA

A avaliação de infecção por *T. cruzi* e o isolamento em meio de cultura foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

A pesquisa foi realizada por microscopia óptica, visualizando-se entre lâmina e lamínula uma alíquota do conteúdo fecal de cada espécime após compressão abdominal. Para os espécimes com pouco conteúdo estomacal, foi realizada alimentação em camundongos para estimular a defecação e em seguida os insetos foram mantidos no interior da cabine de segurança biológica em microtubos de 2ml estéreis unidos a um segundo microtubo adaptados para coleta das fezes (Figura 10). Em seguida, uma alíquota do material coletado foi homogeneizada em 200µL de PBS 0,01M pH 7,4 e examinada entre lâmina e lamínula ao microscópio. Das amostras positivas para formas epimastigostas e tripomastigotas metacíclicas dos parasitos, foi realizado cultivo em meio acelular e o conteúdo restante foi utilizado para o preparo de duas lâminas, por esfregaço, para registro dos resultados (Figura 11).

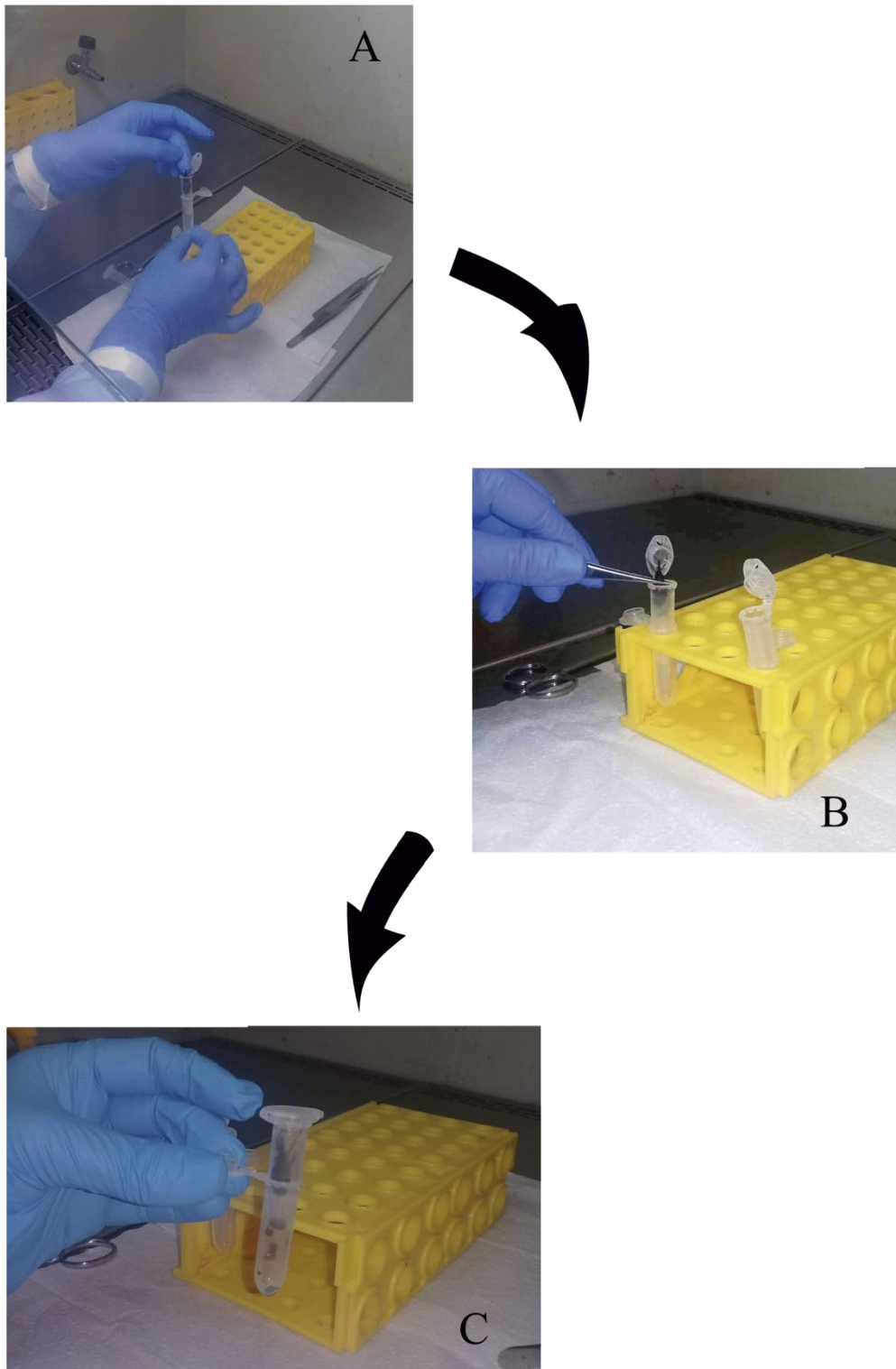


Figura 10: Coleta das fezes dos triatomíneos para pesquisa por *T. cruzi*. A - Colocação do triatomíneo alimentado em microtubo de 1,5ml cortado ao fundo acoplado a um segundo microtubo de 2,0 ml para a coleta das fezes; B - Com o auxílio de uma pinça, realização de uma massagem abdominal para estímulo da defecação; C - Coleta das fezes para o exame parasitológico. Fonte: Catarina Macedo.

Os resultados dos exames das fezes dos triatomíneos foram enviados para Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins e incluído no banco de dados da gerência de Chagas do Estado do Tocantins.

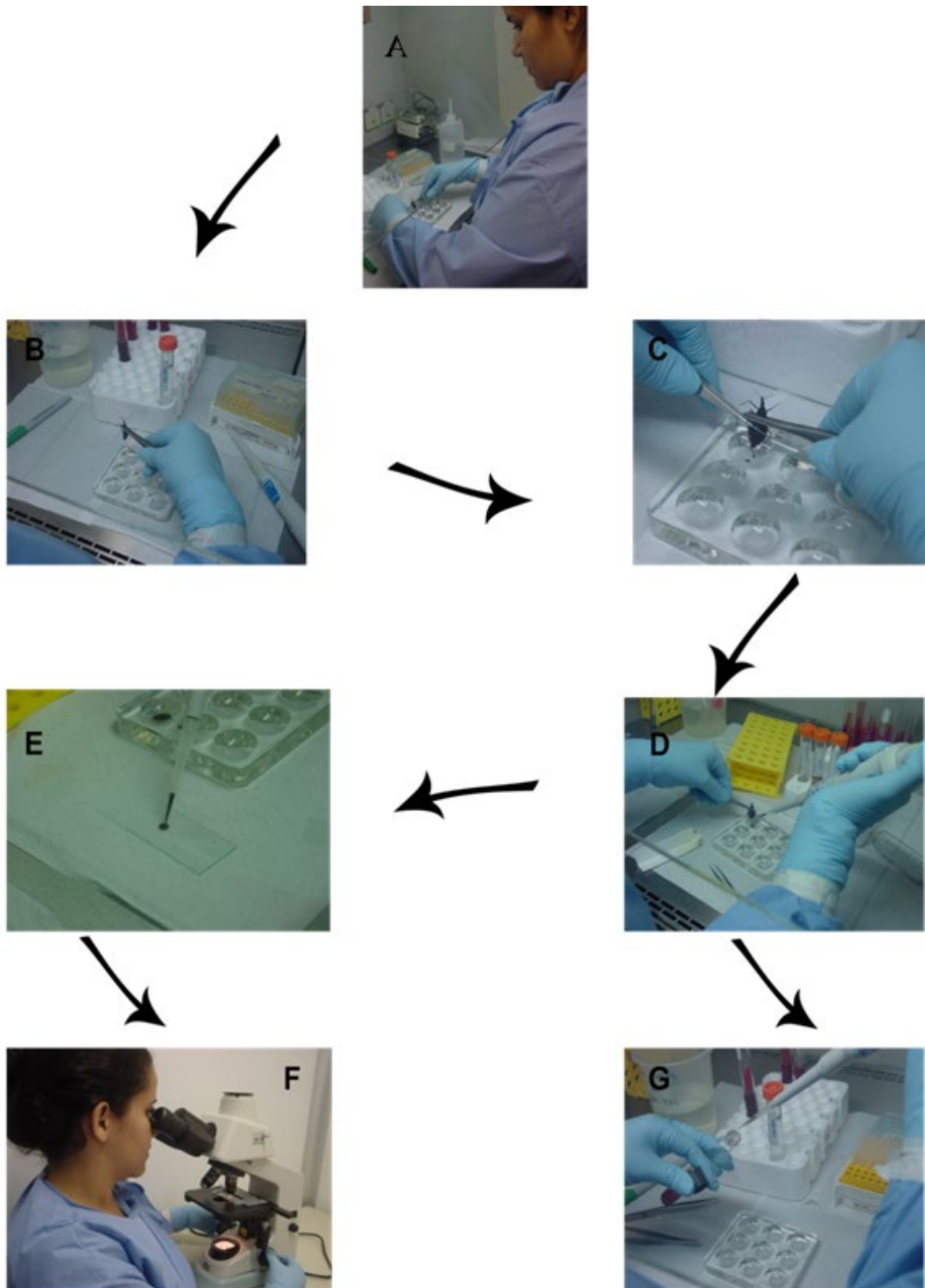
A coloração de lâminas seguiu o protocolo descrito no Anexo A.

O cultivo foi realizado em meio NNN (Novy & MacNeal, 1904; Nicolle, 1908) contendo 4mL de meio LIT (Camargo, 1964), 20% de soro fetal bovino, três gotas de penicilina e três gotas de fluorocitosina e mantidas em ambiente de estufa BOD a 28°C. Esse procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica descontaminada com álcool a 70% e por luz UV por 30 minutos. A primeira observação e passagem de 0,5mL para novo meio foi realizada 15 dias após o inóculo.

Amostras sem contaminação por bactérias e fungos foram selecionadas para criopreservação e para as técnicas de caracterização molecular.

A criopreservação foi realizada em nitrogênio líquido. Utilizou-se como crioprotetor 0,1mL de glicerol estéril para cada 1mL de cultura. O conteúdo foi distribuído em microtubos NUNC (0,5mL por tubo) devidamente identificados a lápis com o código de registro de cada inseto e data da criopreservação. Os tubos foram mantidos por 30 minutos em recipiente com gelo sobre a bancada, em seguida foram postos no freezer por 1 hora, depois colocados em gelo seco dentro do freezer por 45 minutos e, por fim, acondicionados no botijão de nitrogênio.

Para a caracterização molecular das amostras de *T. cruzi*, inicialmente, realizou-se o cultivo de cada isolado em 20 ml de meio LIT (volume cinco vezes maior que o da cultura de isolamento e passagem) para obtenção de massa de parasitos. Após 20 dias, a cultura foi centrifugada a 2500rpm por 4 minutos e lavada duas vezes em tampão fosfato PBS 0,01M pH 7,4 da seguinte forma: centrifugação do conteúdo a 2500rpm por 4 minutos, retirada do sobrenadante, adição de 20mL de PBS, nova centrifugação e retirada do sobrenadante. O material sedimentado contendo os parasitos foi armazenado em freezer a -20°C para posterior extração do material genético.



Fonte: Catarina Macedo.

Figura 11: Procedimento para detecção e isolamento de *T. cruzi*. Legenda: A e B – Preparação para iniciar a compressão abdominal do triatomíneo; C- Compressão abdominal; D- Diluição das fezes em solução tamponada; E- Montagem do material entre lâmina e lamínula; F- Observação da lâmina ao microscópio óptico; G- Semeadura do material fecal em meio de cultura.

3.1.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *T. cruzi*

A caracterização molecular dos isolados de *T. cruzi* foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Inicialmente foi realizada a extração do DNA. Em seguida realizou-se a quantificação do DNA extraído e uma PCR para amplificação dos genes mini-exon e 24S-alfa segundo os protocolos de Fernandes et al. (1998) e Souto et al. (1996), respectivamente. A amplificação destes genes permite caracterizar os isolados obtidos como da espécie *T. cruzi*.

Para a caracterização do subgrupo (DTU) das amostras de *T. cruzi* realizou-se uma PCR RFLP de acordo com o protocolo de Maes e der Auwera (2000).

Tendo em vista que poucas amostras geraram resultados conclusivos para caracterização de DTU por este protocolo, utilizou-se o protocolo de Martins e colaboradores (2015).

3.1.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS GENES MINI-EXON E 24S-ALFA

A extração do DNA foi realizada utilizando-se a técnica de fenol clorofórmio (Sambrook et al, 1989) que consiste na seguinte metodologia: cada amostra foi digerida em 0,5ml de solução contendo tris/EDTA (TE) 100mM, 5 µl de proteinase K 10mg/ml e 50 µl de solução Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10%. Este conteúdo foi misturado e incubado em banho maria a 56°C por cerca de 16 horas. Em seguida foi adicionado igual volume de fenol, homogeneizado por inversão, e centrifugado por 3 minutos, a 14.000 rpm. Essa centrifugação gerou um sobrenadante que foi transferido para um tubo limpo, no qual foi acrescentado igual volume de clorofórmio, homogeneizado novamente por inversão e centrifugado a 14.000rpm, por 3 minutos. A fase aquosa foi retirada para tubo limpo onde foi acrescentado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2x volume de etanol. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o DNA completamente seco e ressuscitado em 30 µl de TE. Por fim as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C.

A quantificação do DNA foi realizada em equipamento de espectrofotômetro Denovix (Life Science) no comprimento de onda de 260nm para determinar o volume de amostra a ser utilizado na reação de amplificação.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos genes mini-exon e 24S-alfa seguiu os protocolos de Fernandes e colaboradores (1998) e Souto e colaboradores (1996), respectivamente. Para o gene de mini-exon foi realizada uma PCR multiplex utilizando tampão 1X, 0,2mM de cada dinucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂, 10pmol de cada primer (Quadro 2), 1U de Ampli Taq Gold (Invitrogen) e 5µl de DNA. As condições do ciclo foram: 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de: 94°C, 30 segundos; 55°C, 30 segundos e 72°C, 30 segundos; seguido de uma extensão a 72°C por 10 minutos. Como controles foram utilizadas as seguintes amostras: Dm28 (TCI), Y (TCII), 4167 (Z3) e Macias (*T. rangeli*). Para o gene 24S-alfa foi realizada a PCR contendo tampão 1X, 0,2mM de cada dinucleotídeo trifosfato, 3mM de MgCl₂, 10 pmol de cada primer (Quadro 3), 1U de Taq

(Promega) e 5µL de DNA. As condições da PCR foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: 94°C, 1 minuto; 60°C, 1 minuto e 72°C, 1 minuto, seguido de um ciclo de 72°C, 5 minutos.

Quadro 2: Sequências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos obtidos no gene mini-exon.

Iniciadores	Sequência dos iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
Mini exon	3'CCCCCTCCCAGGCCACACTG5'	200
TC1	3'GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC5'	200
TC2	3'CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG5'	250
Z3	3'CCGCGWACAACCCTMATAAAAATG5'	150
<i>T. rangeli</i>	3'CCTATTGTGATCCCCATCCCCATCTTCG5'	100

Fonte: Fernandes et al. (1998).

Quadro 3: Sequências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos obtidos no 24s alfa.

Alvo		Sequência dos iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
24S	D71	3'AAGGTGCGTCGACAGTGTGG5'	TCI 110
	D72	3'TTTTCAGAATGGCCGAACAGT5'	TCII 125

Fonte: Souto et al (1996).

3.1.3.2 DETERMINAÇÃO DO DTU POR PCR - RFLP

Para a determinação do perfil de DTU (Discrete Typing Unit) foi realizada a PCR-RFLP de acordo com o protocolo de Maes e der Auwera (2000). A PCR para os genes GP72, Histona H3, Hsp60 e 1f8 foi feita com tampão 1X, 0,2mM de cada dinucleotídeo trifosfato, 3,0mM MgCl₂, 10pmol de cada par de oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 4), 1U de Taq (Promega) e 2µl de DNA. As condições do ciclo foram: 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de: 94°C, 30 segundos; 65°C, 45 segundos e 72°C, 90 segundos; seguido de uma extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob a luz ultravioleta. Em seguida, foram digeridos com enzimas de restrição (Quadro 5) e incubados overnight. Dez microlitros do produto digerido foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2,5% (GP72, H3 e Hsp60) e 4% (1f8) e corados com brometo de etídeo. O perfil de restrição obtido para cada isolado foi interpretado segundo recomendações apresentadas no quadro 6.

Quadro 4: Sequências dos iniciadores e tamanho dos fragmentos obtidos na PCR.

Iniciadores		Sequência dos iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)
1f8	1f8sen	3'CTGGAGTTCCGTCTGATGCTG5'	950
	1f8anti	3'CAACAAAGTCCTCGGAGCCCT5'	
GP72	gp72sen	3'GCGGACAGTGCCAACAACCT5'	1230
	gp72anti	3'CGCCGAACTTCCAACCATCAG5'	
HSP60	hsp60sen	3'CGAGCAGCAGAGCGAAACAT5'	450
	hsp60anti	3'GTGGTATGGGTGACATGTAC5'	
Histone H3	H3 sen	3'TCCGTGGCGAGCGCGCGTAG5'	650
	H3anti	3'GTCTCTTTTCGACCTCGACAT5'	

Fonte: Maes e Auwera (2000).

Quadro 5: Digestão do produto da PCR com enzimas de restrição.

Componentes	GP72	1f8	Histone H3	HSP60
Produto da PCR	10µl	10µl	10µl	10µl
Tampão da enzima	2µl buffer Taq	2µl buffer O	2µl buffer B1	2µl buffer H
Enzima	1µl Taq	1µl Alw211	1µl AluI	1µl EcoRV
H ₂ O qsp	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Temperatura de incubação	65°C	37°C	37°C	37°C

Fonte: Maes e Auwera (2000).

Quadro 6: Perfil de restrição para os DTU's de *Trypanosoma cruzi*.

Alvos	Tc I	Tc II	Tc III	Tc IV	Tc V	Tc VI
gp 72	Não 1230 ¹ 780 Não 500 450 ¹ Não 280	Não 1230 ¹ Não 780 500 450 ¹ 280	Não 1230 ¹ 780 Não 500 450 ¹ Não 280	Não 1230 ¹ 780 Não 500 ² 510 - 450 ^{1,2} Não 280	Não 1230 ¹ 780 500 450 ¹ 280	Não 1230 ¹ 780 Não 500 450 ¹ Não 280
1f8	Não 950 ¹ 380 ¹ 210 ¹ 180 100 150: 0 ⁴	Não 950 ¹ 380 ¹ 210 ¹ Não 180 100 150: 2 ⁴	Não 950 ¹ 380 ¹ 210 ¹ 180 100 150: 1 ⁴	Não 950 ¹ 380 ¹ 210 ¹ 180 100 150: 1 ⁴	Não 950 ¹ 380 ¹ 210 ¹ 180 100 150: 2 ^{4,5}	Não 950 ¹ 380 ¹ 210 ¹ (180) ³ 100 150: 2 ^{4,5}
Histone H3	Não 650 440 210	Não 650 440 210	650 Não 440 Não 210	Não 650 440 210	650 440 210	650 440 210
Hsp60	450 Não 300 Não 150	450 Não 300 Não 150	Não 450 300 150	450 Não 300 Não 150	450 300 150	450 300 ⁶ 150 ⁶

¹ Estes fragmentos podem ser utilizados como um controle interno para digestão.

² Uma banda é normalmente vista em 450pb, mas em alguns isolados esta banda muda para um peso molecular mais alto. Se sim, 1 banda é vista por volta de 500, mas nenhuma a 450pb.

³ Ocasionalmente este fragmento é ausente.

⁴ Número de fragmentos na faixa de tamanho indicada.

⁵ O menor fragmento de cerca de 115pb é geralmente difícil de ver nos grupos TCV e TCVI.

⁶ Estes fragmentos são geralmente muito mais fracos do que seria esperado com base na fragilidade do fragmento de 450pb, o que dificulta a interpretação de produtos amplificados de PCR digeridos.

3.1.3.3 DETERMINAÇÃO DO DTU POR AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE 2 DE CITOCROMO OXIDASE II, GENES 24S ALFA E ESPAÇADOR INTERGÊNICO (SL IR)

A genotipagem foi realizada por amplificação e análise de três regiões gênicas: Subunidade 2 da enzima mitocondrial citocromo oxidase (COII) seguida de digestão pela enzima *Alu* I (Promega), Domínio divergente D7 do gene rRNA 24S alfa e região intergênica (SL-IR) (Martins et al, 2015). Os produtos das PCRs e da digestão foram analisados em gel de acrilamida a 6% corado por brometo de etídio.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região gênica que compreende a subunidade II da enzima mitocondrial citocromo oxidase de *T. cruzi* foi realizada utilizando 2,5 µL tampão 10X(Thermo Science), 2,5 µL de cada dinucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂ (Thermo Scientific), 10pmol de cada primer (Quadro 7), 0,2 µl Taq (Thermo Scientific), 3µl de DNA e quantidade de H₂O Milli-Q estéril suficiente para 25µL. As condições do ciclo foram uma desnaturação inicial (95°C, 5min), um outro passo de desnaturação (94°C, 45s), anelamento (48° C, 45s) e extensão (72° C, 1min), totalizando 40 ciclos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5%. Utilizou-se 10µL do produto amplificado da PCR para a digestão com a enzima de restrição *Alu* I conforme (Quadro 8).

Para a visualização dos produtos digeridos, uma alíquota de 10µL dos produtos da digestão foi analisada em gel de acrilamida a 6% corado por Brometo de Etídio, permitindo distinguir *T. cruzi* I, II, III ou híbridos. Como controles utilizou-se *T. cruzi* I (clone Col.17G2, fragmentos de 30, 81 e 264pb; haplótipo A); *T. cruzi* II (cepa JG, fragmentos de 81 e 212pb; haplótipo C) e CL brener para *T. cruzi* III e cepas híbridas. Entretanto, este marcador não diferencia as cepas *T. cruzi* III das cepas híbridas, pois apresentam o mesmo perfil de restrição para o gene COII (fragmentos de 81 e 294pb, haplótipo B) (Figura 12).

Para amplificação do gene 24Sα foi realizada uma PCR multiplex utilizando 2,5 µL tampão 10X (Thermo Scientific), 2,5 µL cada dinucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂ (Thermo Scientific), 10pmol de cada primer (Quadro 9), 0,2 µl Taq (Thermo Scientific) e 3µl de DNA e quantidade de H₂O Milli-Q estéril suficiente para 25µL. As condições do ciclo da PCR foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: 94°C, 1 minuto; 60°C, 1 minuto e 72°C, 1 minuto, seguido de um ciclo de 72°C, 5 minutos. Os mesmos controles utilizados para COII foram utilizados para o gene 24Sα. Para a visualização dos produtos amplificados uma alíquota de 5µL dos produtos da PCR foi analisada em gel de Acrilamida a 6% corado por Brometo de Etídio.

Para a amplificação da região intergênica dos genes de mini-exon, o DNA das amostras de *T. cruzi* foi submetido a uma PCR contendo 20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl; 3Mm MgCl₂; 250mM de cada dNTP; 3µM de cada iniciador (Quadro 10); 1U Taq DNA polimerase Platinum (*Invitrogen, USA*); 1µL de DNA total (~3ηg/µL) e quantidade de H₂O milli-Q estéril suficiente para 15µL. Os iniciadores utilizados reconhecem as posições entre 368-386 e 546-570 da unidade repetitiva do mini-exon do *T. cruzi* (BURGOS *et al.*, 2007).

Os ciclos de amplificação da PCR consistiram de uma etapa inicial de desnaturação (94°C, 3min), anelamento (68°C, 1 min), extensão dos iniciadores (72°C, 1 min) e desnaturação (94°C, 1 min). A cada três ciclos, a temperatura de anelamento foi diminuída

para 66, 64, 62 e 60°C. Na última temperatura, o número de ciclos foi aumentado para 35, seguido de uma extensão final (72°C, 10 min). A análise dos produtos amplificados, em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata, permite distinguir a linhagem de *T. cruzi* III (amplifica um fragmento de 200pb) das cepas pertencentes às linhagens *T. cruzi* I, II e híbridos (que amplifica um fragmento de 150-157pb) (BURGOS *et al.*, 2007).

Quadro 7: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene COII.

Primers	Sequência dos iniciadores
Tcmit10	5'-CCATATATTGTTGCATTATT-3'
Tcmit 21	5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3'

Fonte: Martins et al, 2015.

Quadro 8: Digestão do produto da PCR com enzima de restrição

Componentes	<i>Alu1</i>
Produto da PCR	10µl
Tampão da enzima	2µl buffer
Enzima	0,5µl
H ₂ O	7,5 µl

Fonte: Martins et al, 2015.

Quadro 9: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 24 S alfa.

Primers	Sequência dos iniciadores
D 71	3'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-5'
D 72	3'-TTTTTCAGAATGGCCGAACAGT-5'

Fonte: Martins et al, 2015.

Quadro 10: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação da região intergênica (SL – IR)

Primers	Sequência dos iniciadores
TCIII	5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3'
UTCC	5'-CGTAC- CAATATAGTACAGAACTG-3'

Fonte: Burgos et al, 2007.

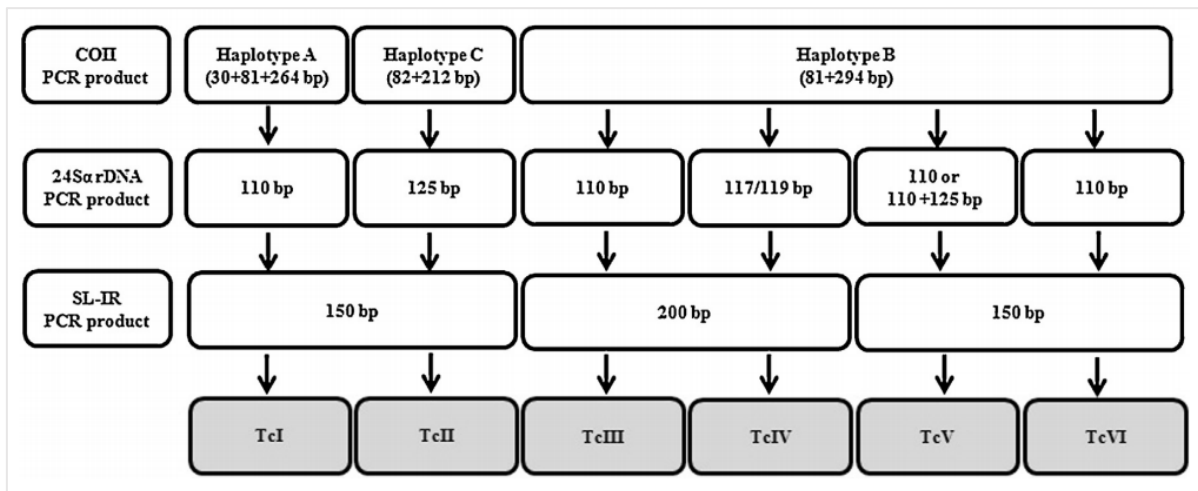


Figura 12: Protocolo para genotipagem usando de três passos: análise de polimorfismo do gene da subunidade 2 (COII) da enzima mitocondrial citocromo oxidase, amplificação do domínio divergente D7 do gene rRNA 24Sa e amplificação da região Intergênica líder emendada (SL-IRac). Fonte: Martins et al, 2015.

3.2 – ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS ESTRUTURAS ASSOCIADAS À LOCOMOÇÃO DE ADULTOS

O estudo morfológico foi realizado com espécimes silvestres, 15 machos e 15 fêmeas, das espécies *T. jatai*, *T. costalimai* e *T. sherlocki*, respectivamente. As medições do comprimento do corpo e das pernas, do comprimento e largura do lobo anterior e posterior do pronoto e da asa, foram realizadas em microscópio estereoscópio modelo STEMI – SV11 com ocular milimetrada (Figura 13). Foi aplicado teste *t* para avaliação de dimorfismo sexual de *T. jatai* e *T. costalimai*. A diferença entre os grupos de fêmeas e machos formados para cada espécie foi testada por análise de variância (ANOVA), utilizando como teste *a posteriori* o teste de Tuckey. Homogeneidade de variâncias foi analisada com o teste de Brown–Forsythe.

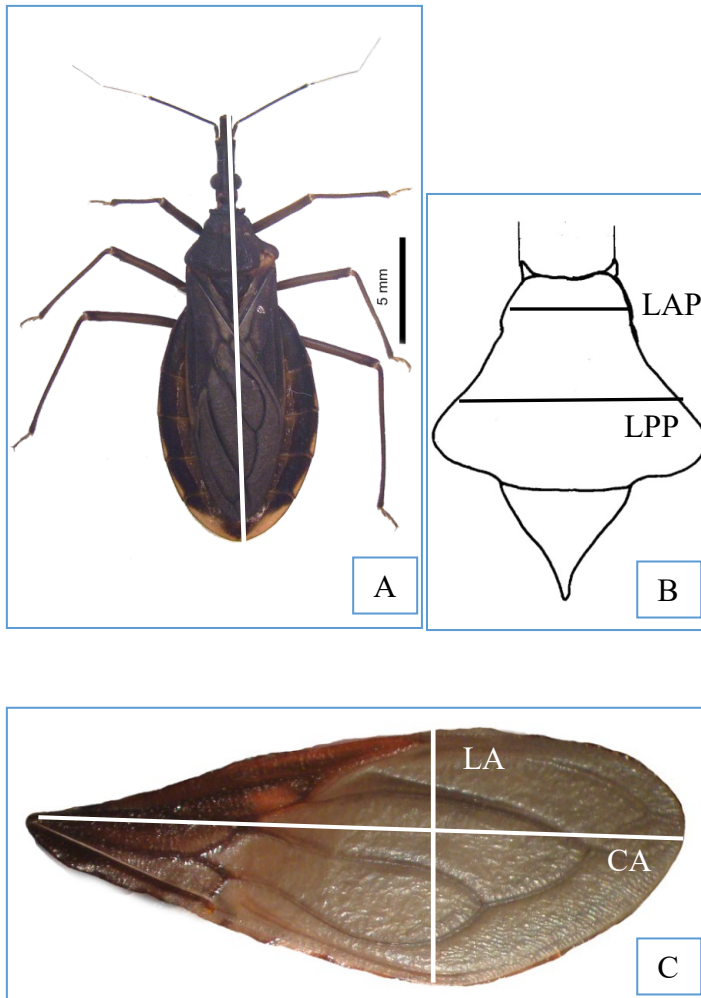


Figura 13: Desenho esquemático dos caracteres corporais mensurados para estudo das estruturas morfológicas associadas ao vôo. A: Triatomíneo: Linha branca representa comprimento total do corpo; B: Pronoto e escutelo: LAP - Lobo anterior do pronoto; LPP – Lobo posterior do pronoto, linhas pretas representam as medidas de largura; C: Asa anterior: Linha branca CA representa a medida de comprimento da asa e LA largura da asa. Foto: Catarina Macedo.

3.3 – CICLO DE DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO DE *T. jatai* E *T. costalimai*

O estudo do tempo de desenvolvimento dos estádios ninfais de *T. jatai* foi realizado em comparação com *T. costalimai*, utilizando-se ovos provenientes de casais de origem silvestre.

Diariamente, os ovos e as ninfas separadas foram observados para os registros do tempo de eclosão dos ovos e período de intermuda dos estádios de N1 a adulto, respectivamente.

A alimentação foi realizada semanalmente em camundongos segundo protocolo CEUA-IOC 002/2014.

Foram avaliados a quantidade de dias para eclosão dos ovos, período intermuda e quantidade de repastos de cada ninfa nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Foram registradas a temperatura e umidade em todos os dias de observação (valores atuais, máximo e mínimo).

Os resultados foram registrados em planilha para cada espécie utilizando o programa excel. Calculou-se os valores medianos e quartil 25-75%. Utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparar as diferenças entre as espécies.

3.4 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *T. JATAI* COM OUTRAS ESPÉCIES DA AMÉRICA DO SUL

Para esta análise utilizou-se espécimes silvestres de *T. jatai*, *T. costalimai* e *T. sordida*, assim como de espécimes de colônia de *T. williami* cedidos pelo Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz (LNIRTT – IOC). Foram utilizadas também sequências obtidas do GeneBank de outras espécies do subcomplexo *T. matogrossensis* e de espécies da América do Sul representando outros subcomplexos. Como grupo externo optou-se pela espécie *P. megistus* (Tabelas 4 e 5).

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook & Russel (2001). A partir do DNA extraído, os fragmentos 16S e COI foram amplificados como descrito por Sains et al (2004) e purificados utilizando-se o kit de purificação de banda Illustra GFX PCR DNA e Gel (GE Life Sciences). Os produtos purificados foram sujeitos a reação de sequenciamento usando o BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e analisados no sequenciador de DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems Additional).

As sequências obtidas foram editadas com BioEdit (versão 7.0.5), alinhadas com Clustal W versão 44 e os dados nucleotídeos para COI transformados em sequências de aminoácidos para verificar a presença de pseudogenes. Foram feitas análises filogenéticas combinadas, usando ambos os genes com uma abordagem bayesiana utilizando o programa MrBayes (versão 3.1.45), e duas corridas independentes de 1 milhão de gerações usando quatro cadeias de Markov, amostrando árvores a cada 100 gerações (descartando-se a primeira 25%). A escolha dos melhores modelos evolutivos foi baseada no critério de informação Akaike JModelTest (versão 0.1.1) software, como segue: para 16S rDNA foi utilizado HKY + I + G (nst = 2, taxas = invgamma); para COI foram utilizados GTR + I + G (nst = 6, taxas = invgamma), produzindo uma matriz com 22 táxons e 984 nucleótidos. O suporte do clado foi estimado por probabilidades posteriores Bayesianas (BPP).

Tabela 4: Subcomplexo, espécies e origem dos espécimes de triatomíneos utilizados neste trabalho.

Subcomplex*	Species	Origin
<i>T. matogrossensis</i>	<i>T. jatai_03</i>	Paraná – TO
	<i>T. jatai_05</i>	Paraná – TO
	<i>T. jatai_16</i>	Paraná – TO
	<i>T. costalimai_06</i>	Aurora do Tocantins – TO
	<i>T. costalimai_09</i>	Aurora do Tocantins – TO
	<i>T. williami_04</i>	Barra das Garças – MT
	<i>T. williami_05</i>	Barra das Garças – MT
<i>T. sordida</i>	<i>T. sordida_PAR03</i>	Paranaíba – MS
	<i>T. sordida_ITA24</i>	Itaobim – MG

* (Schofield & Galvão, 2009).

Tabela 5: Códigos de acesso do GeneBank das sequências de *Triatoma* e grupo externo utilizados nas análises filogenéticas.

Subcomplexos (Schofield & Galvão, 2009)	Espécies	16S	COI
Brasiliensis	<i>T. brasiliensis</i>	KC248985	KC249318
	<i>T. sherlocki</i>	KC249068	KC249377
Infestans	<i>T. infestans</i>	KC249014	KC249348
	<i>T. platensis</i>	KC249363	KC249047
	<i>T. delpontei</i>	KC249332	KC249001
Maculata	<i>T. maculata</i>	AF324524	AF449139
Matogrossensis	<i>T. jatai_03</i>	KT601153	KT601162
	<i>T. jatai_05</i>	KT601154	KT601163
	<i>T. jatai_16</i>	KT601155	KT601164
	<i>T. costalimai_06</i>	KT601151	KT601160
	<i>T. costalimai_09</i>	KT601152	KT601161
	<i>T. williami_04</i>	KT601156	KT601165
	<i>T. williami_05</i>	KT601157	KT601166
	<i>T. costalimai</i>	KC571993	KC249327
	<i>T. matogrossensis</i>	KC249036	KC249359
	<i>T. matogrossensis</i>	KC249038	KC249361
	<i>T. guazu</i>	KC571994	KC608984
	<i>T. vanda</i>	KC 571997	KC608989
	Rubrovaria	<i>T. carcavalloii</i>	KC248990
<i>T. circummaculata</i>		KC248994	KC249323
<i>T. rubrovaria</i>		KC249066	KC249375
Sordida	<i>T. guasayana</i>	KC249342	KC249010
	<i>T. sordida</i>	KC249077	KC249386
	<i>T. sordida PAR03</i>	KT601158	KT601167
	<i>T. sordida ITA 05</i>	KT601159	KT601168
Grupo externo	<i>P. megistus</i>	KC248975	KC249312

4. RESULTADO

4.1 ESPÉCIMES DE ESTUDO

4.1.1 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES DE ESTUDO, AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR *T. CRUZI* E ISOLAMENTO EM MEIO DE CULTURA

Em Maio/2015, em área urbana no município Aurora do Tocantins (ponto AUR04), foram capturados 53 triatomíneos em afloramentos rochosos no peridomicílio (♀=08; ♂=04; N2=09; N3=12; N4=09; N5=11). As formas adultas foram identificadas como *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959.

A partir de cinco fêmeas, foram obtidos 127 ovos que deram início a colônia.

A presença de infecção por tripanosomatídeos foi investigada por exame parasitológico de fezes/de fezes à fresco e confirmada por isolamento em meio de cultura (NNN+LIT). Dos 34 (64,15%) insetos positivos (Figura 15, Tabela 6) obteve-se massa de 26 isolados e 25 encontram-se criopreservadas.

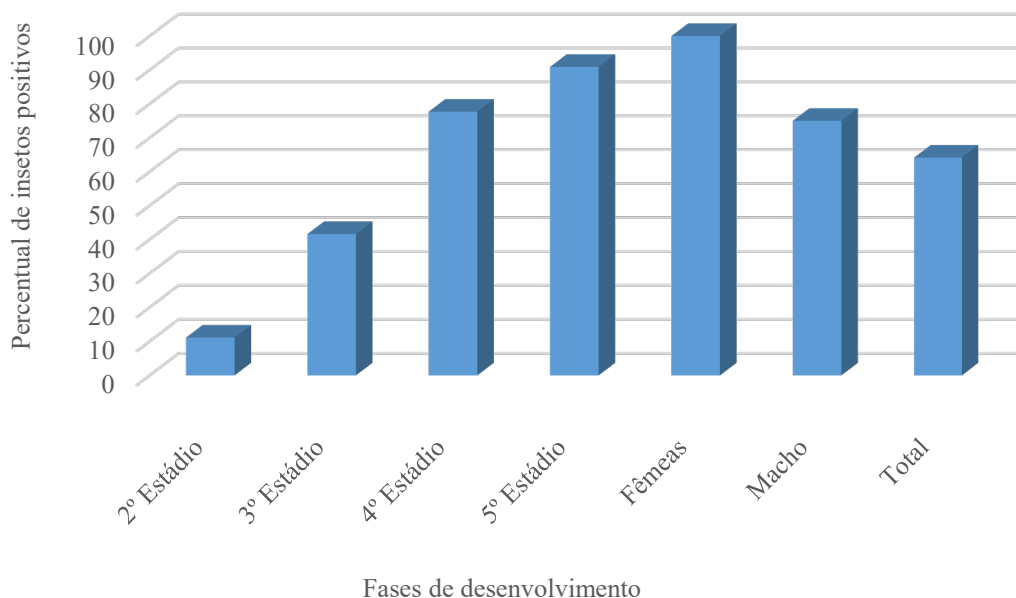


Figura 14: Percentual de positividade para *T. cruzi* nos diferentes estádios de desenvolvimento de espécimes de *T. costalimai* capturados em Maio de 2015 em Aurora do Tocantins - TO.

Tabela 6: Espécimes de *T. costalimai* capturados em Aurora do Tocantins em Maio de 2015 e percentual de infecção por *T. cruzi*.

Fase de desenvolvimento	TOTAL	POSITIVOS (N/%)
2º estágio	9	1 (11,1)
3º estágio	12	5 (41,6)
4º estágio	9	7 (77,7)
5º estágio	11	10 (90,9)
Fêmea	8	8 (100)
Macho	4	3 (75)
Total	53	34 (64,15)

Em Outubro de 2015, foram realizadas capturas nos municípios de Aurora do Tocantins, nos ecótopos peridomiciliar e silvestre e no município Paranã em ecótopo Silvestre.

Em Aurora do Tocantins foram capturados 18 espécimes identificados como *T. costalimai*. Destes, 9 espécimes foram capturados no ponto Aur 04 (peridomicílio) incluindo 6 ninfas de primeiro estágio, 1 de segundo e 2 do quarto estágio. Já no ponto Aur 02, ecótopo silvestre, foram capturados 6 ninfas de 3 º e 3 de quarto estágio. No município de Paranã obteve-se 19 espécimes de *T. jatai*, sendo 4 de primeiro estágio, 4 de segundo, 4 de terceiro e 7 de quarto estágio (Tabela 7).

Tabela 7: Espécimes de *T. costalimai* e *T. jatai* capturados em diferentes ecótopos nos municípios de Aurora do Tocantins e Paranã - TO em Outubro de 2015.

Município	Ecótopo	Espécie	Estádio	Número
Aurora do Tocantins	Peridomiciliar	<i>T. costalimai</i>	1º	6
			2º	1
			4º	2*
	Silvestre	<i>T. costalimai</i>	3º	6
			N4	3
Paraná	Silvestre	<i>T. jatai</i>	N1	4
			N2	4
			N3	4
			N4	7

*1 espécime positivo para tripanosomatídeo.

Não foi possível realizar o exame parasitológico em ninfas N1 e N2, bem como o isolamento e genotipagem da amostra proveniente da ninfa de quarto estágio capturada no peridomicílio de Aurora do Tocantins, uma vez que estes espécimes estavam com baixa condição nutricional e conseqüentemente pouco conteúdo intestinal.

4.1.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE *T. cruzi*

4.1.2.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES MINI-EXON E 24S-ALFA

A amplificação dos genes mini exon e 24S-alfa confirmou que os parasitos isolados são *T. cruzi* com a visualização de bandas de 200 pares de bases e de 110 pares de bases, respectivamente (Figuras 15 e 16). Contudo, esta abordagem não abrange os DTUs de *T. cruzi*.

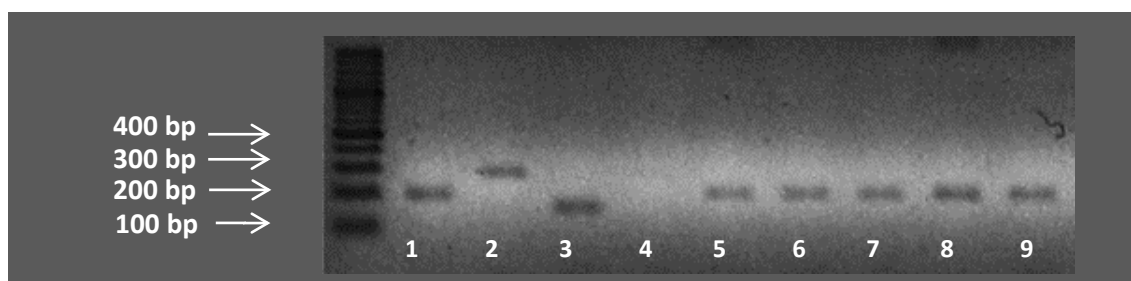


Figura 15: Eletroforese em Gel de agarose 2,5% da PCR para o gene de mini-exon das amostras de *T. cruzi* isolados de *T. costalimai* oriundos do município de Aurora do Tocantins – TO. Legenda: 1 – Controle TCI, cepa DM28; 2 – Controle TCII, cepa Y; 3 – Controle Z3, cepa 4167 ; 4 – controle negativo amostra de *T. rangeli*; 5 a 9 amostras isoladas de *T. costalimai*.

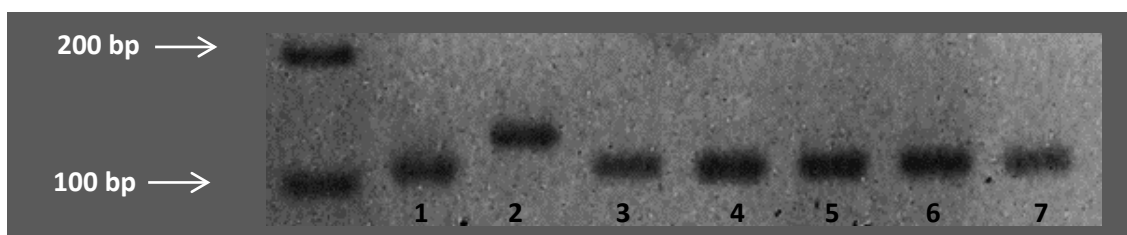


Figura 16: Eletroforese em Gel de agarose 2,5% da PCR para o gene de 24s alfa das amostras de *T. cruzi* isolados de *T. costalimai* oriundos do município de Aurora do Tocantins – TO. Legenda: 1 – Controle TCI, cepa DM28; 2 – Controle TCII, cepa Y; 3 a 7 - amostras isoladas de *T. costalimai*.

4.1.2.2 DETERMINAÇÃO DO DTU POR PCR – RFLP

A caracterização do DTU das amostras com a utilização do protocolo de Maes e Auwera (2000) permitiu genotipar somente cinco amostras de *T. cruzi* como TCI o perfil de bandas encontrado para 1f8 – 380pb, 210 pares de bases (Figura 17); gp72 com 750 e 450 pares de bases (Figura 18); HSP60 com 450pares de bases (Figura 19); H3 com 450 e 210

com pares de bases (Figura 20). A genotipagem destas como TCI foi possível pela comparação destes perfis de bandas obtidos com o estabelecido para cada DTU de *T. cruzi* conforme apresentado no quadro 6. As demais amostras apresentaram perfil de bandas inconclusivos não permitindo a caracterização do DTU.

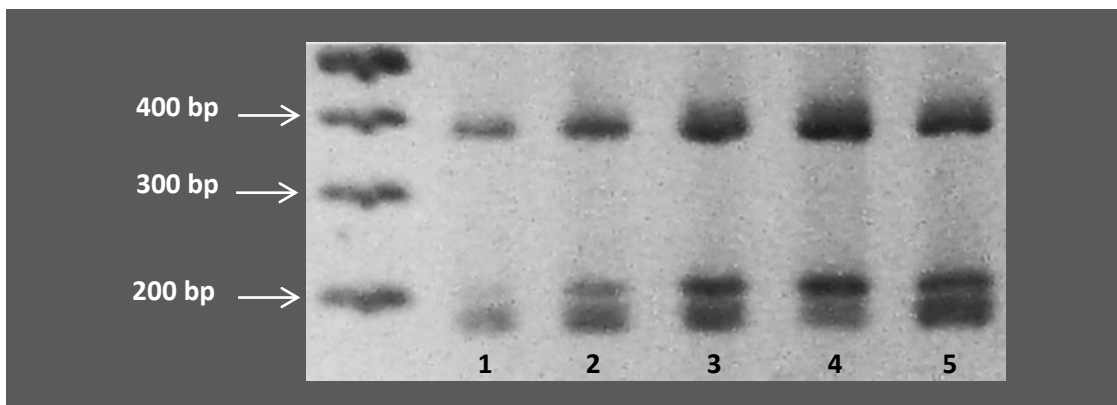


Figura 17: Eletroforese em Gel de agarose 4% do produto da digestão do fragmento do gen 1f8 com a enzima de restrição Alw211 das amostras de *T. cruzi* isoladas de *T. costalimai* oriundos de Aurora do Tocantins - TO. Legenda: 1 a 4 - amostras isoladas de espécimes de *T. costalimai*.

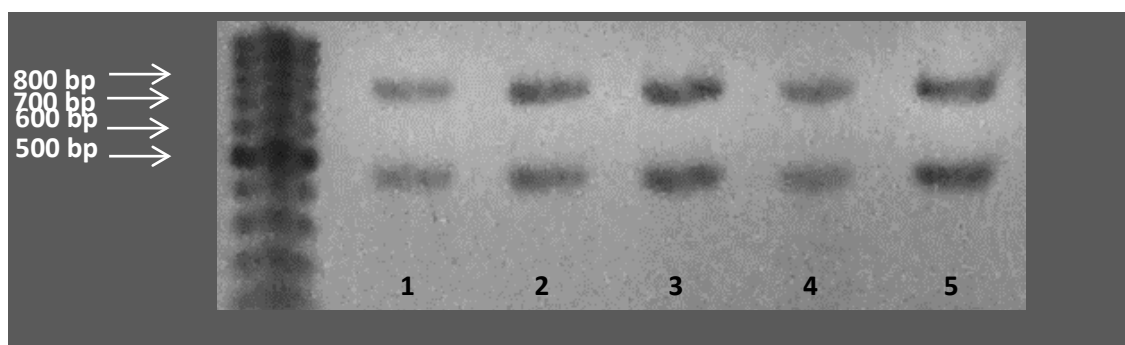


Figura 18: Eletroforese em Gel de agarose 1,5% do produto da digestão do fragmento do gen gp72 com a enzima de restrição Taq das amostras de *T. cruzi* isoladas de *T. costalimai* oriundos de Aurora do Tocantins - TO. Legenda: 1 a 5 - amostras isoladas de espécimes de *T. costalimai*.

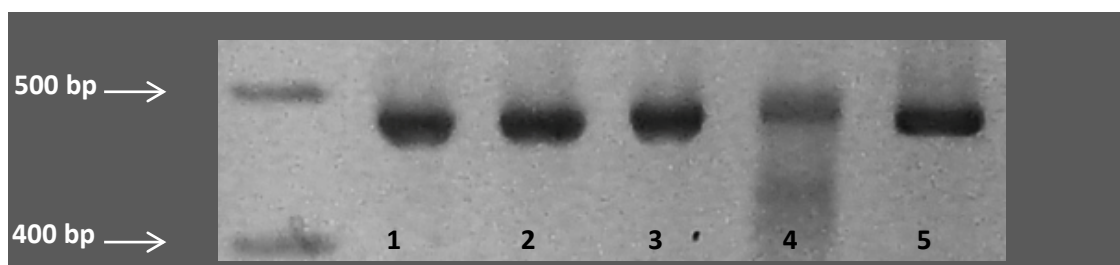


Figura 19: Eletroforese em Gel de agarose 1,5% do produto da digestão do fragmento do gen HSP60 com a enzima de restrição EcoRV das amostras de *T. cruzi* isoladas de *T. costalimai* oriundos de Aurora do Tocantins - TO. Legenda: 1 a 5 - amostras isoladas de espécimes de *T. costalimai*.

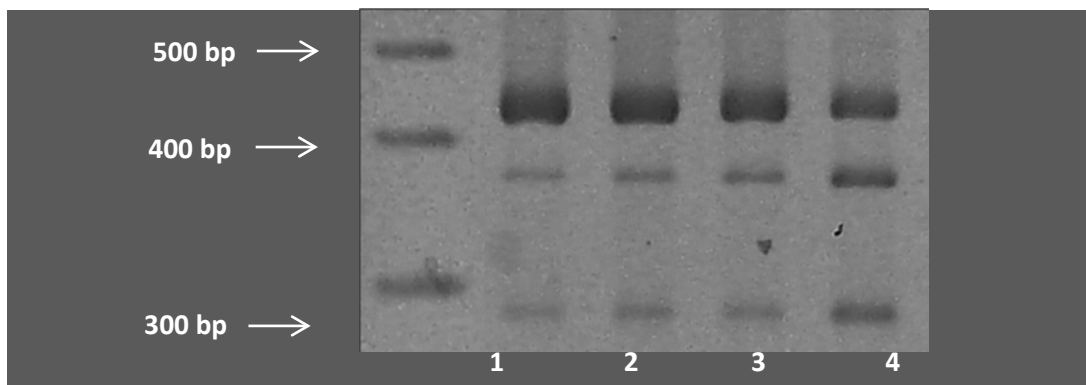


Figura 20: Eletroforese em Gel de agarose 1,5% do produto da digestão do fragmento do gen histone H3 com a enzima de restrição AluI das amostras de *T. cruzi* isoladas de *T. costalimai* oriundos de Aurora do Tocantins - TO. Legenda: 1 a 4 – amostras isoladas de espécimes de *T. costalimai*.

4.1.2.3 DETERMINAÇÃO DO DTU POR AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE 2 DE CITOCROMO OXIDASE II, GENES 24S ALFA E ESPAÇADOR INTERGÊNICO (SL-IR)

Por este protocolo foi possível caracterizar um total de 21 amostras, incluindo as cinco amostras caracterizadas pelo protocolo de Maes e Awerea (2000), como DTU TCI. Inicialmente, pela amplificação do gene COII o resultado apontava para TCI ou TCIII, contudo, por amplificação de gene SL-IR todas as amostras apresentaram 150pb, concluindo-se como TCI (Figura 21). Estes resultados foram publicados em artigo científico conforme apresentado no anexo B, de forma a divulgar pela primeira vez o conhecimento da diversidade de *T. cruzi* presente em ambiente silvestre no município de Aurora do Tocantins – TO, assim como para ressaltar o risco associado à proximidade entre as moradias e o ciclo silvestre deste parasito na localidade de estudo.

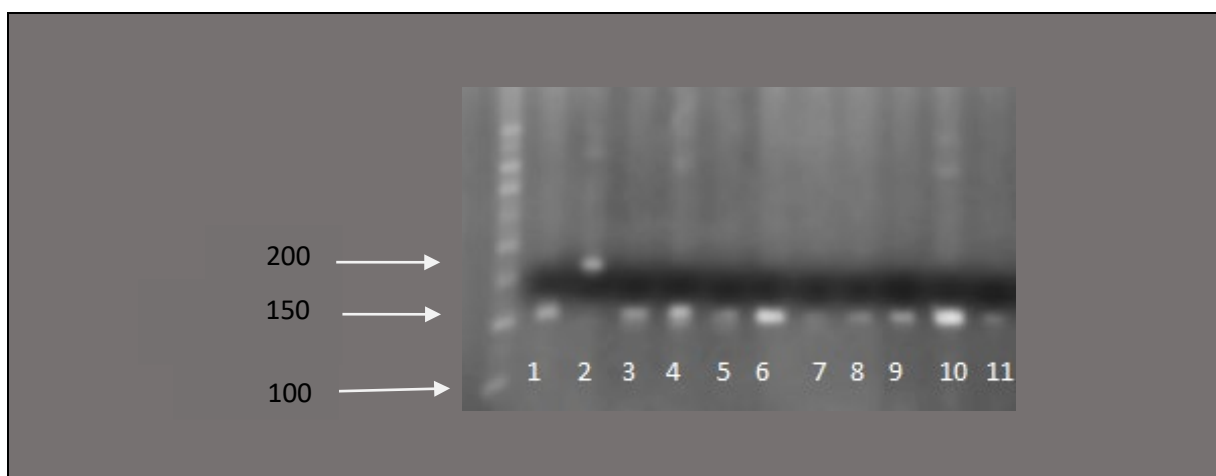


Figura 21: Eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5 % do produto para o gene SL – IR das amostras de *T. cruzi* isoladas de *T. costalimai* oriundos de Aurora do Tocantins - TO. Legenda: 1 – Controle TCI, cepa DM28; 2 - Controle TCIII, cepa RN19; 3 a 11 – amostras isoladas de espécimes de *T. costalimai*.

4.2 MORFOLOGIA DE ESTRUTURAS ASSOCIADAS À LOCOMOÇÃO DE ADULTOS

A análise comparativa das medidas de estruturas associadas a locomoção de machos e fêmeas da espécie *Triatoma jatai* mostrou variação significativa entre os sexos no comprimento do corpo e fêmur da perna 3, ambos maiores nas fêmeas que nos machos (Tabela 8; Figuras 22 e 23).

Tabela 8: Medidas (em mm) de estruturas relacionadas à locomoção de machos e fêmeas de *T. jatai*.

Caracteres	Fêmeas		Machos		<i>p</i>
	χ	S	χ	S	
Tamanho corporal	21,67	1,02	20,56	0,66	0,0015*
Comprimento do pronoto	3,04	0,22	3,10	0,17	0,7861
Lobo Anterior do pronoto	2,72	1,17	2,63	0,08	0,0677
Lobo posterior do pronoto	4,50	0,32	4,53	0,27	0,6261
Comprimento das asas	12,38	0,77	12,67	0,48	0,8749
Largura das asas	4,50	0,27	4,65	0,16	0,9491
Comprimento do Fêmur P1	4,55	0,20	4,53	0,17	0,4380
Comprimento da Tíbia P1	4,45	0,25	4,39	0,26	0,3081
Comprimento do Tarso P1	1,10	0,10	1,06	0,07	0,1461
Comprimento do Fêmur P2	4,89	0,30	4,74	0,20	0,0869
Comprimento da Tíbia P2	4,90	0,43	5,01	0,27	0,7894
Comprimento do Tarso P2	1,13	0,11	1,08	0,06	0,1126
Comprimento do Fêmur P3	6,32	0,32	6,12	0,17	0,0335*
Comprimento da Tíbia P3	7,25	0,50	7,15	0,53	0,3182
Comprimento do Tarso P3	1,24	0,13	1,24	0,07	0,5792

*Diferenças significativas (Test-T, $p < 0,095$).

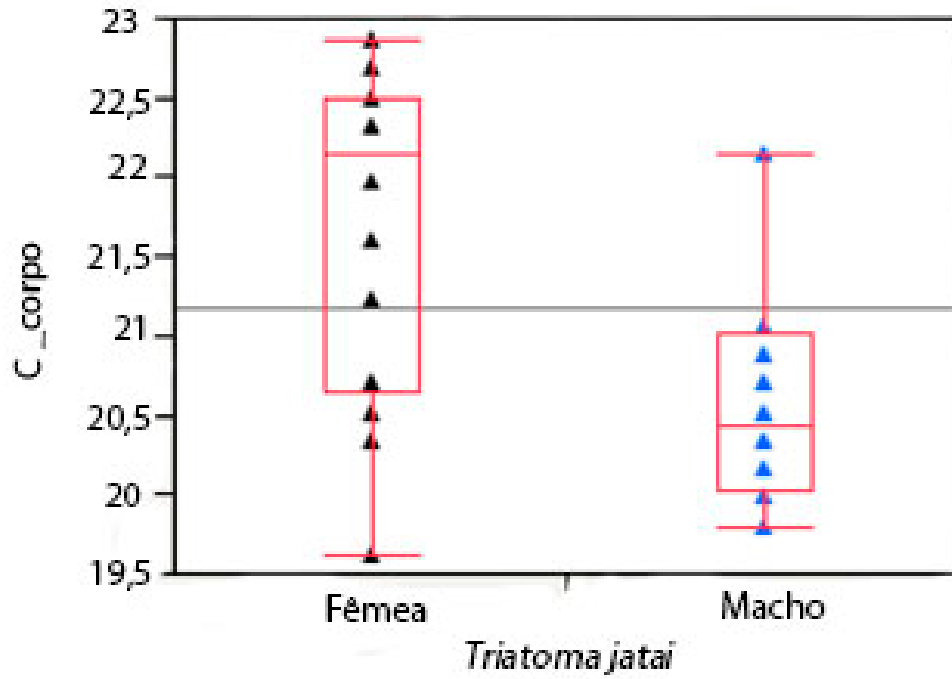


Figura 22: Tamanho corporal (em mm) de fêmeas e machos de *T. jatai*.

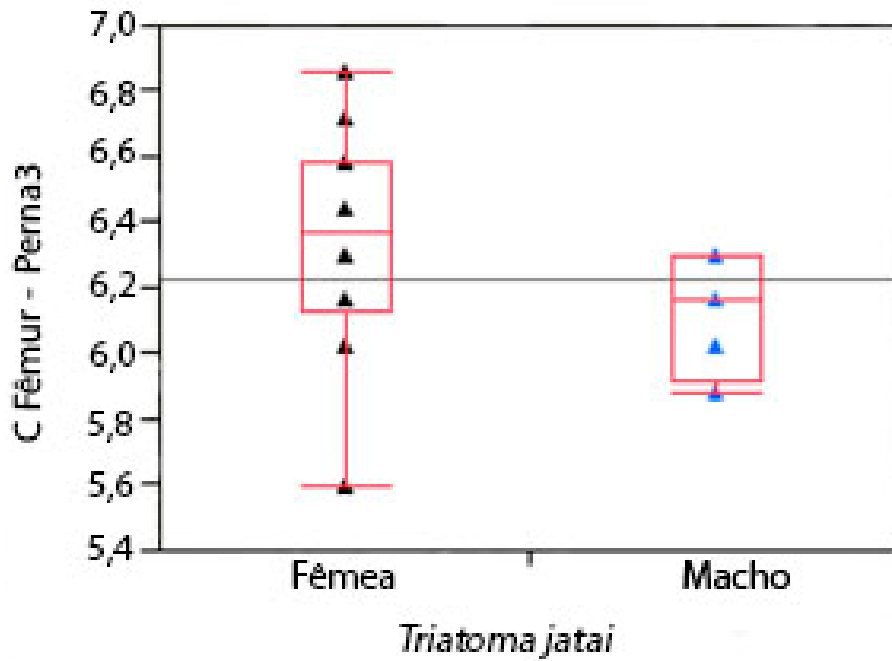


Figura 23: Comprimento (C) do fêmur da perna 3 (em mm) de fêmeas e machos de *T. jatai*.

Na comparação entre as três espécies de estudo (Tabela 9), com relação ao tamanho corporal, as fêmeas se mostraram maiores do que os machos onde *T. sherlocki* (♀ - 26,60mm; ♂ - 25,08mm) foi maior que *T. costalimai* (♀ 26,01mm; ♂ - 23,81mm), que *T. jatai* (♀ 21,67mm; ♂ - 20,56mm) (Figura 24).

Tabela 9: Valores médios (em mm) das estruturas relacionadas à locomoção das espécies *T. jatai*, *T. sherlocki* e *T. costalimai*.

Caracteres	<i>T. sherlocki</i>		<i>T. jatai</i>		<i>T. costalimai</i>	
	M	F	M	F	M	F
Tamanho corporal	25,08	26,60	20,56	21,67	23,81	26,01
Comprimento do pronoto	3,38	3,37	3,10	3,04	3,10	3,41
Lobo Anterior do pronoto	1,52	1,53	1,42	1,43	1,44	1,47
Lobo posterior do pronoto	4,88	4,97	4,53	4,50	4,76	5,00
Comprimento das asas	11,62	11,59	12,67	12,38	14,95	15,93
Largura das asas	3,76	3,69	4,65	4,50	4,12	4,44
Comprimento do Fêmur P1	6,35	6,53	4,53	4,55	5,49	5,78
Comprimento da Tíbia P1	6,27	6,51	4,39	4,45	5,95	6,36
Comprimento do Tarso P1	1,47	1,50	1,06	1,10	1,20	1,19
Comprimento do Fêmur P2	7,11	7,28	4,74	4,89	5,71	5,92
Comprimento da Tíbia P2	7,70	7,98	5,01	4,90	6,64	6,98
Comprimento do Tarso P2	1,52	1,55	1,08	1,13	1,19	1,19
Comprimento do Fêmur P3	9,28	9,58	6,12	6,32	7,22	7,63
Comprimento da Tíbia P3	11,11	11,49	7,15	7,25	9,36	9,97
Comprimento do Tarso P3	1,66	1,71	1,24	1,24	1,33	1,40

Legenda: P1: perna 1; P2: Perna 2; P3: Perna 3.

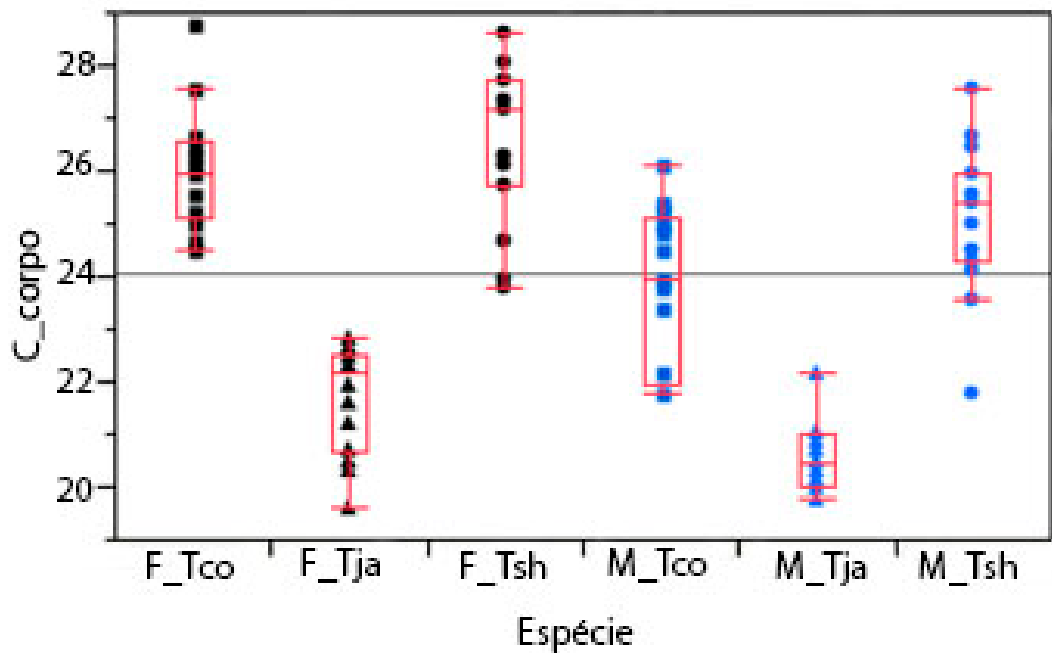
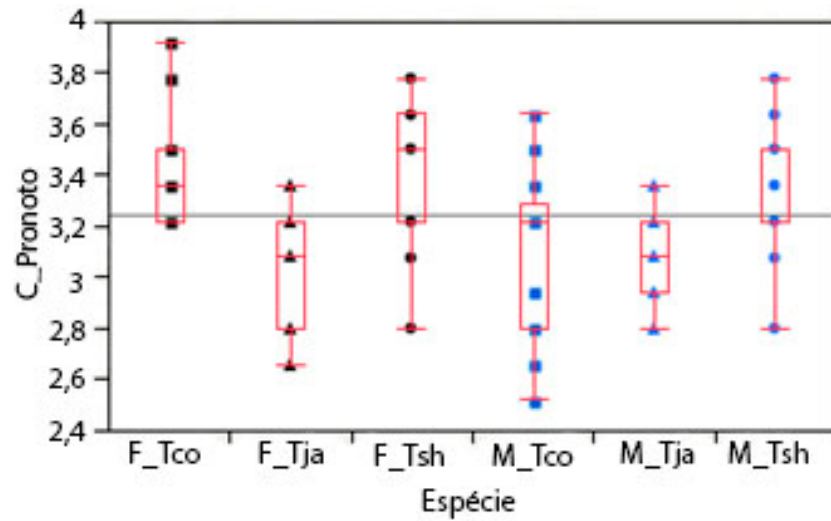


Figura 24: Médias (em mm) do tamanho corporal de fêmeas (F) e machos (M) das espécies *T. jatai* (Tja), *T. costalimai* (Tco) e *T. sherlocki* (Tsh).

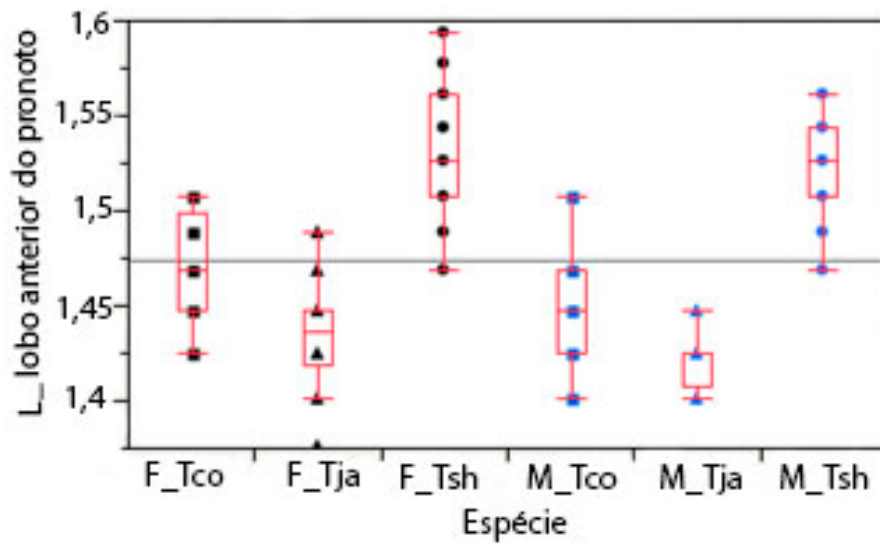
Para o tamanho do pronoto, verificou-se que as fêmeas de *T. jatai* apresentaram menor comprimento (3,04mm) que as de *T. costalimai* (3,41mm) e *T. sherlocki* (3,37mm) (Figura 25A, Tabela 9).

Quanto à largura do pronoto, as fêmeas apresentaram o lobo anterior mais largo do que nos machos na sequência *T. sherlocki* maior que *T. costalimai* e este maior que *T. jatai*. Entre as fêmeas, *T. sherlocki* apresentou a largura de 1,53mm, seguido de *T. costalimai* com 1,47mm e *T. jatai* 1,43mm, enquanto que nos machos obteve-se os valores *T. sherlocki* 1,52mm, *T. costalimai* 1,44mm e *T. jatai* 1,42mm (Figura 25B; tabela 9). O lobo posterior foi maior nos machos do que nas fêmeas que apresentaram os valores médios em *T. costalimai* (5,0mm), *T. sherlocki* (4,97mm) e menor em *T. jatai* (4,5mm). Quanto aos machos os tamanhos de largura do lobo posterior do pronoto obedeceram a mesma sequência observada no lobo anterior sendo *T. sherlocki* (4,88mm) maior que, *T. costalimai* (4,76mm) e este maior que *T. jatai* (4,53mm) (Figura 25C; Tabela 9).

A



B



C

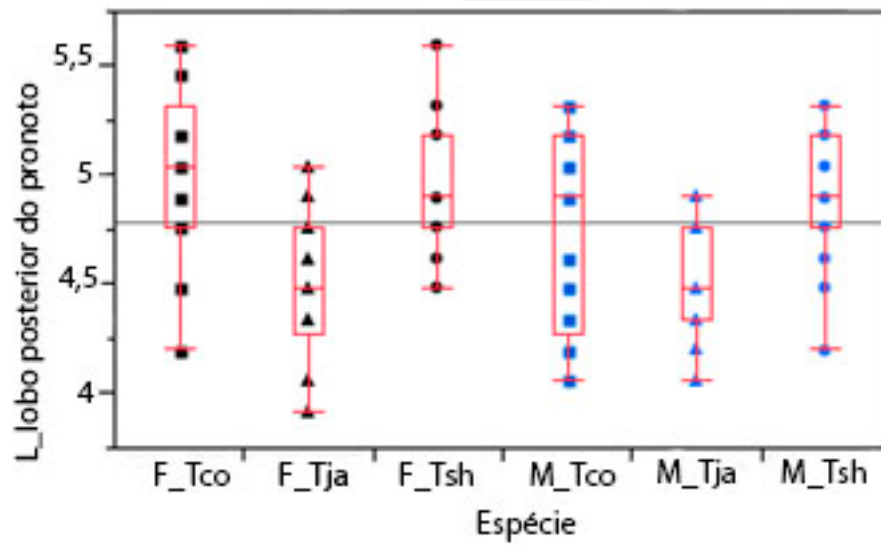


Figura 25: Medidas (em mm) do pronoto de fêmeas (F) e machos (M) das espécies *T. jatai* (Tj), *T. costalimai* (Tc) e *T. sherlocki* (Ts). A – Comprimento; B – Largura do lobo anterior; C – Largura do lobo posterior.

Com relação às asas, as fêmeas de *T. costalimai* apresentaram maior comprimento (15,93mm) do que as de *T. jatai* (12,38mm) e *T. sherlocki* (11,59mm) (Figura 26A, Tabela 9), enquanto que a largura das asas foi maior em *T. jatai* (4,50) em relação aos demais (*T. costalimai* 4,44mm; *T. sherlocki* 3,69mm) (Figura 26B, Tabela 9).

Para os machos, verificou-se que a espécie braquiíptera *T. sherlocki* apresentou asas de comprimento menores ($C_a=11,62\text{mm}$) que *T. jatai* ($C=12,67\text{mm}$) e *T. costalimai* (14,95mm) (Figura 26A, Tabela 9). Contudo com relação a largura das asas, *T. jatai* apresentou maior largura ($L=4,65\text{mm}$) seguida de *T. costalimai* (4,12mm) e *T. sherlocki* (3,76mm) (Figura 26B, Tabela 9).

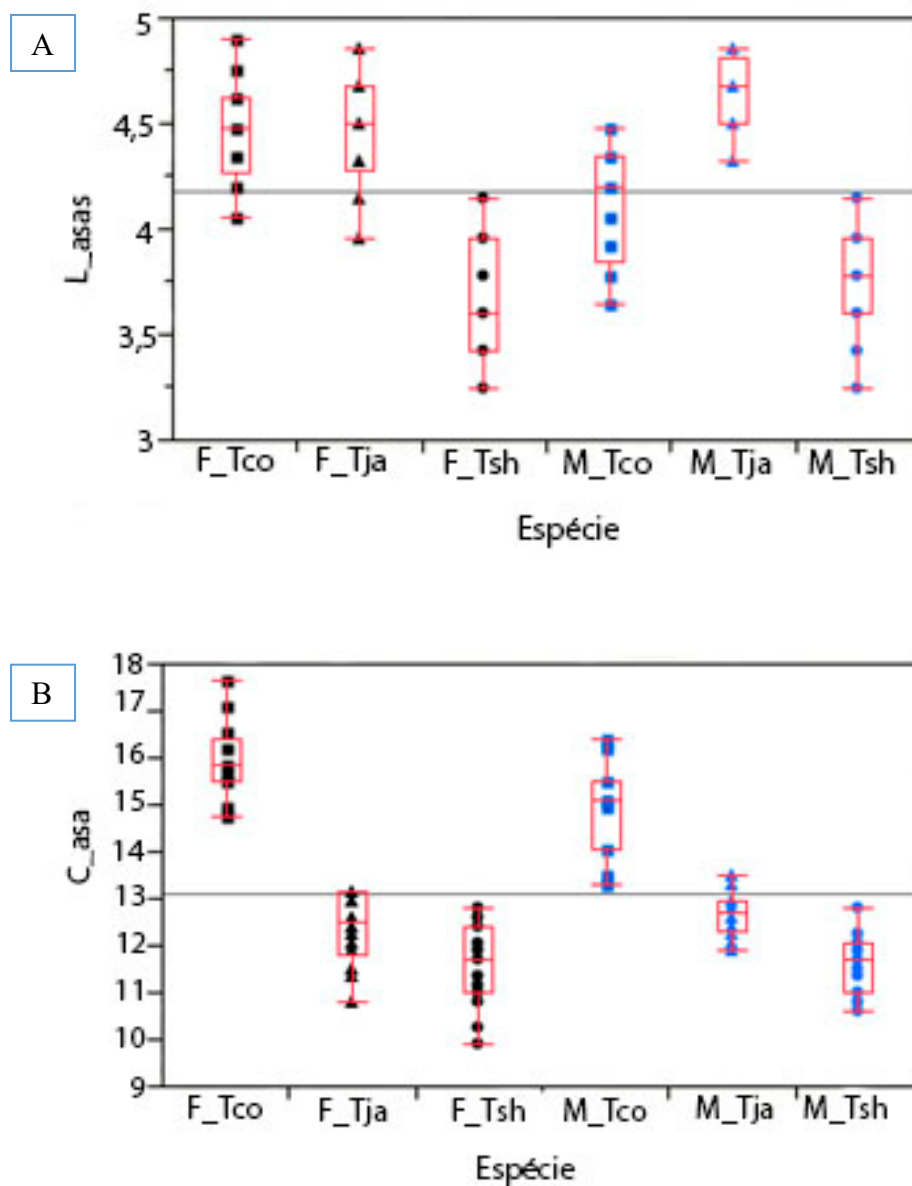


Figura 26: Medidas (em mm) das asas de fêmeas (F) e machos (M) das espécies *T. jatai* (Tja), *T. costalimai* (Tco) e *T. sherlocki* (Tsh). A – Comprimento; B – Largura.

Com relação às pernas as fêmeas quanto os machos de *T. sherlocki* apresentaram o comprimento dos fêmures, tíbias e primeiro artícuo tarsal, dos três pares de pernas, maior do que *T. costalimai* seguido de *T. jatai* (Tabela 9; Figuras 27, 28 e 29).

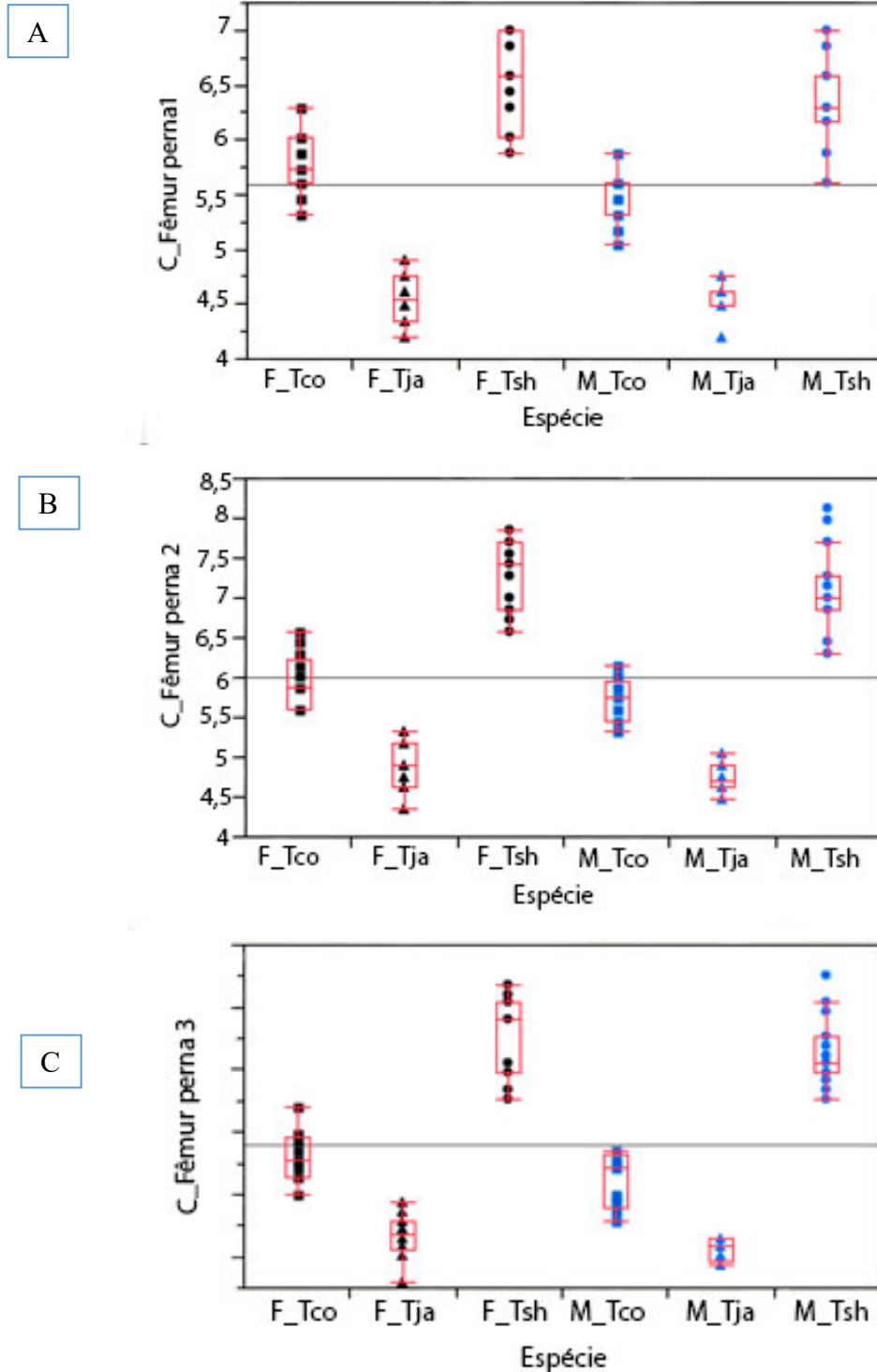


Figura 27: Medidas (em mm) do comprimento do fêmur de fêmeas (F) e machos (M) das espécies *T. jatai* (Tja), *T. costalimai* (Tco) e *T. sherlocki* (Tsh). A – Perna 1; B – Perna 2; C – Perna 3.

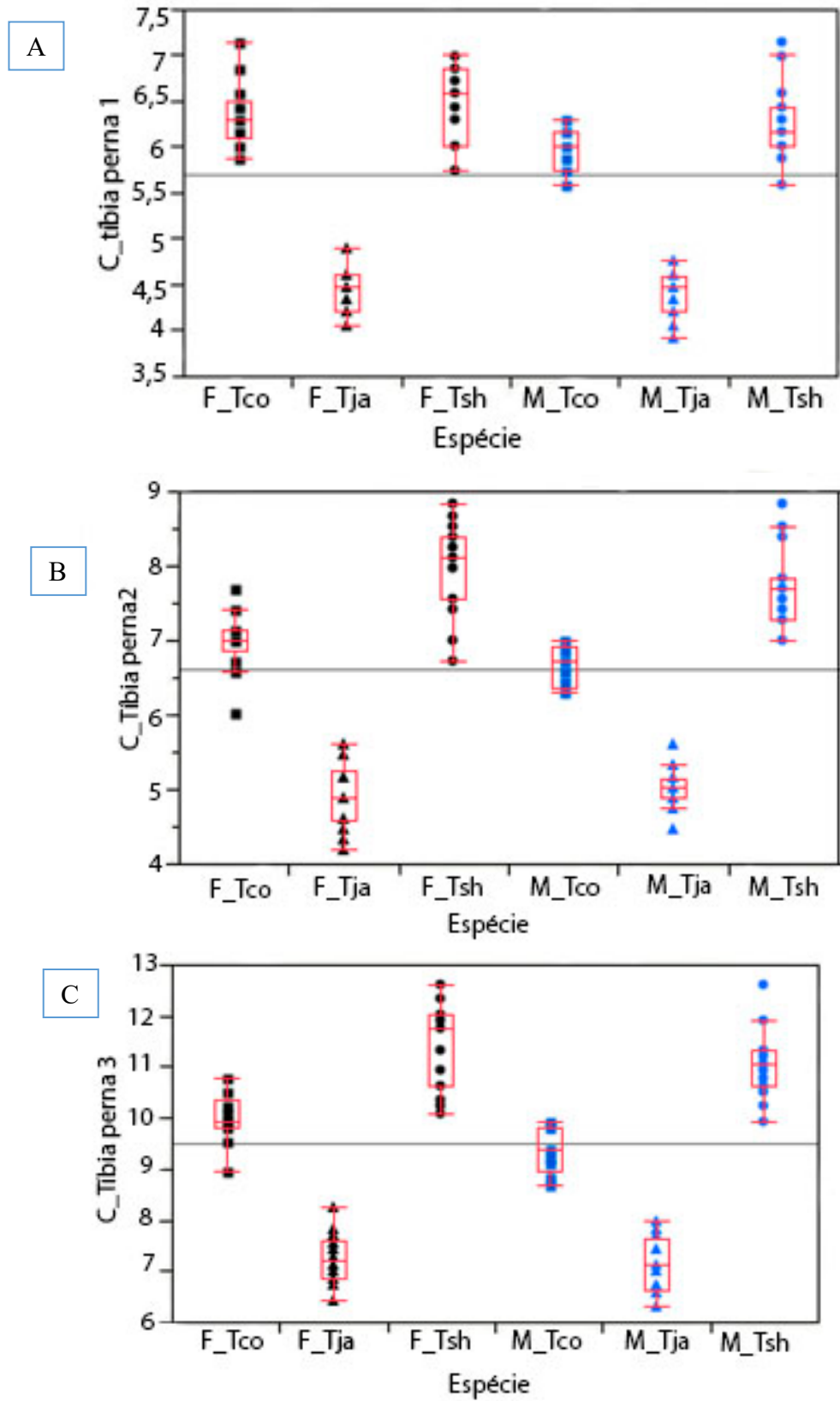


Figura 28: Medidas do comprimento (em mm) da tíbia de fêmeas (F) e machos (M) das espécies *T. jatai* (Tja), *T. costalimai* (Tco) e *T. sherlocki* (Tsh). A – Perna 1; B – Perna 2; C – Perna 3.

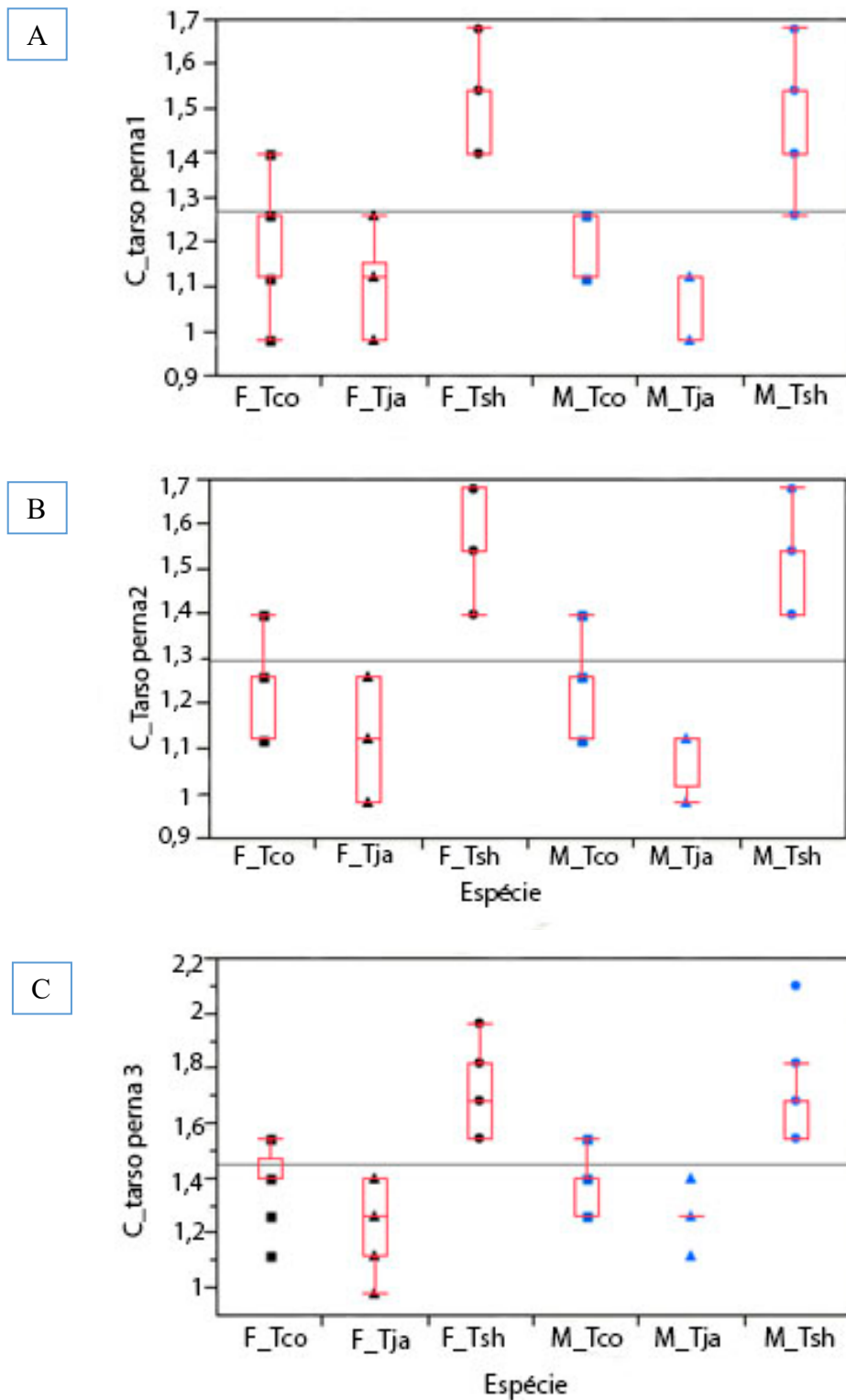


Figura 29: Medidas do comprimento (em mm) do artículo tarsal de f mas (F) e machos (M) das espécies *T. jatai* (Tja), *T. costalimai* (Tco) e *T. sherlocki* (Tsh). A – Perna 1; B – Perna 2; C – Perna 3.

4.3 CICLO DE DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO DE *T. jatai* e *T. costalimai*

Foram observados 92 espécimes da espécie *Triatoma jatai* que apresentou um ciclo de desenvolvimento de ovo a adulto de valor mediano de 503 dias, cerca de um ano e três meses, com variação quartil 25-75% de 411 – 57, em condições laboratoriais de temperatura e ambiente. Um total de 17 espécimes, 12 fêmeas e 5 machos, chegaram a fase adulta durante o período de observação.

Contudo, para a espécie *T. costalimai*, nenhum espécime de estudo, de um total de 36, chegou a adulto durante o período de observação, obtendo-se de ovo a N5 um período mediano de desenvolvimento de 247 dias, com variação quartil 25-75% de 166-310.

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,001$) entre as espécies para os parâmetros tempo de eclosão dos ovos, período de desenvolvimento do estágio N1 e do estágio N4.

O período de incubação mediano dos ovos de *T. jatai* (n=92) foi de 31 dias (quartil 29-32). Para ninfas de primeiro estágio (N1) (n=92) obteve-se um tempo de desenvolvimento de 41 dias (quartil 32-49,5); as de segundo estágio (N2) (n=77), 32 dias (quartil 24,75-43,5); as de terceiro estágio (N3) (n=77) 28 dias (quartil 25,25-41,7); as de quarto estágio (N4) (n=60), 36 dias (quartil 31-42); e as de quinto estágio (N5) (n=18), 284,5 dias (quartil 237-364,7). Para a espécie *T. costalimai* foi observado o período de incubação mediano dos ovos (n=36) de 32 dias com variação quartil de 31-32,7. Para N1 (n=36) obteve-se um tempo de desenvolvimento de 28 dias (quartil 25-32,7); (N2) (n=36), 28 dias (quartil 25-34,2); (N3) (n=30), 30 dias (quartil 27-41); e (N4) 75 dias (quartil 47-142) (Tabela 10).

O número de repastos (valores em mediana) em cada estágio de N1 a N5 para a espécie *T. jatai* foi de 5; 4; 4; 4; 39,5, respectivamente. Para a espécie *T. costalimai* a quantidade de repastos para cada estágio, de N1 a N4, foi de 4; 4; 4; e 10 (Tabela 11).

A taxa de mortalidade (%) registrada para *T. jatai* em cada estágio, de N1 a N5, foi de 16,31; 9,10; 14,29; 16,67 e 4,0, respectivamente. Para a espécie *T. costalimai* a taxa de mortalidade observada, de N1 a N4, foi de 0; 16,70; 3,33; e 20,69 (Tabela 12).

Durante o experimento, a média da temperatura foi de 25,1°C (máxima de 26°C e mínima de 23,9°C) e da umidade relativa de 61% (máxima de 69% e mínima de 52%) (Anexos C e D).

Tabela 10: Tempo de desenvolvimento (em dias) de *Triatoma jatai* e *T. costalimai* criadas em condições de laboratório.

Fase de desenvolvimento	<i>T. jatai</i>			<i>T. costalimai</i>			<i>p</i>
	N	Mediana	Quartil (25-75%)	N	Mediana	Quartil (25-75%)	
Ovo	92	31	(29-32)	36	32	(31-32,7)	0,376*
N1	92	41	(32-49,5)	36	28	(25-32,7)	0,001*
N2	77	32	(24,75-43,5)	36	28	(25-34,2)	0,3543
N3	70	28	(25,25-41,7)	30	30	(27-41)	0,3965
N4	60	36	(31-42)	29	75	(47-142)	0,001*
N5	18	284,5	(237-364,7)	0	-	-	-
Total	17	503	(411-574)	19	247	(166- 310)	-

N: Número de insetos para cada estádio; N1 (Ninfa de 1º estágio), N2 (Ninfa de 2º estágio), N3 (Ninfa de 3º estágio), N4 (Ninfa de 4º estágio), N5 (Ninfa de 5º estágio). *Diferenças significativas (Mann-Whitney test, $p < 0.001$).

Tabela 11: Número de repastos realizados por *Triatoma jatai* e *T. costalimai* criadas em condições de laboratório.

Estádio	<i>T. jatai</i>			<i>T. costalimai</i>			Valor de <i>p</i>
	N	Mediana	Quartil	N	Mediana	Quartil	
N1	72	5	(4-7)	36	4	(3-4,7)	0,001*
N2	70	4	(3-6)	30	4	(3,7-4,2)	0,4459
N3	60	4	(3-5,7)	29	4	(4-5)	0,2418
N4	50	4	(4-5)	23	10	(6-20)	0,001*
N5	18	39,5	(33-51,5)	0	-	-	-
Total	18	102,5	(85,5-114,7)	19	29	(18-38)	0,001*

N: número de insetos para cada estágio, N1 (Ninfa de 1º estágio), N2 (Ninfa de 2º estágio), N3 (Ninfa de 3º estágio), N4 (Ninfa de 4º estágio), N5 (Ninfa de 5º estágio). *Diferenças significativas (Mann-Whitney test, $p < 0.001$).

Tabela 12: Taxa de mortalidade considerando os estádios ninfais em *T. jatai* e *T. costalimai*.

Fase de desenvolvimento	<i>T. jatai</i>			<i>T. costalimai</i>			Valor de <i>p</i>
	N	n	Mortalidade (%)	N	n	Mortalidade (%)	
N1	92	77	16,31	36	36	0	NS
N2	77	70	9,10	36	30	16,70	NS
N3	70	60	14,29	30	29	3,33	NS
N4	60	50	16,67	29	23	20,69	NS
N5	50	17	4,0	23	0	-	NS
F	12	12	0	-	-	-	-
M	5	5	0	-	-	-	-

N: Número de insetos iniciais; n: número de insetos que sobreviveram. N1 (Ninfa de 1º estágio), N2 (Ninfa de 2º estágio), N3 (Ninfa de 3º estágio), N4 (Ninfa de 4º estágio), N5 (Ninfa de 5º estágio), F – fêmea, M – macho.

4.4 – ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *T. JATAI* COM OUTRAS ESPÉCIES DA AMÉRICA DO SUL

Para as análises do fragmento de gene 16S, que é um gene estrutural, não codificante, o programa selecionou como melhor modelo o HKY+I+G, sendo o comando da linguagem inserida no MrBayes o “nst=2, rates=invgamma”. Este modelo considera frequências base variáveis (uma taxa de transição e uma taxa de transversão).

Já para o gene COI, o JModeltest selecionou o modelo GTR+I+G, tendo o comando “nst=6, rates = invgamma”. Este modelo considera frequências de bases variáveis e substituições simétricas. Os dados de nucleotídeos para COI foram traduzidos em sequências de aminoácidos para verificar o alinhamento, como recomendado por Mas-Coma e Bargues (2009) e Bargues et al (2014), para evitar interpretar pseudogenes na análise.

A verificação manual da qualidade das sequências obtidas permitiu a seleção para os tamanhos confiáveis de 445 pb para 16S rDNA e 539pb para o COI.

A análise filogenética mostrou *T. jatai* como uma espécie irmã de *T. costalimai* com alto índice de suporte (BPP = 98%, Figura 31). Observou-se maior diferenciação entre as distâncias p para o gene COI (P=0,097 - 0,100) que para 16S onde ambas espécies apresentaram distância p 0,025.

Para ambos fragmentos de genes os resultados foram congruentes revelando que *T. jatai* e *T. costalimai* exibem distâncias maiores do que entre espécies válidas como as do subcomplexo Rubrovaria como *Triatoma rubrovaria* (Blanchard 1843), *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) e *Triatoma carcavalloei* Rocha & Lent, 1998 e do subcomplexo Infestans como *Triatoma infestans* Klug 1834, *Triatoma platensis* Neiva 1913 e *Triatoma delpontei* Romana & Abalos, 1947.

A árvore filogenética gerada é apresentada na Figura 31.

Os resultados foram publicados no manuscrito apresentado no anexo E.

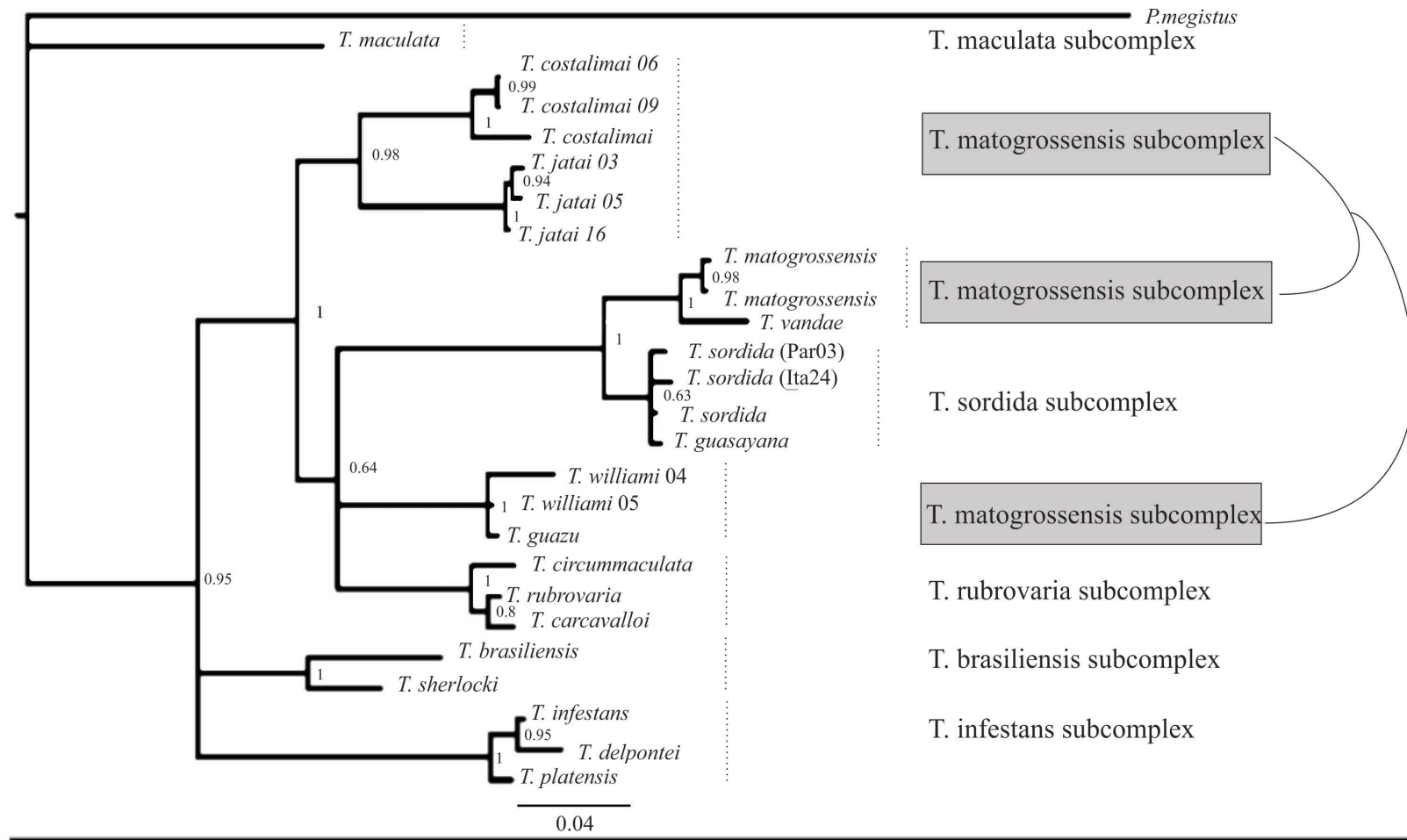


Figura 30: Inferência Bayesiana de análise combinada de *Triatoma jatai* com base em genes 16S e COI. Fonte: Teves et al (2016).

5. DISCUSSÃO

5.1 ESPÉCIMES DE ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DE *T. cruzi*

Este trabalho mostrou que a espécie *T. jatai* continua ocorrendo na localidade tipo em Paranã – TO, contudo sem infecção pelo parasito *T. cruzi*, assim como observado anteriormente por Teves-Neves (2012) e Gonçalves e colaboradores (2013).

No mês de Outubro de 2015, não foram capturados espécimes adultos podendo-se sugerir que uma possível escassez de fonte alimentar pode ter levado os adultos de *T. jatai* a se dispersarem para novos ecótopos, o que representaria um risco, contudo maiores estudos precisariam ser realizados para o entendimento e comprovação desta suposição.

No município de Aurora do Tocantins, no mês de Maio de 2015, o encontro de ninfas e adultos de *T. costalimai* em rochas em ambiente de peridomicílio e com alto índice de infecção por *T. cruzi*, sugere que a espécie está mantendo o ciclo do parasito nesta localidade constituindo um risco de transmissão vetorial da doença de Chagas, principalmente diante da proximidade das rochas, presente em todo entorno da cidade e próximo as casas.

Estes resultados corroboram outros estudos que demonstraram a ocorrência do *T. costalimai* em localidades de bioma Cerrado e frequentemente capturados em afloramentos rochosos em ambientes peridomiciliares e intradomicílio (Mello, 1982; Machiner et al, 2012; Gurgel-Gonçalves et al, 2012; Brito et, 2017a). Em algumas localidades no estado de Goiás é suposto que ocorram em simpatria com *T. williami*, contudo estudos mais detalhados sobre os nichos ecológicos dessas espécies são necessários para entender sua distribuição geográfica (Pereira et al, 2013).

A infecção de *T. costalimai* por *T. cruzi* encontrada neste trabalho foi anteriormente demonstrada por Gonçalves e colaboradores (2009) em inquérito epidemiológico realizado em ecótopos silvestre e de peridomicílio de nove municípios do Sudeste do Tocantins: Novo Jardim, Ponte Alta de Bom Jesus, Taguatinga, Lavandeira, Combinado, Novo Alegre, Arraias e Paranã, inclusive Aurora do Tocantins.

Os resultados deste trabalho são maiores que os inicialmente demonstrados por Mello & Borges (1981) e Mello (1982), de 13,5% e 0,4% respectivamente, em Mambaí–GO.

O potencial sinantrópico de *T. costalimai* foi demonstrado por Machiner e colaboradores (2012) que relataram maior ocorrência de espécimes em rochas localizadas no peridomicílio, próximas a galinheiro e pocilgas, do que em ambiente silvestre, contudo, neste caso, não encontraram infecção por *T. cruzi*.

Estudo recente, por avaliação de registros de vigilância entomológica do sudeste do estado do Tocantins, reporta a ocorrência com frequência de *T. costalimai* no intra e peridomicílio, com uma taxa de infecção de 13,7% de infecção por *T. cruzi* em um total de 839 insetos, sugerindo que *T. costalimai* possa contribuir para a transmissão do parasito em ambientes humanos (Brito et al, 2017b). No presente estudo, o encontro de uma alta taxa de infecção por *T. cruzi* (64,7%) em espécimes de *T. costalimai* em rochas próximas a um único peridomicílio demonstra o risco desta realidade e permite sugerir que o ciclo do parasito ocorre entre os triatomíneos e animais silvestres que habitam as rochas desta localidade.

Lorosa e colaboradores (1999) observaram que *T. costalimai* apresentou ecletismo do hábito alimentar (roedores, gambás, lagartos, cavalos, tatus e pássaros) em espécimes capturados no Norte de Goiás. A avaliação de fonte alimentar de espécimes de *T. costalimai* e *T. jatai* foi pesquisada por ensaio imunoenzimático em inquéritos epidemiológicos realizados em municípios do Sudeste do Tocantins. Contudo, para espécimes de *T. costalimai* capturados em Aurora do Tocantins, somente foi detectado ave e hemolinfa, o que não ajuda no entendimento da relação com o parasito *T. cruzi*, enquanto que um espécime de *T. jatai*, capturado em Paranã, foi positivo para tatu, o que pode indicar a presença de um hospedeiro natural de *T. cruzi* na localidade, embora não tenha sido encontrado insetos infectados pelo parasito (Gonçalves et al, dados não publicados).

O encontro de *T. cruzi* genótipo TcI neste trabalho, primeiro para *T. costalimai*, também foi relatado em estudos de pesquisa de isolados silvestres obtidos de triatomíneos de 29 espécies do gênero *Triatoma* (Izeta- Alberdi et al, 2016) contudo poucos trabalhos abordam especificamente localidades que apresentem o bioma Cerrado sendo a maioria relacionado a reservatórios silvestres.

Estudo realizado em municípios do Mato Grosso do Sul com isolados obtidos das espécies *T. sordida*, *T. matogrossensis*, *P. megistus* e *Rhodnius* sp. demonstrou a presença de *T. cruzi* I (Cominetti et al, 2014). Da mesma forma com isolados obtidos de diferentes ordens de reservatórios capturados em área de Bioma Cerrado (Jansen et al, 2015), assim como em morcegos capturados no Tocantins (Lima et al, 2015).

Jansen e colaboradores (2015) observaram uma maior predominância de isolado TcI em reservatórios silvestres e afirma que *Didelphis* spp. infectados por TcI são capazes de manter parasitemia alta e de longa duração. Uma avaliação dos animais que podem estar atuando como reservatórios de *T. cruzi* nos afloramentos rochosos pode contribuir para o entendimento do ciclo silvestre do parasito na região.

A metodologia utilizada inicialmente para genotipagem dos isolados foi conclusiva somente para cinco amostras, apresentando bandas inespecíficas e resultados inconclusivos para as demais amostras enquanto que, por amplificação de gene SL – IR foi possível a caracterização de todos os isolados como TCI. A padronização de metodologias com base em cepas padrão, mantidas em laboratório, pode não representar a diversidade gênica do parasito resultante de suas interações ecológicas com os diferentes hospedeiros, sejam reservatórios ou vetores, em ambiente silvestre.

Lewis e colaboradores (2009) recomendaram a utilização de pelo menos três marcadores para a caracterização confiável e rápida de DTU após estudo com cinco marcadores diferentes. Neste trabalho, também a análise combinada com a utilização de mais de um marcador gênico foi necessária para caracterização dos isolados (Martins et al, 2015).

O sequenciamento de DNA a partir de sequencias das regiões nuclear e mitocondrial, conforme realizado por Lima e colaboradores (2014) pode ser realizado para esses isolados silvestres permitindo não somente a caracterização como um estudo evolutivo das amostras analisadas quando em comparação com outros isolados silvestres.

O sudeste do Tocantins é reconhecido como uma região endêmica para a doença de Chagas com um número elevado de casos registrados. O encontro de *T. cruzi*, genótipo TCI neste trabalho corrobora outros achados, demonstrando a importância de um estudo que correlacione este perfil com os casos humanos da doença nesta região.

Estudos de modelagem de nicho ecológico evidenciam que *T. costalimai* é reconhecida como endêmica do Bioma Cerrado embora falte estudos que esclareçam o comportamento sinantrópico (Gurgel-Gonçalves et al. 2012).

Diante deste fato, a proximidade das habitações humanas com os afloramentos rochosos, característico da fitofisionomia presente no município de Aurora do Tocantins, reforçou a necessidade de capacitações sobre ações de vigilância e controle voltadas para ações integradas de educação em saúde, abrangendo setor da saúde, educação e comunidade. Esta atuação, em parceria com a Secretaria de Saúde do Estado e junto à sociedade como um todo, ressaltou a importância das medidas de prevenção bem como da preservação dos ecótopos naturais, visando diminuir o risco de dispersão dos triatomíneos, no caso de escassez de fontes alimentares, e o risco de contato do homem com o ciclo silvestre de *T. cruzi*.

As notificações de presença de *T. costalimai* infectados por *T. cruzi* no peridomicílio, encaminhadas para a Secretaria de Saúde do Tocantins, apresentadas neste estudo e publicadas em artigo científico demonstram o problema às autoridades públicas e comunidade científica, ressaltando o risco de transmissão vetorial da doença de Chagas para a população do município de Aurora do Tocantins – TO.

5.2 ESTUDOS MORFOLÓGICOS DAS ESTRUTURAS ASSOCIADAS A LOCOMOÇÃO DE ADULTOS

O dimorfismo alar de *T. jatai*, onde somente as fêmeas apresentam as asas curtas e os machos são macropteros com asas totalmente desenvolvidas, foi avaliado à luz de caracteres morfológicos externos e de apêndices locomotores em comparação com a espécie irmã *T. costalimai* e a espécie braquíptera *T. sherlocki* de modo a inferir sobre a capacidade de voo das fêmeas de *T. jatai*.

O polimorfismo das asas encontrado em *T. jatai*, tal como a braquipteria, também ocorre em outras espécies de triatomíneos como *Triatoma sherlocki* (Papa et al, 2002), *Mepraia spinolai* (Porter, 1933) e *Mepraia gajardoi* (Frias et al, 1998). Da mesma forma em outros grupos de insetos como dípteros e ortópteros, onde estudos comprovam que o encurtamento ou até mesmo a ausência das asas, e conseqüente menor atividade dispersiva, é compensado em outras funções fisiológicas principalmente relacionadas a reprodução com aumento do número de ovos para garantir a permanência da espécie frente às pressões adaptativas (Roff, 1977; 1984).

Embora os resultados tenham mostrado que as fêmeas de *T. jatai* apresentam semi-braquipteria quando comparadas a *T. sherlocki*, não apresentam tamanho das pernas aumentados ou menor tamanho de pronoto, o que poderia indicar atrofia dos músculos alares e incapacidade de voo conforme comprovado para *T. sherlocki* (Almeida et al, 2012), sendo as diferenças de tamanho visualizadas já esperadas e provavelmente relacionadas com ao comprimento total dos insetos.

Contudo, verificou-se que as fêmeas de *T. jatai* apresentaram maior comprimento total e do fêmur da perna 3 que poderia ser um indicio de adaptação a caminhada. Estudos multidisciplinares envolvendo a quantificação dos músculos alares e, principalmente, testes de voo devem ser feitos para complementar essas observações e se inferir sobre a forma de dispersão desta espécie, conforme já realizado para outras espécies de triatomíneos.

A dispersão de fêmeas de *T. infestans* por caminhada foi demonstrada por Abrahan e colaboradores (2011) que sugeriram que esta forma de locomoção poderia ser uma estratégia

adaptativa que permite que as fêmeas se desloquem ingurgitadas e com o ovário com ovos, ou seja, com maior peso corporal o que prejudicaria o voo, estas características também seriam favoráveis a colonização de um novo ecótopo.

A utilização complementar da morfometria geométrica de estruturas como cabeça e tórax poderiam também contribuir com as análises para inferir sobre a capacidade e atividade de voo de *T. jatai* e *T. costalimai*, assim como foi analisado para espécies por gênero *Mepraia* por Hernandez e colaboradores (2015).

Estudos mostram que alterações ecológicas nos ecótopos naturais onde os insetos se desenvolvem podem ocasionar variações comportamentais, fisiológicas e morfológicas que podem alterar a capacidade de dispersão limitando a seleção de um novo ecótopo (Bernard & Mc Cauley, 2008; Clobert et al, 2009; Dixon et al, 1993).

Também para os triatomíneos, estudos mostram que espécies com variações morfológicas consistentes surgiriam devido a adaptações aos fatores ecológicos onde a diferenciação morfológica poderia ser mais rápida que a instalação de barreiras genéticas ou reprodutivas (Dujardin et al, 1999).

Os espécimes de *T. jatai* utilizados neste estudo foram capturados em afloramentos rochosos nos municípios de Paranã-TO, onde o cenário é de intensas ações antrópicas sobre o ambiente como a fase de implantação e funcionamento de uma usina hidrelétrica, o desmatamento para a construção de reassentamento de populações humanas bem como para atividades de agropecuária que, juntamente com o clima inerente ao Cerrado, quente e seco com constantes queimadas, atuam diretamente sobre os ecótopos naturais dos triatomíneos e de suas fontes alimentares propiciando a dispersão dos insetos.

Neste sentido, pode-se sugerir que a característica de encurtamento das asas em fêmeas de *T. jatai* poderia estar associada a um processo evolutivo adaptativo diante das pressões ambientais e antrópicas sobre seus ecótopos naturais, contudo outras abordagens além da morfologia devem ser realizadas para o conhecimento da história evolutiva desta espécie.

O primeiro encontro de *T. jatai* fora de seu ecótopo natural foi feito em 2011, quando dois espécimes fêmea e um macho foram capturados no domicílio em uma fazenda no município de Paranã - TO, entretanto não foi feito um estudo sobre os fatores que possam ter influenciado a chegada destes insetos no domicílio, assim como não foram registrados sinais de colonização (Gonçalves et al, 2013; Brito et al, 2017b).

A dispersão por caminhada ou de forma passiva por animais domésticos que tenham explorado os afloramentos rochosos pode ser uma forma esperada para as fêmeas de *T. jatai*, por conta da característica das asas, contudo não necessariamente significaria sua incapacidade de voo.

A espécie *T. costalimai* ocorre em simpatria com a espécie *T. jatai* no município de Paranã, localizado ao Sul do estado do Tocantins, em afloramentos rochosos no ambiente silvestre, assim como no município de Aurora do Tocantins, Sudeste do estado, onde os afloramentos são encontrados também no peridomicílio nos quais se detectou foco de infecção por *T. cruzi*. Em ambos os casos, diante das alterações ambientais sobre os ecótopos naturais, a chegada ao domicílio, seja pelo voo ou caminhada poderia estar sendo induzida por atração pela fonte luminosa ou em busca de fontes alimentares conforme já demonstrado para outras espécies (Carbajal de la Fuente et al, 2007).

O estudo de fenótipo antenal ajudaria a entender os ecótopos onde estes insetos estariam explorando sendo mais uma inferência sobre a dispersão dos insetos, conforme estudos realizados para outras espécies como as do gênero *Mepraia* (Moreno et al, 2006; Hernandez et al, 2008, 2015).

Os estudos de dispersão sobre as espécies *T. jatai* e *T. costalimai* certamente irão gerar dados que servirão de suporte para elaboração de ações de vigilância entomológica

visando-se o controle da chegada dos insetos ao domicílio e diminuindo-se os riscos de transmissão vetorial da doença de Chagas.

5.3 CICLO DE DESENVOLVIMENTO BIOLÓGICO DE *T. jatai* E *T. costalimai*

O estudo das características bionômicas dos triatomíneos em condições laboratoriais permite inferir sobre a sua capacidade de adaptação e colonização em ambientes artificiais como o domicílio. Contudo, muitas vezes as diferenças nas condições ambientais de temperatura e umidade, bem como da fonte alimentar utilizadas dificulta a interpretação e comparação com os trabalhos já realizados para mesmas espécies.

No presente estudo são apresentadas as primeiras observações sobre o ciclo de desenvolvimento dos estádios ninfais da espécie *T. jatai*, como parâmetro de comparação nos baseamos na espécie irmã *T. costalimai*, em condições ambientais artificiais.

Para *T. jatai*, foi observado um tempo total de ovo a N5 menor que o da espécie irmã *T. costalimai*, cujas ninfas N4 apresentaram um tempo mediano significativamente maior.

Schofield e colaboradores (1980) também relataram um desenvolvimento lento de *T. costalimai* em condições laboratoriais, no qual em 603 dias após a postura dos ovos as ninfas tinham alcançado apenas o quinto estágio, e que a experiência não havia terminado devido a um ataque de formigas que mataram todas as ninfas. Contudo, embora tenham utilizado uma variação de temperatura e umidade aproximadas ($27^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$), umidade relativa entre 40-80%), a fonte alimentar foi galinha e não camundongo. Naquele momento, mediante os resultados obtidos, os autores concluíram que *T. costalimai* não representava uma ameaça para colonizar o ambiente doméstico ou peridoméstico e para atuar na transmissão vetorial da doença de Chagas.

Em contrapartida, Isac e colaboradores (2000) em estudo do ciclo biológico de *T. costalimai* observaram um tempo de desenvolvimento ninfal menor (115,1 para fêmeas e 117,5 para machos) que o observado neste trabalho para ambas espécies de estudo. Este utilizou condições de temperatura e umidade controladas em uma câmara incubadora a 28°C , umidade relativa de $70\pm 5\%$ e fotoperíodo 12 horas, o que pode sugerir que a espécie se desenvolve melhor em condições ambientais controladas com maiores temperatura e umidade, uma vez que o presente experimento foi realizado em temperatura e umidade relativa menores (temperatura e umidade médias de $25,1^{\circ}\text{C}$, 61%UR).

A espécie rupestre *T. brasiliensis*, que também tem sido registrada no estado do Tocantins, foi estudada por Silva (1990) que observou o ciclo de desenvolvimento biológico sob condições de laboratório nas temperaturas de 25°C e 30°C e verificou que este é mais lento a 25°C , temperatura limite inferior a que foi utilizada, apresentando menor fecundidade e fertilidade média. Da mesma forma, Heitzmann – Fontenelle (1983/1984) relatou um ciclo longo desta espécie quando criada em temperatura que oscila durante o ano entre 18°C e 26°C (temperatura ambiente do laboratório situado em São Paulo).

Neste trabalho, a comparação do ciclo de ovo a adulto entre *T. jatai* e *T. costalimai* ainda não foi possível, uma vez que as ninfas de quinto estágio de *T. costalimai* estão apresentando um longo tempo de desenvolvimento com taxa de mortalidade atingindo 39,13% até maio de 2018.

Oscherov e colaboradores (1996), em estudo bionômico de *T. sordida* também observaram maior mortalidade no quarto e quinto estágio, assim como Galvão e colaboradores (1995) para a espécie *Triatoma nitida* Usinger, 1939, que dentre os espécimes observados obtiveram cerca de 30% de mortalidade, e Barreto e colaboradores (1981) para *D. maxima*.

Durante o quinto estágio, ocorre o desenvolvimento de estruturas reprodutivas e de locomoção como as asas para o inseto adulto, o que requer um dispêndio de energia e de nutrientes que integram a composição bioquímica. Possivelmente estas necessidades não estão sendo supridas mediante as condições ambientais e de alimentação adotadas neste experimento.

O tempo de desenvolvimento de ovo ao quinto estágio obtido para *T. jatai* (mediana de 503 dias) corrobora com o observado para as espécies *T. williami* (501 dias para machos e 619 dias para fêmeas) e *T. jubergeri* (período ninfal médio de 567 dias a temperatura de 25°C com alimentação em galinha). Estas espécies de ocorrência no Bioma Cerrado e maior proximidade genética das espécies de estudo também apresentaram ciclo de vida longo.

No entanto, para a espécie *T. pseudomaculata*, menor tempo de desenvolvimento (mediana de 232 dias) foi descrito em laboratório, também com alimentação em camundongos (Carbajal de la Fuente, 2010). Este ciclo mais rápido observado para *T. pseudomaculata*, também já descrito para as espécies *T. sordida* e *T. brasiliensis*, que como esta já foram encontradas colonizando o domicílio nos estados com bioma Cerrado, pode ser mais favorável diminuindo os riscos de exposição a predadores e quem sabe uma capacidade de adaptação maior a ambientes artificiais.

Nos municípios onde os insetos foram capturados, Paranã e Aurora do Tocantins, as temperaturas médias oscilam em torno de 26° a 27°C, com épocas mais quentes. No presente estudo, no ambiente de laboratório, as temperaturas foram mais baixas o que pode justificar o desenvolvimento lento dos espécimes, caracterizando uma condição negativa, limítrofe dentro da valência ecológica das espécies observadas.

Os resultados obtidos discordaram daqueles de Isac et al (2000) uma vez que o desenvolvimento de ambas as ninfas foi realizado em maior número de dias requerendo inclusive em alguns estágios, um número maior de repastos para realizar a muda, o que, juntamente com as condições ambientais utilizadas, pode ter favorecido o lento desenvolvimento destas espécies no laboratório. O conhecimento de suas fontes alimentares naturais, poderia ajudar no estudo biológico destas espécies, melhorando as condições para desenvolvimento em ambiente artificial.

Segundo Guarneri (2008), os parâmetros climáticos de maior influência na fisiologia de um pequeno animal terrestre são a temperatura e umidade relativa, uma vez que influenciam no organismo como um todo, e os insetos são vulneráveis devido ao tamanho pequeno e proporcionalmente maior superfície corporal. Além destes fatores, no ambiente silvestre, a habilidade em explorar novos habitats permite que os insetos escapem de condições ambientais extremas refugiando-se em micro nichos que reuniram condições mais favoráveis, o que não é possível em condições experimentais.

As ações antrópicas e as queimadas naturais que atuam constantemente sobre a fitofisionomia do bioma Cerrado, propiciam a fuga da fauna dos hospedeiros do ecótopo natural e como consequência a dispersão dos triatomíneos em busca de novas fontes alimentares (Diotaiuti, 2008). Este comportamento pode levar a aproximação do peri e

intradomicílio e a domiciliação (Aragão 1983), ou ser resultante de uma adaptação que se dá gradualmente conforme consideraram Forattini (1980) e Pessoa (1962).

A chegada e o sucesso na adaptação dos triatomíneos aos ambientes de peri e intradomicílio pode ser uma consequência da busca por novas fontes alimentares muitas vezes diferentes das encontradas no ambiente silvestre e, no caso dos triatomíneos naturalmente infectados pelo parasito *Trypanosoma cruzi* constituem um fator de risco para a transmissão vetorial deste parasito ao homem podendo-se formar um novo foco da doença de Chagas.

Em ambiente artificial, a garantia da fonte alimentar, não condiz com as condições naturais. Entretanto, os experimentos permitem verificar a capacidade de adaptação e desenvolvimento em hospedeiros geralmente disponíveis no peri e intradomicílio, aves ou mamíferos.

Estudos demonstraram que a quantidade e fonte alimentar podem alterar significativamente o tempo de desenvolvimento, a fecundidade e a capacidade de dispersão dos insetos (Ekkens, 1981; Lehane & Schofield, 1981/1982).

Considerando-se que os ovos utilizados neste estudo são provenientes de fêmeas silvestres de ambas as espécies, o componente genético é original, ou seja, representando sua valência ecológica, e sem influência de endogamia. Desta forma, quanto ao aspecto temperatura, estima-se que *T. costalimai* seja mais exigente do que *T. jatai*, cujo ciclo foi realizado em tempo menor alcançando inclusive a forma adulta.

Embora as condições abióticas determinadas neste experimento possam ter influenciado no desenvolvimento das formas jovens, principalmente para *T. costalimai*, vale ressaltar que no ambiente natural do cerrado, o desenvolvimento dos insetos pode ser influenciado também por fatores bióticos, como a diversidade da fauna que disponibiliza aos triatomíneos várias alternativas alimentares bem como de adaptação aos seus abrigos (Diotaiuti, 2008).

Neste trabalho, optou-se pela alimentação em camundongos utilizada por Isac et al (2000), que obteve um rápido desenvolvimento de *T. costalimai* em laboratório.

O tempo de desenvolvimento obtido para as ninfas de *T. jatai* e *T. costalimai* em condições artificiais, sugerem que a fonte alimentar utilizada, roedor, não foi adequada, reforçada pela necessidade de um número maior de repastos. Entretanto, no ambiente natural os espécimes foram capturados em afloramentos rochosos onde foi possível observar a presença de lacertídeos e roedores. Isso demonstra a possível ocorrência de uma alternância de fonte alimentar sugerindo a importância do ecletismo alimentar no seu desenvolvimento. Desta forma, em se tratando de espécies silvestres o fator ambiente pode ter contribuído de forma mais efetiva para este resultado (Diotaiuti, 2008).

A espécie rupestre *T. williami*, que é autóctone do Cerrado, já foi encontrada em peridomicílio rural (Galvão et al, 1965), assim como adultos já foram eventualmente observados no intradomicílio e peridomicílio em áreas urbanas naturalmente infectados por *T. cruzi* (Arrais-Silva et al, 2011). Em condições de laboratório Lunardi e colaboradores (2015) não observaram diferença significativa no tempo do ciclo de vida entre espécimes alimentados em codornas ou camundongos, porém verificaram que as ninfas de primeiro, terceiro e quarto estádios precisaram de menor quantidade de repastos para a muda quando alimentadas em camundongos que em codornas.

Já a espécie *T. pseudomaculata* também apresentou desenvolvimento mais rápido com alimentação em camundongos, média de 233 dias (Guarneri et al, 2000; Carbaja de la Fuente, 2010), que em aves, média de 331 dias (Gonçalves et al, 1997).

Da mesma forma, o melhor desenvolvimento de triatomíneos quando alimentados em camundongos que em pombos foi relatado para outras espécies *D. maximus* (Costa et al, 1986;1987), *R. neglectus* (Diotaiuti e Dias, 1987), *Cavernicola lenti* Barrett & Arias, 1985 (Costa e Jurberg, 1990). Contudo, embora a fonte alimentar seja a mesma, uma melhor comparação exige a realização do estudo sob as mesmas condições ambientais.

A verificação de um número elevado de repastos para os estádios ninfais de *T. jatai* e *T. costalimai* condiz com seu longo tempo de desenvolvimento quando alimentados em camundongos, sugerindo mais contatos com os hospedeiros aumentando a possibilidade de infecção ou transmissão do parasito *T. cruzi* (Juarez, 1970). Contudo, em condições naturais isso aumentaria também a exposição do triatomíneo à riscos.

O estudo da quantificação do volume de sangue ingerido permitiria uma avaliação mais precisa da eficiência do método de alimentação e aceitação da fonte alimentar utilizada.

Outro aspecto a ser considerado neste trabalho é que os espécimes de estudo foram criados individualmente, de modo a permitir a observação detalhada de quantidade de dias e alimentações para muda em cada estágio. Embora este fator seja pouco abordado em estudos bionômicos, deve-se considerar a possibilidade de efeitos negativos causados pelo manuseio excessivo e confinamento dos insetos. Tolezano e colaboradores (1984) atribuíram ao excesso de manuseio o aumento da mortalidade e a diminuição da fertilidade de *T. infestans* assim como Costa e Jurberg (1990) recomendaram cautela na aceitação dos resultados obtidos em criações individuais de *C. lenti* devido aos danos que podem ser causados pelo manuseio dos insetos.

Nos últimos quatro anos, as colônias de *T. jatai*, mantidas nas mesmas condições ambientais e com alimentação em camundongo, mostram desenvolvimento mais rápido e com menor taxa de mortalidade dos insetos. Contudo, para colônias de *T. costalimai* observa-se um desenvolvimento lento, assim como neste experimento, com elevado número de mortes no quinto estágio e poucas ninfas chegando a adultos, sugerindo que adequações das condições ambientais como temperatura e umidade, ou fonte alimentar, poderiam permitir melhor desenvolvimento destas espécies em ambiente artificial.

5.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *T. JATAI* COM OUTRAS ESPÉCIES DA AMÉRICA DO SUL

Neste trabalho, a análise de genes mitocondriais permitiu a diferenciação entre as espécies *T. jatai* e *T. costalimai*, mesmo com alta proximidade genética, caracterizando-as como espécies irmãs, assim como confirmou o status específico de *T. jatai*. Estes resultados corroboram com as análises morfológicas e morfométricas que permitiram a descrição e definição específica de *T. jatai*, assim como sugerem a importância de uma abordagem multidisciplinar nos estudos taxonômicos de triatomíneos (Teves-Neves, 2012; Gonçalves et al, 2013).

A análise das relações evolutivas entre as espécies, assim como a utilização da sistemática molecular na identificação correta das espécies de triatomíneos, são importantes para o entendimento do papel destes insetos como vetores da doença de Chagas, e pode

fornecer subsídios aos programas de vigilância entomológica (Hypsa et al, 2002; Abad-Franch & Monteiro, 2005; Gardim et al, 2014; Justi et al, 2014).

Contudo, deve-se considerar que, a condição genética e fenotípica num determinado espaço de tempo, está relacionada as suas condições ecológicas, seja os fatores bióticos e abióticos naturais, assim como as ações antrópicas sobre o ambiente e, no caso de insetos vetores, os ecótopos em que podem ser encontrados, bem como o tratamento com inseticidas. Estes fatores podem ser determinantes na plasticidade genética e fenotípica dos triatomíneos.

Dujardin e colaboradores (1999) discutem a relação entre as características morfológicas, genéticas e os fatores ecológicos dentro de uma mesma espécie, com o exemplo da espécie *Triatoma sordida*, e entre espécies próximas de triatomíneos, assim como a estreita relação entre morfologia, ecologia e a rápida evolução em triatomíneos, demonstrando que a especiação em Triatominae pode ser um processo rápido impulsionado principalmente por fatores ecológicos.

No caso das espécies *T. costalimai* e *T. jatai*, a análise filogenética com base em marcadores mitocondriais apresentada neste trabalho pode auxiliar os programas de vigilância entomológica na confirmação taxonômica de espécimes capturados na região, uma vez que análises permitiram diferenciar as espécies, utilizando-se espécimes silvestres capturados nos municípios de Paranã - TO (localidade tipo de *T. jatai*) e Aurora do Tocantins – TO devidamente identificados de acordo com os caracteres morfológicos definidos por Lent & Wygodzinsky (1979) e Gonçalves et al (2013).

As regiões do genoma que apresentam evolução rápida, como é o caso de regiões do genoma mitocondrial, que apresenta uma taxa de evolução que pode ser até 10 vezes mais rápida que a do genoma nuclear por não possuir um mecanismo de reparo do DNA eficiente, são sugeridas para a comparação de espécies próximas de triatomíneos (Abad-Franch & Monteiro, 2005; Pavan & Monteiro, 2015).

Assim como neste trabalho, o estudo taxonômico com base em marcadores mitocondriais também foi eficiente na comparação entre outras espécies próximas de triatomíneos como: *T. melanosoma* e *T. infestans*, neste caso confirmando se tratar de uma mesma espécie (Monteiro et al, 1999); Espécies do subcomplexo Brasiliensis, com a definição, em conjunto com a caracterização morfológica e morfométrica, de quatro espécies distintas a partir da espécie *Triatoma brasiliensis* (Monteiro et al, 2004); *T. sherlocki* e *T. melanica* demonstrando a proximidade genética entre elas (Mendonça et al, 2009); *T. carcavalloi* e *T. rubrovaria* (Almeida et al, 2009); *R. montenegrensis* e *R. robustus*, com a definição específica de *R. montenegrensis* (Rosa et al, 2012); *R. barretti* e *R. robustus*, com a definição específica de *R. barretti* (Abad-Franch et al, 2013); E, mais recentemente, *R. marabaensis* e *R. prolixus*, permitindo a definição específica de *R. marabaensis* (Souza et al, 2016).

No entanto, Mas-Coma e Bargues (2009) discutiram as limitações da análise filogenética com base em genes mitocondriais de triatomíneos para inferências sobre táxons intimamente relacionados, particularmente quando se lida com genes simpátricos ou espécie parapática sem uma barreira de isolamento definida. Essas limitações estão relacionadas principalmente a possibilidade de introgressão do material genético mitocondrial de uma espécie em outra por conta de cruzamentos interespecíficos e possibilidade de fluxo gênico, assim como pela presença no genoma nuclear de pseudogenes mitocondriais que podem levar a identificações errôneas das espécies. Estas limitações sugerem a utilização de marcadores

nucleares como análises complementares no estudo da história evolutiva de *T. jatai* e *T. costalimai*, uma vez que, embora os marcadores mitocondriais tenham sido eficientes na diferenciação entre as espécies, estas podem ocorrer em simpatria no município de Paranã-TO.

Entretanto, é importante considerar que foi observado um alto número de mutações que *T. jatai* acumulou em relação a *T. costalimai*, o que sugere uma separação a longo prazo, maior que as do complexo Infestans. Além disso, a distância genética observada entre as espécies de estudo foi maior que a observada na comparação entre as espécies do subcomplexo Rubrovaria (*T. rubrovaria*, *T. circummaculata* e *T. carcavalloi*) e Infestans (*T. infestans*, *Triatoma platensis* e *Triatoma delpontei*).

Na ocasião da descrição morfológica de *T. jatai*, foi sugerida a inclusão desta espécie no subcomplexo Matogrossensis (Schofield & Galvão, 2009), com base nos caracteres morfológicos e geográficos, tendo sido apresentada uma nova chave dicotômica para este subcomplexo, de modo a contribuir para a correta identificação das espécies (Gonçalves et al, 2013).

A relação filogenética de *T. costalimai* com as espécies do subcomplexo Matogrossensis observada neste trabalho corrobora com estudos previamente realizados por análise de genes mitocondriais. Hypsa e colaboradores (2002) em análise de gene 16S verificou que *T. costalimai* apresentou alta distância genética em relação as espécies dos subcomplexos Matogrossensis, Sordida e Pseudomaculata, apresentando-se como grupo externo. Da mesma forma Gardim e colaboradores (2013) observaram as mesmas relações filogenéticas de *T. costalimai* em relação aos demais.

O presente trabalho mostrou também a não-monofilia do subcomplexo Matogrossensis, com a relação entre *T. matogrossensis* e *T. vandae* com espécies do subcomplexo Sordida (*T. sordida*), e das espécies *T. williami* e *T. guazu* com espécies do complexo *T. rubrovaria* (*T. rubrovaria*, *T. carcavalloi*), conforme já observados em estudos anteriores com base em análise de genoma mitocondrial (Hypsa et al, 2002; Gardim et al, 2013, 2014; Justi et al, 2014).

Alevi e colaboradores (2015) também observaram a aproximação de espécies do subcomplexo de Matogrossensis com espécies do subcomplexo Rubrovaria a partir de características citogenéticas.

Os resultados aqui apresentados constituem a primeira inferência filogenética de *T. jatai* em relação a espécie próxima *T. costalimai* e outras espécies do subcomplexo Matogrossensis e da América do Sul. Contudo, Pita e colaboradores (2016), a partir de análises de posição cromossômica de genes ribossômicos, redefiniu o subcomplexo Matogrossensis com a divisão em dois gupos, um já incluindo *T. jatai* no mesmo grupo que *T. costalimai*, *T. guazu* e *T. williami*, sendo a característica compartilhada a presença de genes ribossômicos em um par autossômico, que formam um novo subcomplexo e outro grupo contendo as espécies *T. jurbergi*, *T. matogrossensis* e *T. vandae*, que seria incluído no complexo Sordida cujas espécies apresentam genes ribossômicos em ambos cromossomos sexuais. Além disso, reagrupou as espécies do subcomplexo Sordida e Maculata, sugerindo Pseudomaculata ou Arthurneivai, considerando características genéticas e de acordo com análises filogenéticas anteriores.

Monteiro e colaboradores (2018) reagrupou as espécies e complexos de triatomíneos com base em caracteres moleculares e no conceito filogenético de espécie. Neste novo

agrupamento, *T. jatai* e *T. costalimai* não foram incluídos nos complexos formados sendo sugerida a necessidade de mais estudos. Os resultados deste trabalho, em consonância com outros, e de acordo com essa dificuldade de agrupamento, sugerem a definição de um novo complexo para *T. costalimai* e *T. jatai*.

O conhecimento da história evolutiva das espécies de triatomíneos é de suma importância no entendimento da origem e desenvolvimento de suas características fenotípicas e, no caso de estudos taxonômicos, pode auxiliar na visualização dos processos de especiação existentes.

Contudo, o agrupamento das espécies de triatomíneos em complexos específicos, embora possa facilitar na identificação taxonômica e servir como auxílio para os programas de vigilância entomológica, deve ser limitado a abordagem metodológica utilizada, considerando-se principalmente a plasticidade fenotípica e genotípica destes insetos mediante as suas condições ecológicas, evitando-se assim agrupamentos artificiais que não considerem a espécie na sua totalidade.

Neste sentido embora os estudos filogenéticos sejam importantes e, no caso deste trabalho, tenham auxiliado na definição específica de *T. jatai* e sua relação com a espécie próxima *T. costalimai*, é de suma importância que ocorram em paralelo a caracterização morfológica e ecológica dos espécimes, o que permite evitar erros conceituais de classificação, bem como gerar dados que possam ser utilizados pelos programas de vigilância entomológica e controle da doença de Chagas, que, no Brasil, utilizam primariamente os caracteres morfológicos para a identificação taxonômica dos triatomíneos.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A espécie *T. costalimai* participa do ciclo silvestre do *T. cruzi* DTU I em afloramentos rochosos e pode vir a introduzir este ciclo no ambiente domiciliar no município de Aurora do Tocantins –TO devido à proximidade das rochas com as habitações;
- ✓ Ações de vigilância entomológica, voltadas para o controle da dispersão de triatomíneos, como das espécies *T. jatai* e *T. costalimai*, devem ser constantes nos municípios de Paranã- TO e Aurora do Tocantins – TO, principalmente se considerando as ações antrópicas sobre o ambiente e características pertinentes ao bioma Cerrado;
- ✓ O potencial de dispersão pelo voo de *T. jatai* não pode ser determinado somente pelo estudo morfométrico de estruturas corporais e dos apêndices locomotores em comparação com as espécies *T. sherlocki* e *T. costalimai*;
- ✓ A espécie *T. jatai* necessita de cerca de um ano e três meses para completar o ciclo de ovo até adulto em condições artificiais;
- ✓ As ninfas de quinto estágio de *T. costalimai* apresentam dificuldade de se desenvolver e são mais vulneráveis a morte quando em condições ambientais artificiais;
- ✓ A análise filogenética de genes mitocondriais permite a diferenciação das espécies próximas *T. jatai* e *T. costalimai* com alto grau de proximidade genética;
- ✓ É proposto um novo complexo específico *T. costalimai* pode ser definido para *T. costalimai* e *T. jatai* de acordo com as análises filogenéticas obtidas, quando analisadas em conjunto com estudos filogenéticos anteriores e de acordo com a nova classificação com base em caracteres filogeográficos.

7. RECOMENDAÇÕES DE PESQUISA

De acordo com a experiência obtida durante a elaboração desta tese de doutorado, têm-se como recomendações de pesquisa para ampliar o conhecimento sobre as espécies de triatomíneos trabalhadas, os seguintes tópicos (alguns já em andamento):

- ✓ Dar continuidade as observações do tempo de desenvolvimento, número de repastos, quantidade de sangue ingerido e mortalidade dos espécimes de *T. jatai* e *T. costalimai* nas condições ambientais descritas;
- ✓ Avaliar a oviposição e fertilidade das fêmeas de *T. jatai* e *T. costalimai* provenientes dos experimentos de bionomia deste trabalho;
- ✓ Relacionar os resultados obtidos com a quantificação de músculo alar e testes de voo para as espécies *T. jatai* e *T. costalimai*;
- ✓ Estudar o fenótipo antenal de espécimes de *T. jatai* e *T. costalimai*;
- ✓ Realizar o sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares dos isolados de *T. cruzi* e estudar as relações filogenéticas com outros obtidos no bioma Cerrado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F.A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, p. 437-454, 2005.
- 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. I, p. 92-99, 2013.
- ABRAHAN, L.B.; GORLA, D.E.; CATALÁ, S. Dispersal of *Triatoma infestans* and other triatominae species in the arid chaco of Argentina-Fly in walking or passive carriage? The importance of walking females. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 2, p. 232-239, 2011.
- ALDANA, E.; LIZANO, E.; CONTREAS, F.; VALDERRAMA, A.; VIEIRA, D. Estudio morfológico de estádios ninfales de várias espécies del gênero *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae). *Caldasia*, v. 22, p. 347-351, 2000.
- ALEVI, K.C.; OLIVEIRA, J.; MOREIRA, F.F.; JURBERG, J.; ROSA, J.A.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T. Chromosomal characteristics and distribution of constitutive heterochromatin in the Matogrossensis and Rubrovaria subcomplexes. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 33, p. 158-162, 2015.
- ALMEIDA, C.E.; VINHAES, M.C.; ALMEIDA, J.R.; SILVEIRA, A.C.; COSTA, J. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p.761-768, 2000.
- ALMEIDA, C.E.; DUARTE, R.; NASCIMENTO, R.G.; PACHECO, R.S.; COSTA J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 1127-1131, 2002.
- ALMEIDA, C.E.; MARCET, P.L.; GUMIEL, M.; TAKIYA, D.M.; CARDOZO-DE-ALMEIDA, M.; PACHECO, R.S.; LOPES, C.M.; DOTSON, E.M.; COSTA, J. Phylogenetic and Phenotypic Relationships Among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and Related Species Collected in Domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Journal of Vector Ecology*, v. 34, n. 2, p. 164-73, 2009.
- ALMEIDA, C. E.; OLIVEIRA, H.L.; CORREIA, N.; DORNAK, L.L.; GUMIEL, M.; NEIVA, V.L.; HARRY, M.; MENDONÇA, V.J.; COSTA, J.; GALVÃO, C. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Tropica* v. 122, p. 71-79, 2012.
- ALMEIDA, C.E.; LIMA, M.M.; COSTA J. Ecologia dos Vetores. In: *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. Série Zoológica: Guias e Manuais de Identificação. Curitiba, p. 220-235, 2015.
- ARAGÃO, M. B.. Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia? *Revista de Saúde Pública*, v. 17, n. 1, p. 51-55, 1983.

- ARGOLO, A.M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008.
- ARRAIS-SILVA, W.W.; SENATORE, R.; RODRIGUES, V.; MORAES, L.N.; VENERE, P.C.; LUNARDI, R.R.; SOUZA, I.L.; SOUTO, P.C.S. First report of occurrence of *Triatoma williami* Galvão, Souza e Lima, 1965 naturally infected with *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 in the State of Mato Grosso, Brazil. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.1, n.3, p. 245-246, 2011.
- AVILA H.; GONÇALVES, A.M.; NEHME, N.S.; MOREL, C.M.; SIMPSON, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 42, p. 175-188, 1990.
- BARATA, J.M.S. Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs. In: Carcavallo, R.U.; Girón, I.G.; Jurberg, J.; Lent, H. *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 409-514, 1998.
- BAHRNDORFF, S.; HOLMSTRUP, M.; PETERSEN, H.; LOESCHCKE, V. Geographic variation for climatic stress resistance traits in the springtail *Orchesella cincta*. *Journal of Insect Physiology*, v. 52, p. 951-959, 2006.
- 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, n. 4, p. 567-573, 2000.
- BARNABÉ C, BRISSE S, TIBAYRENC M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*, v. 7, n. 120, p. 513-26, 2000.
- BARNABÉ, C.; MOBAREC, H.I.; JURADO, M.R.; CORTEZ, J.A.; BRENIÈRE, S.F. Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 39, p. 176-186, 2016.
- BARRETO, A.C.; PRATA, A.B.; MARSDEN, P.D.; CUBA, C.C.; TRIGUEIRA, C. P. Aspectos biológicos e criação em massa de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Triatominae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 23, n. 1, p. 18-27, 1981.
- BARRETT, T.B.; HOFF, R.H.; MOTT, K.E.; MILES, M.A.; GODFREY, D.G.; TEIXEIRA, R.; ALMEIDA DE SOUZA, J.A.; SCHERLOCK, I.A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* v. 74, p. 84-90, 1980.
- BARROS, J.H.S.; XAVIER, S.C.C.; BILAC, D.; LIMA, V.S.; DARIO, M.A.; JANSEN, A.M. Identification of novel mammalian hosts and Brazilian biome geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* TcIII and TcIV. *Acta Tropica*, 172, p. 173-179, 2017.
- BELINTANI, T. *Filogenia do subcomplexo Triatoma sordida (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), por meio de estudos morfológicos, morfométricos e moleculares*. Dissertação - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo, 2016.

- BERNARD, M.F.; MCCAULEY, S.J. Integrating across life-history stages: consequences of natal habitat effects on dispersal. *The American Naturalist*, v. 171, p. 553-567, 2008.
- BOGLIOLO, A.R.; CHIARI, E.; SILVA PEREIRA, R.O.; SILVA PEREIRA, A.A. A comparative study of *Trypanosoma cruzi* enzyme polymorphism in South America. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v. 19, p. 673-683, 1986.
- BRANDÃO, A. The untranslated regions of genes from *Trypanosoma cruzi*: perspectives for functional characterization of strains and isolates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 7, p. 775-777, 2006.
- BRAENDLE, C.; DAVIS, G.K.; BRISSON, J.A.; STERN, D.L. Wing dimorphism in aphids. *Nature*, v. 97, p. 192-199, 2006.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 5, n. 5, p. 220-224, 1963.
- BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Instituto Nacional de Endemias Rurais*, Belo Horizonte, p. 19-26, 1964.
- BRENER, Z. Comparative studies of diferente strains of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 59, n. 1, p. 19-26, 1965.
- BRENER, Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 13, p. 171-78, 1971.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, v. 27, p. 347-82, 1973.
- BRENIÈRE, S.F.; WALECKX, E; BARNABÉ C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10. n. 8, p. 1-19, 2016.
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J.C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 111, n. 1, p. 95-105, 2000.
- BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*, v.31, n. 11, p. 1218-1226, 2001.
- BRITO, R. N.; DIOTAIUTI, L.; GOMES, A. C.F.; SOUZA R.C.M.; ABAD-FRANCH, F. *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae) in and Around Houses of Tocantins State, Brazil, 2005-2014. *Journal of Medical Entomology*, v.7, n. 6, p. 1771-1774, 2017a.
- BRITO, R.N.; GORLA, D.E.; DIOTAIUTI, L.; GOMES, A.C.F.; SOUZA, R.C.M.; ABAD-FRANCH, F. Drivers of house invasion by sylvatic Chagas disease vectors in the Amazon-Cerrado transition: A multi-year, state-wide assessment of municipality-aggregated surveillance data. *PLOS Neglected Tropical Disease*, v. 11, n. 11, 2017b.
- BURGOS, J. M.; ALTCHER, J.; BISIO, M.; DUFFY, T.; VALADARES, H. M. S.; PICCINALI, R.; FREITAS, J. M.; LEVIN, M. J.; MACEDO, A. M.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A. G. Direct molecular characterization of bloodstream parasite populations

- causing Congenital Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, v. 37, n.12, p. 1319-1327, 2007.
- CARBAJAL DE LA FUENTE, A.L.; MINOLI, S.A.; LOPES, A.M.; NOIREAU, F.; LAZZARI, C.R.; LORENZO, M.G. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Tropica*, v. 101, p. 115-119. 2007.
- CARBAJAL DE LA FUENTE, A.L.; CUNHA, V.; ROCHA, N.; LOPES, C.M.; NOIREAU, F. Comparative biology of the two sister species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 1, p. 15-18, 2010.
- CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H. Phylogeny of the Triatominae. In: CARCAVALLO, R.U.; GIRÓN, I.G.; JURBERG, J.; LENT, H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 925-69, 1999.
- CARRENO, H.; ROJAS, C.; AGUILERA, X.; APT, W.; MILES, M.A.; SOLARI, A. Schizodeme analyses of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from Chile. *Experimental Parasitology*, v. 64, n. 2, p. 252-60, 1987.
- CARVALHO, T.U. Estudo microscopia ótica. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>. Último acesso em Outubro de 2018.
- CATALÁ, S.; SCHOFIELD, C. J. The antennal sensilla of *Rhodnius*. *Journal of Morphology*, v.219, p. 193-203, 1994.
- CATALÁ, S. Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a comparative study over five genera. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, v. 26, n.2, p. 67-73, 1997.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sôbre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.1, p. 159-218, 1909.
- CHAGAS, C. Sobre um Trypanosoma do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculata* Latr (1811). Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. Nota prévia. *Brazil Médico*, v. 26, p. 305-06, 1912.
- CLAYTON, C. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal*, v. 21, p. 1881-1888, 2002.
- CLOBERT, J.; LE GALLIARD, J.F.; COTE, J.; MEYLAN, S.; MASSOT, M. Informed dispersal, heterogeneity in animal dispersal syndromes and the dynamics of spatially structured populations. *Ecology Letters*, v. 12, p. 197-209, 2009.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *T. cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.6, p.93-100, 1964.
- COMINETTI, M.C.; CSORDAS, B.G.; CUNHA, R.C.; ANDREOTTI, R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 6, p. 747-755, 2014.

- COSTA, J.M.; JURBERG, J.; ALMEIDA, J.R. Estudos bionômicos de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Hemiptera, Triatominae) I. influência da dieta sobre ritmo de postura, viabilidade dos ovos, curva de fertilidade e mortalidade das fêmeas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 4, p. 365-380, 1986.
- COSTA, J.M.; JURBERG, J.; ALMEIDA, J.R. Bionomic studies of *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Hemiptera: Triatominae): II. Influence of diet on the biological cycle and resistance to fast. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 82, n. 1, p.111-118, 1987.
- COSTA, J.M.; JURBERG, J. Estudos bionomicos de *Cavernicola lenti* Barrett & Arias, 1985 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 85, n. 3, p. 357-366, 1990.
- COSTA, J.; MARCHON-SILVA, V. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y vectores*, v. 5, n. 1, p. 23-34, 1998.
- COSTA, J.; CORREIA, N.C.; NEIVA V.L.; GONÇALVES, T.C.M.; FÉLIX, M. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 108, n. 6, p. 785-789, 2013.
- COURA, J.R.; DIAS, J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, sup. 1, p. 31-40, 2009.
- CROCCO, L.B.; CATALÁ, S.S. Feeding and defaecation patterns in *Triatoma sordida*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 4, p. 409-413, 1996.
- CURA, C.I.; DUFFY, T.; LUCERO, R.H.; BISIO, M.; PÉNEAU, J.; JIMENEZ-COELLO, M.; CALABUIG, E.; GIMENEZ, M.J.; VALENCIA AYALA, E.; KJOS, S.A.; SANTALLA, J.; MAHANEY, S.M.; CAYO, N.M.; NAGEL, C.; BARCÁN, L.; MÁLAGA MACHACA, E.S.; ACOSTA VIANA, K.Y.; BRUTUS, L.; OCAMPO, S.B.; AZNAR, C.; CUBA CUBA, C.A.; GÜRTLER, R.E.; RAMSEY, J.M.; RIBEIRO, I.; VANDEBERG, J.L.; YADON, Z.E.; OSUNA, A.; SCHIJMAN, A.G. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.9, n.5, p.1-18, 2015.
- DEANE M.P.; LENZI H.L.; JANSEN A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.79, n. 4, p. 513-514, 1984.
- DE LEON, M.P.; YANAGI, T.; KIKUCHI, M.; M.U.J.; AYAU, O.; MATTA, V.; PAZ, M.; JUAREZ, S.; KANBARA, H.; TADA, I.; HIRAYAMA, K. Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by DNA polymorphism of the cruzipain gene detected by single-stranded DNA conformation polymorphism (SSCP) and direct sequencing. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 12, p. 1867-1874, 1998.
- DIAS, E. Notas sobre o tempo de evolução de algumas espécies de triatomíneos em laboratório. *Revista Brasileira de Biologia*, v.15, p.157-158, 1955.

- DIAS, J.C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 5, p. 603-12, 2002.
- DIAS, J.C.; RAMOS Jr, A.N.; GONTIJO, E.D. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 7, n. 25, p. 7-86, 2016.
- DIOSQUE, P.; TOMASINI, N.; LAUTHIER, J.J.; MESSENGER, L.A.; MONJE RUMI, M.M.; RAGONE, P.G.; ALBERTI-D'AMATO, A.M.; PÉREZ BRANDÁN, C.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; LEWIS, M.D.; LLEWELLYN, M.S.; MILES, M.A.; YEO, M. Optimized multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 8, p. e3117, 2014.
- DIXON, A.F.; HORTH, S.; KINDLMANN, P. Migration in insects: cost and strategies. *Journal of Animal Ecology*, v. 62, p. 182-190, 1993.
- DIOTAIUTI, L. Ecologia. In: DIOTAIUTI ET AL. Triatomíneos. Centro de Pesquisa René Rachou, p. 1-16, 2008.
- DIOTAIUTI, L.; DIAS, J.C.P. Estudo comparativo do ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* alimentados em pombos ou camundongos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 20, n. 2, p. 95-99, 1987.
- DUJARDIN, J.P.; PANZERA, P.; SCHOFIELD, C.J. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, supl. I, p. 223-228, 1999.
- EKKENS, D.B. Nocturnal flights of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) in Sabino canyon, Arizona. I Light collections. *Journal of Medical Entomology*, v. 18: 211-227, 1981.
- FERNANDES, O.; STURM, N.; DENE, R.; CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: A genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 95, p. 129-133, 1998.
- FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; PENA, S.D. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Plos Pathogens*, v. 2, n.3, p. e24, 2006.
- FREITAS, S.P.C.; FREITAS, A.L.C.; PRAZERES, S.M.; GONÇALVES, T.C.M. Influência de hábitos antrópicos na dispersão de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, através de *Mimosa tenuiflora* (Willdenow) (Mimosaceae) no Estado do Ceará, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, p. 109-12, 2004.
- FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 16, p. 265-299, 1980.
- GALÍNDEZ GIRÓN, I.; ROCHA, D.S.; LENT, H.; CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas, v.II, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p. 449-514, 1998.

- GALVÃO, A.B. *Triatoma brasiliensis macromelasoma* n. subsp (Reduviidae, Hemiptera). *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 7, p.455–457, 1956.
- GALVÃO, A.B.; SILVA E SOUZA, H.; LIMA, R.R. *Triatoma williamsi* n. sp. (Hemiptera, Triatominae). *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, v. 17, n. 4, p. 363-366, 1965.
- GALVÃO, C.; JURBERG, J.; CUNHA, V.; MELLO, R. P. Biologia do *Triatoma nitida* Usinger, 1939 em laboratório (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 90, n. 5, p. 657-663, 1995.
- GALVÃO, C.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.U.; SEGURA, C.A.M.; GIRÓN, I.G.; CURTO DE CASAS, S.I. Distribuição geográfica e dispersão alti-latitudinal de alguns gêneros e espécies da Tribo Triatomini Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduvidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 33-37, 1998.
- GALVÃO, C.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J.; CARVALHO, R. Início da atividade de voo em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) e *T. melanosoma* Martínez, Olmedo e Carvalho, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 1, p. 137-140, 2001.
- GALVÃO, C.; DALE, C. Chaves de identificação para adultos. In: Vetores da doença de Chagas no Brasil. Série Zoológica: Guias e Manuais de identificação. Curitiba, p. 171-208, 2015.
- GALVÃO, C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Vetores conhecidos no Brasil. In: *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. Série Zoológica: Guias e Manuais de identificação. Curitiba, p. 88-170, 2015.
- GALVÃO, C.; PAULA, A.S. Sistemática e evolução dos vetores. In: *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. Série Zoológica: Guias e Manuais de identificação. Curitiba, p. 26-32, 2015.
- GARDIM, S.; ROCHA, C.S.; ALMEIDA, C.E.; TAKIYA, D.M.; SILVA, M.T.A.; AMBRÓSIO, D.L.; CICALLELLI, R.M.B.; ROSA, J.A. Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic *Triatoma* in Central-Western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 89, p. 766–774, 2013.
- GARDIM, S.; ALMEIDA, C.E.; TAKIYA, D.M.; OLIVEIRA, J.; ARAÚJO, R.F.; CICALLELLI, R.M.B.; ROSA, J.A. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infection Genetics and Evolution*, v. 23, p. 74-79, 2014.
- GARCIA, A.L.; CARRASCO, H.J.; SCHOFIELD, C.J.; VALENTE, S.A.; FRAME, I.A.; STOTHARD, R.; MILES, M.A. Random Amplification of Polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, v.35, p.38-45, 1998.

- GARCIA, 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.
- GARCIA, B. A.; MORIYAMA, E.N.; POWELL, J.R. Mitochondrial DNA sequences of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. *Journal of Medical Entomology*, v. 38, p. 675-683, 2001.
- GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 4, p. 557-565, 2000.
- GOMES, A.B.; SILVA, I.G. Influência da Temperatura na biologia de triatomíneos. XXI. *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Patologia Tropical*, v. 29, n. 1, p. 85-93, 2000.
- GONÇALVES, T.C.M.; CUNHA, V.; OLIVEIRA, E.; JURBERG, J. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 92, n. 2, p. 275-280, 1997.
- GONÇALVES, T.C.M.; JURBERG, J.; COSTA, M.C.; SOUZA, W. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 276-280, 1985.
- GONÇALVES, T.C.M.; SAMPAIO, I.A.; RAMOS, L.B.; GOMES, A.C.F.; MAIA, A.A.S.; DANTAS, E.C.; TEVES-NEVES, S.C.; MALLETT, J.R.S.; LOPES, C.M. Investigação sobre a fauna de triatomíneos no sudeste de Tocantins. In: 25ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas; 2009; Minas Gerais. Uberaba: Livro de Resumos, p. 47, 2009.
- GONÇALVES, T.C.M.; TEVES-NEVES, S.C.; SANTOS-MALLETT, J.R.; CARBAJAL-DE-LA FUENTE, A.L.; LOPES, C.M. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, p. 429-437, 2013.
- GORLA, D.E.; DUJARDIN, J.P.; SCHOFIELD, C.J. Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Tropica*, v. 63, p. 127-140, 1997.
- GRINGORTEN, J.L.; FRIEND, W.G. Haemolymph-volume changes in *Rhodnius prolixus* during flight. *Journal of Experimental Biology*, v.83, p. 325-333, 1979.
- GUARNERI, A. A.; CARVALHO, M. G.; PEREIRA, M. H., DIOTAIUTI, L. Potencial biológico do *Triatoma brasiliensis*. *Cadernos de Saúde Pública* [online], v. 16, supl. 2, p. S101-S104, 2000.
- GUARNERI, A.A.; PEREIRA, M.H.; DIOTAIUTI, L. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* and

- Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera:Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 37, n. 3, p. 373-379, 2000.
- GUARNERI, A.A.; LAZZARI, C.R.; DIOTAIUTI, L.; LORENZO, M.G. The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology*, v. 27, p. 142-147, 2002.
- GUARNERI, A.A.; LAZZARI, C.R.; XAVIER, A.A.P.; DIOTAIUTI, L.; LORENZO, M.G. 2003. The effect of temperature on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiological Entomology*, v. 28, p. 185-191, 2003.
- GUARNERI, A.A. Comportamento em triatomíneos. In: DIOTAIUTI ET AL. Triatomíneos. Centro de Pesquisa René Rachou, p. 1- 7, 2008.
- GUHL, F.; JARAMILLO, C.; VALLEJO, G.A.; CARDENAS-ARROYO, F.; AUFDERHEIDE, A. Chagas disease and human migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 553-555, 2000.
- GUREVITZ, J.M.; CEBALLOS, L.A.; KITRON, U.; GUTLER, R.E. Flight initiation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) under natural climatic conditions. *Journal of Medical Entomology*, v. 43, p. 143-150, 2006.
- GUREVITZ, J.M.; KITRON, U.; GURTNER, R.E. Flight muscle dimorphism and heterogeneity in flight initiation of field-collected *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 44, p. 186-191, 2007.
- GURGEL-GONÇALVES, R.; GALVÃO, C.; COSTA, J.; PETERSON, A.T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of Tropical Medicine*, p. 1-15, 2012.
- HWANG, W.S.; WEIRAUCH, C. Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. *PLoS One*, v. 7, n. 9, p. e45523, 2012.
- HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa e Espínola, 1964 em laboratório. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 36, p. 251-262, 1972.
- HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de triatomíneos. III – *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae). *Studia Entomologica*, v. 20, n.1-4, p.89-98, 1978.
- HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de triatomíneos. III – *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Butantan*, v. 47/48, p. 157-164, 1983/84.
- HERNÁNDEZ, M.L.; ABRAHAN, L.; MORENO, M.; GORLA, D.E.; CATALÁ, S. Phenotypic variability associated to genomic changes in the main vector of Chagas disease in southern cone of South America. *Acta Tropica*; v. 106, p. 60-67, 2008.
- HERNÁNDEZ, M.L.; DUJARDIN, J.P.; GORLA, D.E.; CATALÁ, S.S. Can body traits, other than wings, reflect the flight ability of Triatominae bugs? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 6, p. 682-691, 2015.
- HIGO, H.; MIURA, S.; AGATSUMA, T.; MIMORI, T.; YANAGI, T.; IWAGAMI, M.; ARIAS, A.R.; MATTA, V.; HIRAYAMA, K.; TAKEUCHI, T.; TADA, I.; HIMENO, K.

- Identification of *Trypanosoma cruzi* sublineages by the simple method of single-stranded conformation DNA polymorphism (SSCP). *Parasitology Research*, v. 100, n. 5, p.1023-1031, 2007.
- HOARE CA. *The trypanosomes of mammals: A zoological monograph*. 1972. P. 750. Oxford: Blackwell Scientific Publications; Oxford, 1972.
- HYPISA, V.; TIETZ, D.F.; 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 Phylogenetics and Evolution*, v. 23, n. 3, p. 447-57, 2002.
- ISAC, E.; ALVES, R.B.N.; ROCHA, A.P.; COSTA JUNIOR, O.O.; SANTOS, A.H. Biologia do *Triatoma costalimai* (Verano & Galvão, 1959) (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Patologia Tropical*, v. 29, n. 2, p. 233-240, 2000.
- IZETA-ALBERDI, A.; IBARRA-CERDEÑA, C.N.; MOO-LLANES, D.A.; RAMSEY, J.M. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 631, 2016.
- JANSEN, A.M.; XAVIER, S.C.C.; ROQUE, A.L.R. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Tropica*, v. 151, p. 1-15, 2015.
- JUAREZ, E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, v. 4, p. 147-66, 1970.
- JUAREZ, E.; SILVA, E.P.C. Comportamento do *Triatoma sordida* em condições de laboratório. *Revista de Saúde Pública*, v. 16, supl. 3, p. 1-37, 1982.
- JUSTI, A.S.; RUSSO, C.A.; MALLET, J.R.S.; OBARA, M.T.; GALVÃO, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 149-157, 2014.
- LAZZARI, C.R. Biologia e comportamento. In: Vetores da doença de Chagas no Brasil. Série Zoológica: Guias e Manuais de Identificação. Curitiba, p. 65-74, 2015.
- LEHANE, M.J.; SCHOFIELD, C.J. Field experiments of dispersive flight by *Triatoma infestans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, p. 399-400, 1981.
- LEHANE, M.J.; SCHOFIELD, C.J. Flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera, Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research*, v. 72, p. 497-510, 1982.
- LEHANE, M.J.; MCEWEN, P.K.; WHITAKER, C.J.; SCHOFIELD, C.J. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, v. 52, p. 27-38, 1992.
- LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 25, p. 349-376, 1965.

- LENT, H.; WYGODZINSKY, 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, n. 3, p. 123-520, 1979.
- LEWIS, M.D.; MA, J.; YEO, M.; CARRASCO, H.J.; LLEWELLYN, M.S.; MILES, M.A. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81 n. 6, p. 1041-1049, 2009.
- LIMA, L.; ESPINOSA-ÁLVAREZ, O.; ORTIZ, P.A.; TREJO-VARÓN, J.A.; CARRANZA, J.C.; PINTO, C.M.; SERRANO, M.G.; BUCK, G.A.; CAMARGO, E.P.; TEIXEIRA, M.M. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Tropica*, v. 151, p. 166-177, 2015.
- LIMA, V.D.; JANSEN, A.M.; MESSENGER, L.A.; MILES, M.A.; LLEWELLYN, M.S. Wild *Trypanosoma cruzi* I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region. *Parasites & Vectors*, v. 7, p. 263, 2014.
- LOROSA, ES.; ANDRADE, R.E.; SANTOS, S.M.; PEREIRA, C.A.; VINHAES, M.C.; JURBERG, J. 1999. Estudo da infecção natural e fontes alimentares de *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959, *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 e *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 do estado de Goiás, Brasil, através da técnica de precipitina. *Entomologia y Vectores*, v. 6, p. 405-414, 1999.
- LOROSA, E.S.; JURBERG, J.; SOUZA, A.L.A.; VINHAES, M.C.; NUNES, I.M. Hemolinfa de Dytioptera na manutenção do ciclo biológico silvestres de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stål, 1959)(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, v. 7, p. 287-296, 2000.
- LUQUETTI, A.O.; MILES, M.A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M.; SOUZA, A.; POVOA, M.; RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodeme associated with acute and chronic Chagas disease in Central Brasil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, p. 462-470, 1986.
- LUNARDI, R.R.; GOMES, L.P.; CÂMARA, T.P.; ARRAIS-SILVA, W.W. Life cycle and vectorial competence of *Triatoma williamsi* (Galvão, Souza & Lima, 1965) under the influence of different blood meal sources. *Acta Tropica*, v. 149, p. 220-226, 2015.
- LYMAN, D.F.; MONTEIRO, F.A.; ESCALANTE, A.A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D.M.; DUJARDIN, J.P.; BEARD, C.B. Mitochondrial DNA sequences variation among triatomines vectors of Chagas's disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60, n. 3, p. 377-386, 1999.
- MACEDO, A.M.; MARTINS, M.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. DNA finger-printing of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 55, p. 147-154, 1992.
- MACEDO, I.C.G.; GOMES, A.C.F.; GLORIA, A.F.R.; SILVA, M.D.F.; BASTOS, W.M.; C.O.C. Doença de Chagas aguda no estado do Tocantins: Distribuição das principais espécies de triatomíneos nas regiões de saúde do Estado entre 2005 e 2011. In: Anais da

- 27ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 15ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses; 2011; Minas Gerais. Uberaba: Livro de Resumos; 2011. p. 35.
- MACHINER, F.; CARDOSO, R.M.; CASTRO, C.; GURGEL-GONÇALVES, R. Occurrence of *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae) in different environments and climatic seasons: a field study in the Brazilian savanna. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 5, p. 567-571, 2012.
- MARASSÁ, A.M.; VEIGA-BARREIROS, R.M.; MORAES, R.H.P; ANDRADE, R.M.G; CASTILLO, A.; CORRÊA, F.M.A. Observações sobre oviposição, eclosão e tempo de vida de *Triatoma matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953 (Hemiptera-Reduviidae) em função da alimentação em pombos e coelhos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n. 4, p. 361-365, 1998.
- MCEWEN, P.K.; LEHANE, M.J. Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Science Applied*, v. 14, p. 461-464, 1993.
- MCEWEN, P.K., LEHANE, M.J. Relationships between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Applied Entomology*, v. 117, p. 217-223, 1994.
- MAES, I.; AUWERA, G.P.D. PCR – RFLP for DTU genotyping of *Trypanosoma cruzi*. Institute of Tropical Medicine Antwerp, p. 1-8, 2000.
- MARTINS, K.; ANDRADE, C.DE M.; BARBOSA-SILVA, A.N.; DO NASCIMENTO, G.B.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.; DA CÂMARA, A.C. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 39, p. 68-75, 2015.
- 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.
- MELLO, D.A. Biology of Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) from north of Formosa County (Goiás – Brazil). I. Length of life cycle of *Triatoma sordida* (Stål, 1859). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 10, n. 6, p. 327-331, 1976.
- MELLO, D.A. Some aspects of feeding habits under laboratory conditions of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) and *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 40, n. 2, p. 323-326, 1980.
- MELLO, D.A.; BORGES, M.M. Initial discovery of *Triatoma costalimai* naturally infected with *Trypanosoma cruzi*: study of the biological aspects of an isolated sample. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 76, p. 61-69, 1981.
- MELLO, D.A. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mabaí-Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, v. 16, p. 282-291, 1982.
- MENDONÇA, M.B.; NEHME, N.S.; SANTOS, S.S.; CUPOLILLO, E.; VARGAS, N.; JUNQUEIRA, A.; NAIFF, R.D.; BARRETT, T.V.; COURA, J.R.; ZINGALES, B.;

- FERNANDES, O. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology*, v. 124, p. 177-184, 2002.
- MENDONÇA, V.J.; SILVA, M.T.; ARAÚJO, R.F.; JÚNIOR, J.M.; JÚNIOR, M.B.; ALMEIDA, C.E.; COSTA, J.; GRAMINHA, M.A.; CICALLELLI, R.M.; ROSA, J.A. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5, p. 858-64.2009.
- MENDONÇA, V.J.; ALEVI, K.C.C.; PINOTTI, H.; GURGEL-GONÇALVES, 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, n. 22, p. 239-254, 2016.
- MILES, M.A.; TOYÉ, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, p. 217-225, 1977.
- MILES, M.A.; SOUZA, A.A.; POVOA, M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v. 272, p. 819-821, 1978.
- MILES, M.A.; LANHAN, S.M.; DE SOUZA, A.A.; POVOA, D.G. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, p. 221-242, 1980.
- MILES, M.A.; CEDILLOS, R.A.; PÓVOA, M.M.; SOUZA, A.A.; PRATA, A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas disease? *Lancet*, v. 1, n. 8234, p. 1338-1340, 1981.
- MINUZZI-SOUZA, T.T.C.; SILVA, L.R.; HAGSTRÖM, L.; HECHT, M.; NITZ, N.; GURGEL-GONÇALVES, R. Molecular bloodmeal analyses reveal that *Trypanosoma cruzi* infected, native triatomine bugs often feed on humans in houses in central Brazil. *Medical and Veterinary Entomology*, 2018.
- MONTEIRO, F.A.; PÉREZ, R.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J.P.; GALVÃO, C.; ROCHA, D.; NOIREAU, F.; SCHOFIELD, C.; BEARD, C.B. Mitochondrial DNA Variation of *Triatoma infestans* Populations and its Implication on the Specific Status of *T. melanosoma*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, supl. I, p. 229-238, 1999.
- MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J.; BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 62, n. 4, p. 460-465, 2000.
- 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 Evolution*, v. 32, p. 46-56, 2004.
- MONTEIRO, F.A.; WIRAUCH, C.; FÉLIX, M.; LAZOSKI, C.; ABAD-FRANCH, F. Chapter Five - Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. *Advances in Parasitology*, v.99, P.265-344, 2018.

- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANÑA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by patterns of restrictions endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 77; p. 6810-6814, 1980.
- MORENO, M.L.; GORLA, D.E.; CATALÁ, S. Association between antennal phenotype, wing polymorphism and sex in the genus *Mepraia* (Reduviidae: Triatominae). *Infection Genetics and Evolution*, v. 6, p.228-234, 2006.
- MULLER, J.N. *Morfologia de ovos de Triatoma costalimai Verano & Galvão, 1958 e Triatoma jatai Gonçalves, Teves-Neves, Santos-Mallet, Carbajal-de-la-Fuente e Lopes*. 2013. P. XX. Monografia do Curso de Especialização em Entomologia Médica do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro. 2013.
- NEIVA, A. Informações sobre a biologia do *Conorhinus megistus* Burm. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 2, p. 206-212, 1910.
- NICOLLE, G.L. Culture du parasite du Boutond'Orient. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, v.1, p.1-30, 1908.
- NOIREAU, F.; FLORES, R.; VARGAS, F. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene*, v. 93, p. 13-14, 1999.
- NOIREAU, F.; ABAD-FRANCH, F.; VALENTE, S.A.V.; DIAS-LIMA, A.; LOPES, C.M.; CUNHA, V.; VALENTE, V.C.; PALOMEQUE, F.S.; CARVALHO-PINTO, C.J.; SHERLOCK, I.; AGUILAR, M.; STEINDEL, M; GRIDARD, E.C.; JURBERG, J. Trapping Triatominae in Silvatic Habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 1, p. 61-63, 2002.
- NOVY, F.G.; MCNEAL. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.1, p. 1 – 30, 1904.
- OBARA, M.T.; ROSA, J.A.; CERETTI, W.; URBINATTI, P.R.; QUINTERO, L.O.; BARATA, J.M.S.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. A study of the scutellum in eight Chagas disease vector species from genus *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae) using optical and scanning electron microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n.4, p. 463-468, 2007.
- OBARA, M.T.; ROSA, J.A.; SILVA, N.N.; CERETTI, W.; URBINATTI, P.R.; BARATA, J.M.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. Morphological and histological study of eggs of six species of the *Triatoma* genus (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology*, v. 36, n. 5, p. 798-806, 2007.
- OLIVEIRA, A.W.S.; 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, n. 2, p. 204-208, 2007.
- OLIVEIRA, I.A.S.; MAIA, A.A.S.; DANTAS, E.C. Avaliação do controle de qualidade na identificação taxonômica e exame parasitológico de triatomíneos, indicadores de resultados discordantes e positividade, nos anos de 2004 a 2006. *Boletim epidemiológico - Superintendência de vigilância e proteção à Saúde do Tocantins*, v. 5, p. 1-3, 2008.

- OLIVEIRA, I.A.S.; VIANA, M.O.B.; MACEDO, M.O.B.; MACEDO, I.C.G.; GOMES, A.C.F. Óbitos por doença de Chagas no Estado do Tocantins, 2010 a 2013. Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, 2016.
- OLIVEIRA J.; MARCET, P.L.; TAKYIA D.M.; MENDONÇA, V.J.; BELINTANE, T.; BARGUES, M.D.; MATEO, L.; CHAGAS, V.; FOLLY-RAMOS, E.; CORDEIRO-ESTRELA, P.; GURGEL-GONÇALVES, R.; COSTA, J.; ROSA, J.A.; ALMEIDA, C.E. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the Brasiliensis subcomplex. *Acta Tropica*, v. 170, p. 140-148, 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, n. 1, p. 148-157, 2018.
- ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. Iniciativa do Cone Sul. XVa Reunion de La Comisión Intergubernamental Del Cono Sur per la Eliminación de *Trypanosoma cruzi* y La Interrupción de La Transmisión de La Tripanosomiasis Transfusional y Validación de La Interrupción de La Transmisión Vectorial de *Trypanosoma cruzi* por *Triatoma infestans* em Brasil. p. 37, 2006.
- OSCHEROV, E.B.; DAMBORSKY, M.P.; BAR, M.E.; PORCEL E. Estadísticos poblacionales de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) en condiciones experimentales* Population statistics of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) in experimental conditions. *Revista de Saúde Pública*, v. 30, n. 5, p. 438-443, 1996.
- PAULA, A.S.; DIOTAIUTI, L.; SCHOFIELD, C.J. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 35, n.3, p. 712-718, 2005.
- PAVAN, M.G.; MONTEIRO, F.A. Técnicas molculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. Série Zoológica: Guias e Manuais de identificação. Curitiba, p. 241-260, 2015.
- PAVIA, P.X.; THOMAS, M.C.; LÓPEZ, M.C.; PUERTA, C.J. Molecular characterization of the short interspersed repetitive element SIRE in the six discrete typing units (DTUs) of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, v. 132, n. 2, p. 144-150, 2012.
- PENA, S.D.; BARRETO, G.; VAGO, A.R.; DE MARCO, L.; REINACH, F.C.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, p. 1946-1949, 1994.
- PEREIRA, J.M.; ALMEIDA, P.S.; SOUSA, A.V.; PAULA, A.M.; MACHADO, R.B.; GURGEL-GONÇALVES, R. Climatic factors influencing triatomine occurrence in Central-West Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 335-341, 2013.
- PESSOA, S.B. Domiciliação dos triatomíneos e epidemiologia da Doença de Chagas. *Arquivos da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo*, v. 27, p. 161-171, 1962.

- PFEILER, E.; BITLER, B.G.; RAMSEY, J.M.; PALACIOS-CARDIEL, C.; MARKOW, T.A. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 41, n. 1, p.209-212, 2006.
- PINTO, C.F. Fatos curiosos sobre a biologia do *Triatoma sordida* (Nota prévia). *Revista Brasileira de Medicina*, v.6, p. 305, 1949.
- 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 JR, 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. 90e97, 2019.
- RAMÍREZ, J.D.; DUQUE, M.C.; MONTILLA, M.; CUCUNUBÁ, Z.M.; GUHL, F. Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 8 p. 1743-150, 2012.
- RAMÍREZ, J.C.; TORRES, C.; CURTO, M.L.A.; SCHIJMAN, A.G. New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 12, p. 1-15, 2017.
- RASSI, A.J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, p. 1388-1402, 2010.
- READY, P.D.; MILES, M.A. Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, p. 238-242, 1980.
- REY, L. Protozoários agentes de doenças humanas. In: Coura, J.R. (Ed.), Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- ROCHA, D.S.; JURBERG, J.; DA ROSA, J.A.; SCHAEFER, C.W.; GALVÃO, C. Description of eggs and nymphal instars of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 based on optical and scanning electron microscopy (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, v. 2064, p. 1-20, 2009.
- ROCHA, D.S.; SANTOS, C.M. Morfologia de ovos e ninfas. In: Vetores da doença de Chagas no Brasil. Série Zoológica: Guias e Manuais de identificação. Curitiba, p. 40 – 63, 2015.
- ROFF, D.A. Dispersal in dipterans: Its costs and consequences. *Journal of Animal Ecology*, v. 46, p. 443-456, 1977.
- ROFF, D.A. The cost of being able to fly: A study of wing polymorphism in two species of crickets. *Oecologia*, v. 63, p. 30-37, 1984.
- ROFF, D.A. The evolution of wing dimorphism in insects. *Evolution*, v. 40, n. 5, p.1009-1020. 1986.

- ROMANHA, A.J. 1982. *Heterogeneidade Enzimática em Trypanosoma cruzi*, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 110 pp.
- ROSA, J.A.; ROCHA, C.S.; GARDIM, S.; PINTO, M.C.; MENDONÇA, V.J.; FERREIRA FILHO, J.C.R.; CARVALHO, E.O.C.; CAMARGO, L.M.A.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J.D.; CILENSE, M.; ALMEIDA, C.E. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*, v. 3478, p. 62-76, 2012.
- ROSA, J.A.; JUSTINO, H.H.G.; NASCIMENTO, J.D.; MENDONÇA, V.J.; ROCHA, C.S.; CARVALHO, D.B.; FALCONE, R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ALEVI, K.C.C.; OLIVEIRA, J. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, v. 675, p. 1-25, 2017.
- ROZAS, M.; DONCKER, S.; ADAUI, V.; CORONADO, X.; BARNABÉ, C.; TIBYARENC, M.; SOLARI, A.; DUJARDIN, J.C. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment-length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *The Journal of Infection Diseases*, v. 195, n. 9, p. 1381-1388, 2007.
- SAINZ, A. C.; MAURO, L.V.; MORIYAMA, E.N.; GARCÍA, B.A. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica*, v. 121, p. 229-240, 2004.
- SALGADO, J.A.; GARCEZ, P.N.; OLIVEIRA, C.A.; GALIZZI, J. Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito da Doença de Chagas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 4, p. 330-337, 1962.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, p. 2100, 2001.
- SANGENIS, L.H.; SARAIVA, R.M.; GEORG, I.; DE CASTRO, L.; LIMA, V. S.; ROQUE, A.L.; XAVIER, S.C.; SANTOS, L.C.; FERNANDES, F.A.; SARQUIS, O.; LIMA, M.M.; CARVALHO-COSTA, F.A.; BÓIA, M.N. Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, p. 4, 2015.
- SCHOFIELD, C.J.; MARSDEN, P.D.; VIRGENS, D. Notes on the biology of *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1958. (Hemiptera; Reduviidae; Triatominae) *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 9, n. 2, p. 295-301, 1980.
- SCHOFIELD, C.J.; MATTHEWS, J.N.S. Theoretical approach to active dispersal and colonization of houses by *Triatoma infestans*. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, p. 211-222, 1985.
- SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of Triatominae. In: *Biosystematics of Haematophagous Insects* (M. W. Service, ed.), Oxford: Systematics Association/ Clarendon Press, v. 37, p. 284-312, 1988.
- SCHOFIELD, C.J.; LEHANE, M.J.; MCEWAN, P.; CATALÁ, S.S.; GORLA, D.E. Dispersive flight by *Triatoma sordida*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 85, p. 676-678, 1991.

- SCHOFIELD, C.J.; DOLLING, W.R. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In: Lane RP, Crosskey RW. *Medical Insects and Arachnids*. London: Chapman & Hall, p. 483-516, 1993.
- SCHOFIELD, C.J.; DUJARDIN, J.P. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actualités Biologiques*, v. 21, p. 183-197, 1999.
- SCHOFIELD, C.J. *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 535-544, 2000.
- SCHOFIELD, C.J.; GALVÃO, C. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, p. 88-100, 2009.
- SILVA, I.G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. VI. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 34, p. 307-311, 1990.
- SILVA, I.G.; SILVA, J.L.; SILVA, H.H.G.; CAMARGO, M.F.; MOURA, A.F.; SANTOS, A.H. Distribuição dos vetores da tripanossomíase americana capturados no ambiente domiciliar no Estado de Goiás. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 21, p. 140-154, 1992.
- SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre a cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica*, v. 20, p.191-207, 1953.
- SILVA, L.A.G.C. Nota técnica: Biomas presentes no Estado do Tocantins. Biblioteca digital da câmara dos deputados, p. 3-9, 2007.
- SILVA, T.G. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. VIII - *Triatoma matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953 (Hemiptera - Reduviidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 18, p. 91-94, 1989.
- SOARES, R.P.P.; GONTIJO, N.F.; ROMANHA, A.J.; DIOTAIUTI, L.; PEREIRA, M.H. Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Tropica*, v. 73, n. 3, p. 285-291, 1998.
- SOUZA, E.S.; VON ATZINGEN, N.C.B.; FURTADO, M.B.; OLIVEIRA, J.; NASCIMENTO, J.D.; VENDRAMI, D.P.; GARDIM, S.; ROSA, J.A. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. *ZooKeys*, v. 621, p. 45-62, 2016.
- SOUZA, J.M.P.; Rodrigues, V.L.C.C.; SILVA, E.O.R. *Triatoma sordida* - Considerações sobre o tempo de vida das formas adultas e sobre a oviposição das fêmeas. *Revista de Saúde Pública*, v. 2, p. 291-296, 1978.
- SOUZA, M.A. Morphological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, s. I, p. 205-210, 1999.
- SOUTO, R.P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 62, n. 1, p. 45-52, 1993.
- SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, ZINGALES B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 83, p. 141-152, 1996.

- STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; DE MENEZES, C.L.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, A.J. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular and Biochemical Parasitology* v. 60, n. 1, p. 71-79, 1993.
- STOTHARD, J. R.; YAMAMOTO, Y.; CHERCHI, A.; GARCIA, A. L.; VALENTE, S. A. S.; SCHOFIELD, C. J.; MILES, M. A. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bulletin of Entomological Research*, v. 88, p. 553-560, 1998.
- STURM, N.R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 33, n. 3, p. 205-214, 1989.
- SVS/MS. Doença de Chagas Aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Boletim Epidemiológico*, v. 46, n. 21, 2015.
- TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; SVOBODA, M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplastminicircles. *Experimental Parasitology*, v. 114, n. 4, p. 279-288, 2006.
- TEVES-NEVES, S.C.; FREITAS, S.P.C.; LOPES, C. M.; OLIVEIRA, M.L.R.; MALLET, J. R. S.; GONÇALVES, T.C.M. Morphology of the external genitalia of female morphotypes of triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) captured in state of Tocantins. In: *Anais do XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise*, 2011.
- TEVES-NEVES, S.C. Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* no Estado do Tocantins, Brasil. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2012.
- TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J. Natural populations of the agent of Chagas' disease have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 83, p. 115-119, 1986.
- TIBAYRENC, M.; AYALA, F. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*, v. 42, p. 277-292, 1988.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*, v. 28, p. 85-104, 1998.
- TOLEZANO, J.E.; ARAÚJO, M.F.L.; CHIEFFI, P.P.; VALENTIM, A.M.; RIBEIRO, S.S. Variáveis relacionadas ao desenvolvimento de *Triatoma infestans* Klug, 1834 em condições de laboratório. 2 - Efeitos da manipulação na sobrevivência e na fertilidade. *Revista do Instituto Adolpho Lutz*, v. 44, p. 81-86, 1984.
- TOMA, H.K.; YAMADA-OGATTA, S.F.; BRANDÃO, A.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; FERNANDES, O. *Trypanosoma cruzi*: subtractive hybridization as a molecular strategy to generate new targets to distinguish groups and hybrids. *Experimental Parasitology*, v.117, n. 2, p.178-187, 2007.

- TOYÉ, P. J. Isoenzyme variations in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, p.147, 1974.
- VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; ANDRADE, L.O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C.; SIMPSON, A.J.G.; TOSTES, S.; PENA, S.D.J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *American Journal of Pathology*, v. 149, p. 2153-2159, 1996.
- WEIRAUCH, C. Cladistic analysis of Reduviidae (Heteroptera: Cimicomorpha) based on morphological characters. *Systematic Entomology*, v. 33, p. 229-274, 2008.
- WEIRAUCH, C.; MUNRO, J.B. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 53, n. 1, p. 287-299, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. WHO: technical report of the TDR Disease Reference Group on Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2012. (WHO Technical Report Series, 975).
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *The Weekly Epidemiological Record*, v. 90, n. 6, p.33-44, 2015.
- YEO, M.; MAURICIO, I.L.; MESSENGER, L.A.; LEWIS, M.D.; LLEWELLYN, M.S.; ACOSTA, N.; BHATTACHARYYA, T.; DIOSQUE, P.; CARRASCO, H.J.; MILES, M.A. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 6, 2011.
- ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal for Parasitology*, v. 28, p. 105-112, 1998.
- ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.
- ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO DE LÂMINAS

As lâminas foram identificadas com o número de registro a lápis e deixadas secando a temperatura ambiente por 12 horas.

Após este período foram fixadas em metanol por 10 minutos realizando-se em seguida a coloração pelo método de Giemsa conforme sequencia abaixo:

1. Cobrir a lâmina com solução de HCl 5 N por 10 minutos ;
2. Lavar sob filete de água e deixar secar naturalmente numa posição inclinada;
3. Preparar 3 mL de Giemsa tamponado para cada lâmina na seguinte proporção: 3 gotas de Giemsa para cada 1 mL de água tamponada;
4. Despejar o volume de tampão a ser usado numa proveta e depois acrescenta as gotas de giemsa com cautela, para homogeneizar, basta virar uma vez a proveta, mantendo-a inclinada;
5. Cobrir a lâmina com o Giemsa tamponado e deixar por 1 hora e 50 minutos;
6. Lavar sob um filete de água;
7. Deixa secar naturalmente e guardar.

ANEXO B

PROVA DE ARTIGO RELACIONADO AO TÓPICO 4.1.2.

Triatoma costalimai Naturally Infected by *Trypanosoma cruzi*: A Public Health Concern

Simone Caldas Teves,^{1,2} Helena Keiko Toma,³ Catarina Macedo Lopes,¹ Bruna Lucia Nascimento de Oliveira,¹ Ana Laura Carbajal-de-la-Fuente,⁴ Danielle Misael de Souza,¹ Iza Alencar Sampaio de Oliveira,⁵ Jacenir Reis dos Santos-Mallet,¹ and Teresa Cristina Monte Gonçalves^{1*}

¹Interdisciplinary Laboratory of Entomological Surveillance in Diptera and Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil; ²Postgraduate Program in Animal Biology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brazil; ³Laboratory of Molecular Diagnosis and Hematology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Laboratory of Eco-Epidemiology, Faculty of Exact and Natural Sciences, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IEGEB-CONICET), University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ⁵Secretary of Health of the State of Tocantins

Abstract. The rupestrian *Triatoma costalimai* species has been found infected by *Trypanosoma cruzi* in wild, peridomicile, and intradomicile environments in the municipality of Aurora do Tocantins, Tocantins, Brazil. Proximity between rock outcrops increases the risk of vector transmission of Chagas disease via this species. This work describes a focus of colonization by *T. costalimai* specimens infected by *T. cruzi* in rock outcrops located in an urban area in this municipality. Parasitological examination of feces from the collected specimens, axenic cultivation of *T. cruzi*-positive samples, and genetic characterization of the isolates were performed. Nymph and adult specimens were collected with a high infection prevalence (64.5%) for *T. cruzi* TCI. Participation of the *T. costalimai* species in the wild cycle of *T. cruzi* in rock outcrops located in an urban area demonstrates the need for entomological surveillance and control of vector transmission of Chagas disease in the municipality of Aurora do Tocantins, Tocantins.

The state of Tocantins presents the Amazonian biomes predominating in the north and northwest regions and in the Cerrado in the northeast, southwest, and southeast. A total of 16 species of triatomines were caught inside or around dwellings in this state, among these *Triatoma costalimai* Verano and Galvão, 1959, rarely found in the home. However, the prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in *T. costalimai* was 13.5%.¹ This species was described from specimens collected in rocky outcrops in the municipality of Taguatinga, State of Tocantins, and has since been found in the regions of Cerrado Biome in the States of Goiás, Tocantins, and Bahia.² Housing conditions, enhanced by human impact on the environment, favor the domiciliation of triatomines,³ and, combined with oral transmission, exacerbate the epidemiological profile of Chagas disease in the state of Tocantins. According to the Health Surveillance Secretary of the Brazilian Ministry of Health in the State of Tocantins, 23 cases of acute Chagas disease were confirmed for the period of 2000–2014, of which 19 were associated with oral transmission, two with vector transmission, and two with no information on the type of transmission.⁴ In the period of 2010–2013, 59% of the deaths caused by Chagas disease in the northern region of Brazil occurred in the state of Tocantins, where the average number of reports was 54 deaths/year, southeast health regions with 25%, Capim Dourado with 23%, and Cerrado Tocantins Araguaia with 13% (Oliveira et al., Secretary of Health of the State of Tocantins - SESAU - Tocantins 2016, unpublished data). The Ministry of Health included the State of Tocantins in two surveillance models created for the Legal Amazon region, one aimed at preventing vector transmission and the other aimed at early detection of acute cases. In Tocantins, and particularly in Aurora do Tocantins,

proximity between dwellings and rock outcrops increases the risk of vector transmission by *T. costalimai*. This municipality was classified in 2006 as being at high risk for vector transmission based on the following indicators: morbidity (acute or chronic autochthonous cases of the disease), entomological factors (vector species, infestation, and dispersion), and environmental factors (domicile and extra-domicile).⁵ These, in turn, would be associated with anthropogenic effects on ecosystems, where this species naturally participates in the life cycle of *T. cruzi*. Studies have shown that there is an association between *T. cruzi* genotypes and the clinical forms of Chagas disease,^{6–8} reinforcing the importance of knowing the discrete typing units (DTUs) circulating in endemic areas. Thus, the objective of this work was to perform the following: 1) describe a focus of infected *T. costalimai* in an urban area of the municipality of Aurora do Tocantins, 2) determine its prevalence of infection by *T. cruzi*, and 3) characterize the genotypes of *T. cruzi* in the isolates.

Captures were performed in the municipality of Aurora do Tocantins (12°42'32.06"S 46°24'21.24"W), State of Tocantins, Brazil, in a sylvatic environment of rock outcrops, with approximately 30 m of height, located 10 m far from the house, with the presence of annexes of the peridomicile where domestic animals are kept (dog, chicken, and pig) (Figure 1). Sixteen Noireau traps⁹ were used for two nights in a period of 14 hours each one (IBAMA SIS/BIO License 43393-1 of 05/27/2014).

Taxonomic identification of adults was performed according to the morphological criteria described by Lent and Wygodzinsky¹⁰ and a dichotomous key for species of the subcomplex Matogrossensis by Gonçalves et al.¹¹ Nymphs were kept in the laboratory to confirm their species classification as they reached adulthood.

The presence of trypanosomatids was investigated through the analysis of the intestinal contents using optical microscopy and the results were sent to the SESAU-Tocantins. Samples positive for epimastigote and metacyclic trypomastigote forms similar to *T. cruzi* and also negatives ones were

*Address correspondence to Teresa Cristina Monte Gonçalves, Interdisciplinary Laboratory of Entomological Surveillance in Diptera and Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil, 4365 CEP: 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: tcmonte@ioc.fiocruz.br



FIGURE 1. General aspect of the studied environment: domicile, peridomestic, and wild environment in the background. This figure appears in color at www.ajtmh.org.

cultured at 28°C in biphasic axenic media of Neal, Mc Novy and Nicolle and LIT (liver infusion tryptose), containing 20% fetal bovine serum, penicillin, and fluorocytosine, for isolation of parasites. After 15 days, positive samples were cultured at 28°C for 20 days in LIT medium, with five times the volume of the isolation medium, to obtain the mass of the parasites. The cultures were washed in 0.01 M phosphate-buffered saline at pH 7.4, through centrifugations at 2,500 rpm, and the pellet containing the parasites was stored at -20°C until further use.

DNA extraction was performed using the phenol-chloroform method.¹² DNA quantification was performed using a Denovix spectrophotometer (Uniscence) at a wavelength of 260 nm.

Genotyping, for the determination of DTUs of these samples, was performed through amplification and analysis of three gene regions: Subunit 2 (COII) of the mitochondrial cytochrome oxidase enzyme followed by digestion with the enzyme *Alu I* (Promega), D7 divergent domain of the 24S alpha rRNA gene, and intergenic region of the spliced leader (SL-IRac), according to Martinez et al.¹³ PCR and digestion products were analyzed on a 6% acrylamide gel stained with ethidium bromide. As controls, the strains Col1.7G2 (Tcl), JG (TclI), RN19 (TclIII), AM64 (TclV), 3253 (TcV), and CL-Brener (TcVI) were used.

A total of 53 specimens of *T. costalimai* (female = 8; male = 4; $N_2 = 9$; $N_3 = 12$; $N_4 = 9$; and $N_5 = 11$) were captured. Of these, adults and nymphal instar ($N = 34$, 64.15%) were infected by *T. cruzi* (Table 1). A total of 21 parasite samples were isolated in cultures in axenic medium, and molecular analyses confirmed the samples belonged to the species *T. cruzi* based on DTU

TCl profile. It was not possible to isolate 13 samples probably because of an incompatibility of the sylvatic strains with culture medium or low infections rates.

The high *T. cruzi* infection prevalence in adults and nymphs of stages IV and V of *T. costalimai* suggests that this species is maintaining the wild cycle of the parasite in a peridomestic environment in the municipality of Aurora do Tocantins, constituting a risk of vector transmission of Chagas disease in this area. These results corroborate a study performed by Gonçalves et al. (unpublished data) in nine municipalities in Southeastern Tocantins, including Aurora do Tocantins, that reported the presence of *T. costalimai* with high infection prevalence in wild and peridomestic ecotypes but did not determine the circulating DTU. Likewise, Brito et al.¹⁴ also observed that *T. costalimai* may contribute to the transmission of *T. cruzi* in the peridomestic and intradomestic environments, with high infection prevalence in triatomines adults, of municipalities of Southeastern Tocantins, including Aurora do Tocantins, after analyzing data obtained in the SESAU-Tocantins. The occurrence of this natural infection of *T. costalimai* by *T. cruzi* was initially evidenced by Mello and Borges¹⁵ and Mello,¹⁶ in Mambaí-GO, but with infection prevalences of 13.5% and 0.4%, respectively. More recently, also in Mambaí-GO, Machiner et al.¹⁷ reported a higher occurrence of *T. costalimai* in rock outcrops located in the peridomestic, near hens and pigs, comparable to a wild environment, indicating the synanthropic potential of the species, without the presence of *T. cruzi* infection. In the present study, a similar environment was observed with the high infection prevalence, suggesting the transmission cycle of the parasite among the wild animals that inhabit the rock outcrops where the triatomines were captured. Notably, there are patients with Chagas disease in this area. Although the association of *T. costalimai* and rodents of *Kerodon rupestris* species have been described,¹⁰ the association of these triatomines with this reservoir at the study site is not proven. In specimens captured in the North of Goiás, Lorosa et al.¹⁸ observed that *T. costalimai* presented eclectic feeding habits (rodents, possums, lizards, horses, armadillos, and birds). The *T. cruzi* genotype TcI, identified in this work for the first time in *T. costalimai*, was also reported in a study with wild TCl isolates obtained from different reservoirs in the Cerrado Biome,¹⁹ as well as from bats captured in Tocantins.²⁰ Jansen et al.¹⁹ in 2015 observed a greater predominance of TcI isolates in wild reservoirs and stated that *Didelphis* spp. infected with TcI can maintain high parasitemia for a long period of time. The high prevalence of infection in nymphs and adults of *T. costalimai* by TcI shows the importance of constant entomological and epidemiological surveillance actions in the

TABLE 1

Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma costalimai* collected in rock outcrops in Aurora do Tocantins, State of Tocantins, Brazil

Stage	Total	Infected (N/%)
N_2	9	1 (11.1%)
N_3	12	5 (41.6%)
N_4	9	7 (77.7%)
N_5	11	10 (90.9%)
Female	8	8 (100%)
Male	4	3 (75%)
Total	53	34 (64.15%)

N_2 , N_3 , N_4 , N_5 = nymph of second, third, fourth and fifth stage, respectively.

municipality of Aurora do Tocantins because of the proximity of man to the wild cycle of the parasite.

Received May 17, 2018. Accepted for publication July 31, 2018.

Acknowledgments: Secretary of Health of Tocantins-TO.

Financial support: IOC/FIOCRUZ; Secretary of Health of the State of Tocantins – SESAU-TO.

Authors' addresses: Simone Caldas Teves, Bruna Lucia Nascimento de Oliveira, Danielle Misael de Souza, and Teresa Cristina Monte Gonçalves, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: scteves@ioc.fiocruz.br, brunalucianascimento@gmail.com, danymisael@gmail.com, and tcmonte@ioc.fiocruz.br. Helena Keiko Toma, Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: hktoma@globo.com. Catarina Macedo Lopes, Laboratório Interdisciplinar em Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: aniratac@ioc.fiocruz.br. Ana Laura Carbajal-de-la-Fuente, Laboratorio Ecoepidemiología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Instituto de Ecología, Genética y Evolución de Buenos Aires-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IEGEB-CONICET), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, E-mail: analaura.carbajal@gmail.com. Iza Alencar Sampaio de Oliveira, Assessoria de Zoonoses e Animais Peçonhentos, Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins, Palmas, Brazil, E-mail: iza.aso@gmail.com. Jacenir Reis dos Santos-Mallet, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: jacenir@ioc.fiocruz.br.

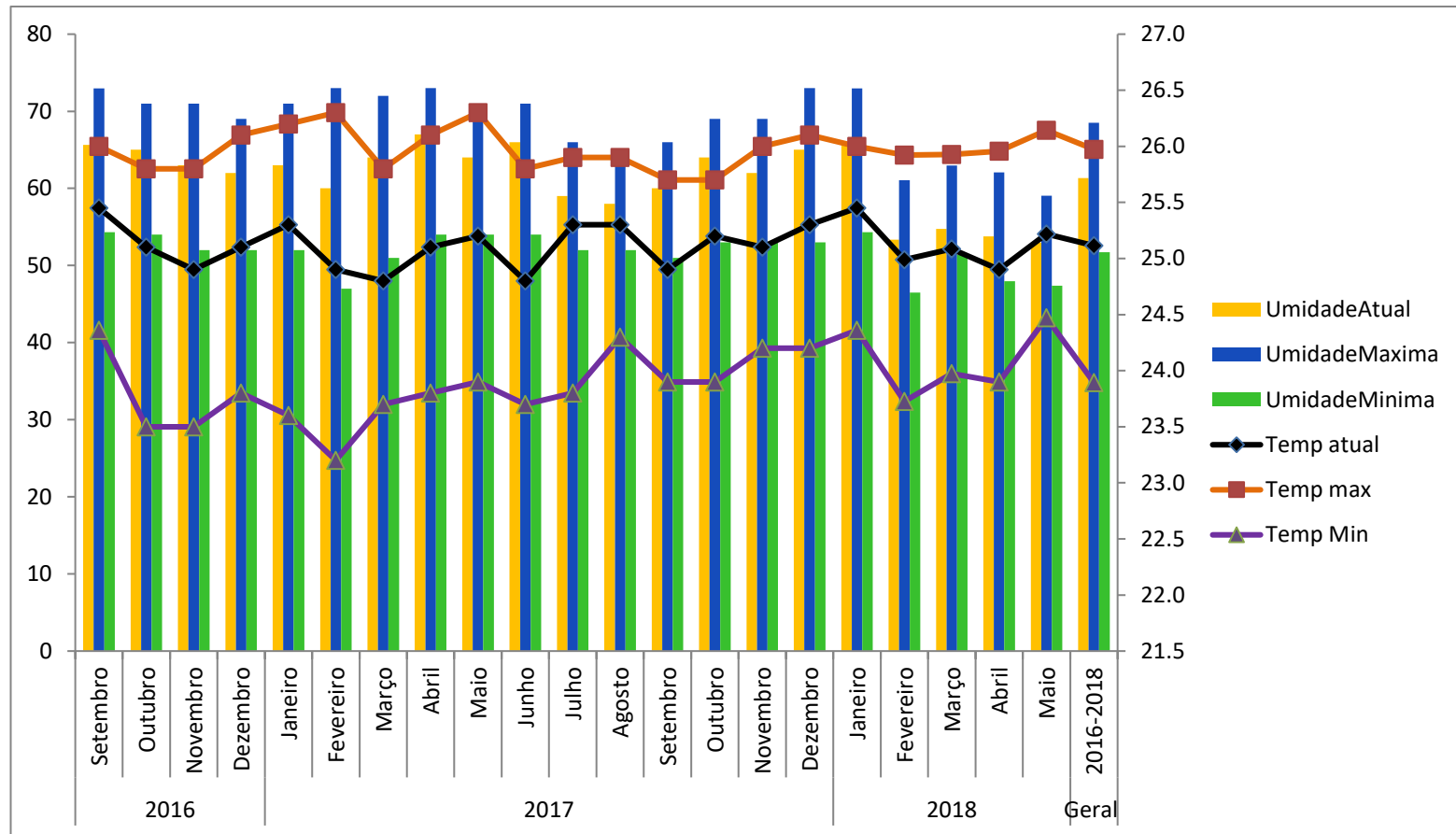
REFERENCES

1. Brito RN, Gorla DE, Diotaiuti L, Gomes ACF, Souza RCM, Abad-Franch F, 2017. Drivers of house invasion by sylvatic Chagas disease vectors in the Amazon-Cerrado transition: a multi-year, state wide assessment of municipality aggregated surveillance data. *PLoS Negl Trop Dis* 11: e0006035.
2. Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson AT, 2012. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological Niche modeling. *J Trop Med* 2012: 1–15.
3. Vaz VC, D'Andrea PS, Jansen AM, 2007. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 134: 1785–1793.
4. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (Brazil), 2015. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Boletim Epidemiológico* 46: ■.
5. Oliveira IAS, Maia AAS, Dantas EC, 2008. Avaliação do controle de qualidade na identificação taxonômica e exame parasitológico de triatomíneos, indicadores de resultados discordantes e positividade, nos anos de 2004 a 2006. *Boletim Epidemiológico Superintendência de Vigilância e Proteção a Saúde do Tocantins* 5: 1–3.
6. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL, 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136: 1509–1528.
7. Sturm NR, Campbell DA, 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 115: 35–43.
8. Zingales B et al., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* sub-specific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240–253.
9. Noireau F, Flores R, Vargas F, 1999. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 13–14.
10. Lent H, Wygodzinsky P, 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 127–520.
11. Gonçalves TC, Teves-Neves SC, Santos-Mallet JR, Carbajal de la Fuente AL, Lopes CM, 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 429–437.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
13. Martins K, Andrade CM, Barbosa-Silva AN, Nascimento GB, Chiari E, Galvão LMC, Câmara ACJ, 2015. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int J Infect Dis* 39: 68–75.
14. Brito RN, Diotaiuti L, Gomes ACF, De Souza RCM, Abad-Franch F, 2017. *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae) in and around houses of Tocantins State, Brazil, 2005–2014. *J Med Entomol* 54: 1771–1774.
15. Mello DA, Borges MM, 1981. Initial discovery of *Triatoma costalimai* naturally infected with *Trypanosoma cruzi*: study of the biological aspects of an isolated sample [article in Portuguese]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 61–69.
16. Mello DA, 1982. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mabaí-Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Saúde Pública* 16: 282–291.
17. Machiner F, Cardoso RM, Castro C, Gurgel-Gonçalves R, 2012. Occurrence of *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae) in different environments and climatic seasons: a field study in the Brazilian savanna. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 567–571.
18. Lorosa ES, Andrade RE, Santos SM, Pereira CA, Vinhaes MC, Jurberg J, 1999. Estudo da infecção natural e fontes alimentares de *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1959. *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 e *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 do estado de Goiás, Brasil, através da técnica de precipitina. *Entomol Vectores* 6: 405–414.
19. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR, 2015. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop* 151: 1–15.
20. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varon JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM, 2015. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* 151: 166–177.

ANEXO C: Temperatura e umidade relativa, máxima e mínima durante o período de observação do ciclo de desenvolvimento de *T. jataí* e *T. costalimai*.

Ano	Mês	Temp	Temp Max	Temp Min	Umidade	Umidade Máxima	Umidade Mínima
2016	Setembro	25,5	26,0	24,4	66	73	54
	Outubro	25,1	25,8	23,5	65	71	54
	Novembro	24,9	25,8	23,5	63	71	52
	Dezembro	25,1	26,1	23,8	62	69	52
2017	Janeiro	25,3	26,2	23,6	63	71	52
	Fevereiro	24,9	26,3	23,2	60	73	47
	Março	24,8	25,8	23,7	64	72	51
	Abril	25,1	26,1	23,8	67	73	54
	Maio	25,2	26,3	23,9	64	71	54
	Junho	24,8	25,8	23,7	66	71	54
	Julho	25,3	25,9	23,8	59	66	52
	Agosto	25,3	25,9	24,3	58	63	52
	Setembro	24,9	25,7	23,9	60	66	51
	Outubro	25,2	25,7	23,9	64	69	53
	Novembro	25,1	26	24,2	62	69	53
	Dezembro	25,3	26,1	24,2	65	73	53
2018	Janeiro	25,5	26,0	24,4	66	73	54
	Fevereiro	25,0	25,9	23,7	53	61	46
	Março	25,1	25,9	24,0	55	63	51
	Abril	24,9	26,0	23,9	54	62	48
	Maio	25,2	26,1	24,5	53	59	47
2016-2018	2016-2018	25,1	26,0	23,9	61	69	52

ANEXO D: Relação temperatura e umidade, máxima e mínima durante o período de observação do ciclo de desenvolvimento de *T. jatai* e *T. costalimai*. Valores de temperatura em °C e umidade %. Temp: Temperatura; Temp max: Temperatura máxima; Temp min: Temperatura mínima.



ANEXO E

ORIGINAL DO ARTIGO RELACIONADO AO TÓPICO 4.4.

Mitochondrial Genes Reveal *Triatoma jatai* as a Sister Species to *Triatoma costalimai* (Reduviidae: Triatominae)

Simone Caldas Teves,* Sueli Gardim, Ana Laura Carbajal de la Fuente, Catarina Macedo Lopes, Teresa Cristina Monte Gonçalves, Jacenir Reis dos Santos Mallet, João Aristeu da Rosa, and Carlos Eduardo Almeida*

Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Departamento de Ciências Biológicas, FCF/UNESP, São Paulo, Brazil; Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São Paulo, Brazil; Laboratorio Ecoepidemiología, Instituto de Ecología, Genética y Evolución (IEGEB–CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Monitoramento Ambiental, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brazil

Abstract. *Triatoma jatai* was described using a set of morphological structures from specimens collected in Paranã municipality of Tocantins State, Brazil. Under a Bayesian framework and using two mitochondrial genes (*16S* and *COI*), phylogenetic analysis recovered *T. jatai* as a sister species to *Triatoma costalimai* with higher genetic distances than between other well-recognized species. Our results agree with previous suggestions based on morphometric analysis. In the light of the non-monophyly of Matogrossensis subcomplex, the inclusion of *T. jatai* shall be considered for reevaluating this group.

The recently described Chagas disease vector, *Triatoma jatai*, occurs in rocky outcrops and currently presents its distribution restricted to the municipality of Paranã, Tocantins State, north of Brazil.¹ The natural environment where *T. jatai* occurs is a target of continuous environmental degradation, such as deforestation and burning activities.

In *T. jatai* description, the authors observed a close relationship with *Triatoma costalimai*. These two species can be differentiated by the size, general color and shape of wings, connexivum, intersegmental sutures, and genital structures, which made it possible to refine the taxonomic key built in 2012² for the inclusion of *T. jatai*. In addition to these morphological similarities, they observed morphometric closeness, suggesting that it should be included in the Matogrossensis subcomplex of the Infestans complex, which previously included *Triatoma baratai*, *T. costalimai*, *Triatoma deaneorum*, *Triatoma guazu*, *Triatoma jurbergi*, *T. matogrossensis*, *Triatoma vandae*, and *Triatoma williami*.³

In the article that brought up *T. jatai* to science, Gonçalves and others¹ evidenced its occurrence in sympatry with *T. costalimai* in limestone outcrops. A close relationship between these two species was also suggested by wing morphometrics.¹ Thus, in this study, two mitochondrial genes (*16S* and *COI*) were sequenced and analyses were run under a Bayesian framework to evaluate the phylogenetic relationships between *T. jatai* and other South American triatomines.

The wild samples of *T. jatai*, *T. costalimai*, and *Triatoma sordida* used in this study are shown in Table 1 and their GenBank accession numbers in Table 2. Evaluate the phylogenetic position of *T. jatai*, we included species representing the six subcomplexes defined in 2009,³ whenever available in GenBank, we added samples from the same

isolate. In addition, the choice of species downloaded from GenBank for running the analysis (Table 2) was based on the monophyletic clade of South American *Triatoma*.^{4,5} *Panstrongylus megistus* was set as the outgroup.

Total DNA extraction was performed according to the protocol described by Sambrook and Russel.⁶ From the extracted DNA, *16S* and *COI* fragments were amplified as described by Sainz and others⁷ and purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Purified products were subjected to a sequencing reaction using BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and were analyzed in the ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK). Resulting sequences were edited with BioEdit (version 7.0.5)⁸ and aligned with ClustalW version 44.⁹ Nucleotide data for *COI* were transformed into amino acid sequences to check the alignment for the presence of pseudogenes.¹⁰

Combined phylogenetic analyses using both genes were run under a Bayesian framework in MrBayes (version 3.1.45).¹¹ We conducted two independent runs of 1 million generations using four Markov chains and sampling trees every 100 generations (discarding the first 25%). The best evolutionary models were chosen by the Akaike information criterion implemented in the jModelTest (version 0.1.1)¹² as follows: for *16S* rDNA, HKY+I+G (nst=2, rates=invgamma) was used; for *COI*, GTR+I+G (nst=6, rates=invgamma) was used, yielding a matrix with 22 taxa and 984 nucleotides. Clade support was estimated by Bayesian posterior probabilities (BPP).

The same haplotype was found for all three *T. jatai* specimens for *16S*, on the other hand, none of the three specimens exhibited the same haplotype for *COI*, but with only five segregating sites. It is in agreement with the faster rate of mutation for *COI* gene.¹³ Phylogenetic analysis recovered *T. jatai* as a sister species to *T. costalimai* with high clade support (BPP = 98%; Figure 1). Results from both genes were congruent, revealing that *T. jatai* and *T. costalimai* exhibit higher *p*-distances than between valid species. For *16S*, the *p*-distances between *T. jatai* and *T. costalimai* were all 0.025. A greater differentiation between *T. jatai* and *T. costalimai* was observed for *COI* (*P* = 0.097–0.100). For both gene fragments, the distances between *T. jatai* and *T. costalimai* were greater than the ones within *Rubrovaria* (*Triatoma rubrovaria*,

*Address correspondence to Simone Caldas Teves, Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: scteves@ioc.fiocruz.br or Carlos Eduardo Almeida, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil, and Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Monitoramento Ambiental, UFPB, Campus IV, Rio Tinto, PB, Brazil, E-mail: almeida_ce@hotmail.com

TABLE 1
Samples of triatomines used in this work

Subcomplex ³	Species	Origin
Matogrossensis	<i>Triatoma jatai_03</i>	Paraná, TO
	<i>T. jatai_05</i>	Paraná, TO
	<i>T. jatai_16</i>	Paraná – TO
	<i>Triatoma costalimai_06</i>	Aurora do Tocantins, TO
	<i>T. costalimai_09</i>	Aurora do Tocantins, TO
	<i>Triatoma williami_04</i>	Barra do Garças, MT
Sordida	<i>T. williami_05</i>	Barra do Garças, MT
	<i>Triatoma sordida_PAR03</i>	Paranaíba, MS
	<i>T. sordida_ITA24</i>	Itaobim, MG

TO, MT, MS, and MG are Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, and Minas Gerais states, respectively.

Triatoma circummaculata, and *Triatoma caracavalloii*) and Infestans subcomplexes (*Triatoma infestans*, *Triatoma platensis*, and *Triatoma delpontei*).

When a taxonomic unit is described, it is important to undertake studies to increase knowledge for the entity in all grounds. Phylogenetic analysis of *T. jatai* based on mitochondrial genes demonstrated the close genetic relationship between *T. jatai* and *T. costalimai*, as it has been initially evidenced by morphological characters and geometric morphometrics of wings.¹ Despite the distinctions in taxa set, the topologic position for the remaining species in our tree was similar to the source from where they were downloaded,^{4,5} as expected.

Evaluating the evolutionary relationships of newly described or sylvatic species is crucial for understanding their vector role in Chagas disease epidemiology.^{4,5,14} In addition, the taxonomic validity of closely related species is sometimes a matter of questioning,^{15,16} and molecular approaches must accomplish a good dataset on distinct grounds. The large number of mutations that *T. jatai* have accumulated in regard to *T. costalimai* suggests a longer term separation than among members of

TABLE 2

Accession codes from GenBank sequences of *Triatoma* and outgroup species used in the phylogenetic analysis

Subcomplex ³	Species	16S	COI
Brasiliensis	<i>Triatoma brasiliensis</i>	KC248985	KC249318
	<i>Triatoma sherlocki</i>	KC249068	KC249377
Infestans	<i>Triatoma infestans</i>	KC249014	KC249348
	<i>Triatoma platensis</i>	KC249363	KC249047
	<i>Triatoma delpontei</i>	KC249332	KC249001
Maculata	<i>Triatoma maculata</i>	AF324524	AF449139
Matogrossensis	<i>Triatoma jatai_03</i>	KT601153	KT601162
	<i>T. jatai_05</i>	KT601154	KT601163
	<i>T. jatai_16</i>	KT601155	KT601164
	<i>Triatoma costalimai_06</i>	KT601151	KT601160
	<i>T. costalimai_09</i>	KT601152	KT601161
	<i>Triatoma williami_04</i>	KT601156	KT601165
	<i>T. williami_05</i>	KT601157	KT601166
	<i>T. costalimai</i>	KC571993	KC249327
	<i>Triatoma matogrossensis</i>	KC249036	KC249359
	<i>T. matogrossensis</i>	KC249038	KC249361
	<i>Triatoma guazu</i>	KC571994	KC608984
	<i>Triatoma vandae</i>	KC571997	KC608989
	Rubrovaria	<i>Triatoma caracavalloii</i>	KC248990
<i>Triatoma circummaculata</i>		KC248994	KC249323
<i>Triatoma rubrovaria</i>		KC249066	KC249375
Sordida	<i>Triatoma guasayana</i>	KC249342	KC249010
	<i>Triatoma sordida</i>	KC249077	KC249386
	<i>T. sordida PAR03</i>	KT601158	KT601167
	<i>T. sordida ITA 24</i>	KT601159	KT601168
Outgroup	<i>Panstrongylus megistus</i>	KC248975	KC249312

Sequences obtained in this study are given in bold.

Infestans subcomplex. Morphological features evaluated for the sympatric *T. jatai* and *T. costalimai*¹ are supported by our results and confirm the status of *T. jatai*. What is more, by using 143 field samples of *T. jatai*, 113 of *T. costalimai* and other triatomine species, these authors addressed the close relationship between *T. jatai* and *T. costalimai*, in agreement with our results.

Mitochondrial genes are easy to sequence and have historically provided great contribution for phylogenetic reconstruction among triatomines.^{4,10,14} However, Mas-Coma and Bargues¹³ brought up some limitation for inferences on closely related taxa based on mitochondrial genes, particularly when dealing with sympatric or parapatric species without a clear barrier of isolation. These limitations rely mainly on introgression (sometimes followed by mitochondrial selection), complex population structure, and sex-biased gene flow. Taking into account some weakness of mitochondrial genome for inferences, the further use of nuclear markers (e.g., nuclear ribosomal DNA) is important. It is worth mentioning that females of *T. jatai* exhibit shorter wings, and are probably unable to fly, as observed by Almeida and others for *Triatoma sherlocki*,¹⁷ also a brachypterous species. The sessile characteristic for females must be taken into account for further population genetic studies.

Recently, Alevi and others¹⁸ described the Matogrossensis subcomplex cytogenetically and observed that the species of this subcomplex have the same cytogenetic characteristics as the species of the Rubrovaria subcomplex. Gardim and others¹⁰ and Justi and others⁵ have already brought up the non-monophyly of the Matogrossensis subcomplex. Hence, *T. jatai* shall be considered for reevaluating this group. Because some clades did not have high clade support within this subcomplex,¹⁰ we recommend the use of longer genes, a more complete species set, and multiple molecular markers, also containing nuclear genes. We also strongly recommend studies on the biological cycle, reproductive compatibility between *T. jatai* and *T. costalimai* as well as morphological studies of nymphs and antennal phenotype.

Received May 28, 2015. Accepted for publication November 3, 2015.

Published online January 19, 2016.

Note: Supplemental table appears at www.ajtmh.org.

Financial support: The study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (process nos. 2010/50.355-1, 2010/17027-0, and 2011/22378-0, FAPESP, Brazil).

Disclosure: Ana Laura Carbajal de La Fuente is a member of the “Consejo Nacional de Ciencia y Técnica de la República Argentina” (CONICET) Researcher’s Career.

Authors’ addresses: Simone Caldas Teves, Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, E-mail: scteves@ioc.fiocruz.br. Sueli Gardim, Departamento de Ciências Biológicas, FCF/UNESP, São Paulo, Brazil, E-mail: sugardim@gmail.com. Ana Laura Carbajal de la Fuente, Laboratorio de Ecoepidemiología, Instituto de Ecología, Genética y Evolución (IEGEB-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, E-mail: analauro.carbajal@gmail.com. Catarina Macedo Lopes, Teresa Cristina Monte Gonçalves, and Jacenir Reis dos Santos Mallet, Laboratório Interdisciplinar em Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, E-mails: aniratac@ioc.fiocruz.br, tcmonte@ioc.fiocruz.br, and jacenir@ioc.fiocruz.br. João Aristeu da Rosa, Departamento de Ciências Biológicas, FCF/UNESP, São Paulo, Brazil,

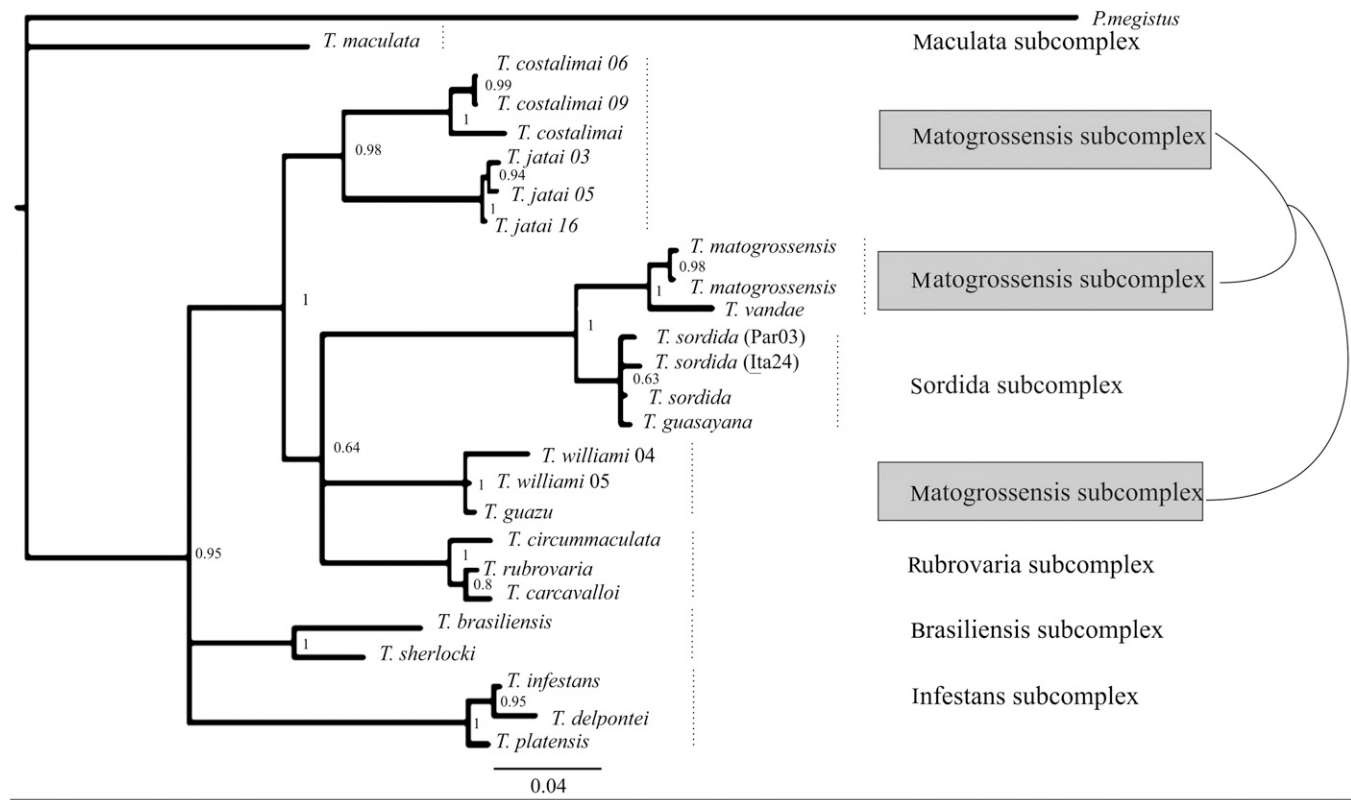


FIGURE 1. Bayesian inference consensus of the combined analysis of sequences of *Triatoma* species focused on *Triatoma jatai* based on *16S* and *COI* genes. Molecular evolution models for each partition were HKY+I+G for *16S* (444 bp) and GTR+I+G for *COI* (492 bp). Numbers above the nodes indicate Bayesian posterior probabilities. *Panstrongylus megistus* was selected as out-group.

E-mail: rosaja@fcfar.unesp.br. Carlos Eduardo Almeida, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Monitoramento Ambiental, UFPB, Rio Tinto, Paraíba, Brazil, E-mail: almeida_ce@hotmail.com.

REFERENCES

- Gonçalves TC, Teves-Neves SC, Santos-Mallet JR, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM, 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 429–437.
- Obara MT, Barata JMS, da Rosa JA, Almeida PS, Gonçalves GA, Dale C, Gurgel-Gonçalves R, 2012. Description of the female and new records of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) from Mato Grosso do Sul, Brazil, with a key to the species of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex. *Zootaxa* 3151: 63–68.
- Schofield CJ, Galvão C, 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88–100.
- Gardim S, Almeida CE, Takiya DM, Oliveira J, Araújo RF, Cicarelli RMB, da Rosa JA, 2014. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infect Genet Evol* 23: 74–79.
- Justi SA, Russo CA, Mallet JR, Obara MT, Galvão C, 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit Vectors* 7: 149.
- Sambrook J, Russell DW, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, García BA, 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 121: 229–240.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95–98.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- Gardim S, Rocha CS, Almeida CE, Takiya DM, da Silva MT, Ambrósio DL, Cicarelli RMB, da Rosa JA, 2013. Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic *Triatoma* in central-western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 89: 766–774.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Posada D, 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25: 1253–1256.
- Mas-Coma S, Bargues MD, 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop* 110: 112–136.
- Hypsa V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego RO, Galvao C, Jurberg J, 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 23: 447–457.
- Monteiro FA, Costa J, Solé-Cava AM, 1998. Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Ann Trop Med Parasitol* 92: 897–900.
- Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo-ON Palomeque FS, Dale C, Chaverra D, Monteiro FA, 2013. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108 (Supp 1): 92–99.
- Almeida CE, Oliveira HL, Correia N, Dornak LL, Gumiel M, Neiva VL, Harry M, Mendonça VJ, Costa J, Galvão C, 2012. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Trop* 122: 71–79.
- Alevi KCC, de Oliveira J, Moreira FF, Jurberg J, da Rosa JA, de Azeredo-Oliveira MTV, 2015. Chromosomal characteristics and distribution of constitutive heterochromatin in the *Matogrossensis* and *Rubrovaria* subcomplexes. *Infect Genet Evol* 33: 158–162.

SUPPLEMENTAL TABLE 1

Uncorrected pairwise divergences between taxa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
Uncorrected <i>p</i> -distances for the <i>16S</i> mitochondrial rDNA																									
1	<i>Triatoma costalimai_06</i>																								
2	<i>T. costalimai_09</i>	0.000																							
3	<i>Triatoma jatai_03</i>	0.025	0.025																						
4	<i>T. jatai_05</i>	0.025	0.025	0.000																					
5	<i>T. jatai_16</i>	0.025	0.025	0.000	0.000																				
6	<i>Triatoma matogrossensis</i>	0.046	0.046	0.053	0.053	0.053																			
7	<i>Triatoma williamsi_04</i>	0.032	0.032	0.048	0.048	0.048	0.050																		
8	<i>T. williamsi_05</i>	0.032	0.032	0.048	0.048	0.048	0.050	0.000																	
9	<i>Triatoma sordida_PAR03</i>	0.039	0.039	0.046	0.046	0.046	0.021	0.043	0.043																
10	<i>T. sordida_ITA24</i>	0.039	0.039	0.046	0.046	0.046	0.021	0.043	0.043	0.000															
11	<i>Triatoma brasiliensis</i>	0.041	0.041	0.050	0.050	0.050	0.062	0.053	0.055	0.055															
	KC248985_KC249318																								
12	<i>Triatoma sherlocki</i>	0.037	0.037	0.039	0.039	0.039	0.059	0.048	0.048	0.048	0.021														
	KC249068.1_KC249377																								
13	<i>Triatoma maculata</i>	0.037	0.037	0.046	0.046	0.046	0.060	0.039	0.039	0.053	0.053	0.044													
	AF324524.1_AF449139.1																								
14	<i>Triatoma circummaculata</i>	0.041	0.041	0.055	0.055	0.055	0.053	0.048	0.048	0.046	0.055	0.046	0.060												
	KC248994.1_KC249323																								
15	<i>Triatoma rubrovaria</i>	0.037	0.037	0.046	0.046	0.046	0.053	0.048	0.048	0.046	0.041	0.055	0.009												
	KC249066.1_KC249375																								
16	<i>Triatoma carvalhoi</i>	0.041	0.041	0.050	0.050	0.050	0.057	0.048	0.048	0.055	0.050	0.046	0.060	0.014	0.005										
	KC248990.1_KC249322																								
17	<i>Triatoma infestans</i>	0.041	0.041	0.048	0.048	0.048	0.066	0.066	0.066	0.064	0.064	0.055	0.057	0.053	0.048	0.053									
	KC249014_KC249348																								
18	<i>Triatoma platensis</i>	0.053	0.053	0.055	0.055	0.055	0.062	0.064	0.064	0.059	0.055	0.050	0.055	0.055	0.050	0.055	0.030								
	KC249363_KC249047																								
19	<i>Triatoma delponiei</i>	0.041	0.041	0.048	0.048	0.048	0.066	0.066	0.066	0.064	0.064	0.055	0.057	0.053	0.048	0.053	0.000	0.030							
	KC249332_KC249001.1																								
20	<i>T. sordida</i>	0.041	0.041	0.048	0.048	0.048	0.018	0.041	0.041	0.002	0.057	0.050	0.055	0.057	0.053	0.057	0.066	0.062	0.066						
	KC249077.1_KC249386																								
21	<i>Triatoma guasayana</i>	0.046	0.046	0.053	0.053	0.053	0.014	0.046	0.046	0.007	0.062	0.055	0.060	0.053	0.057	0.062	0.071	0.066	0.071	0.005					
	KC249342_KC249010																								
22	<i>T. matogrossensis</i>	0.046	0.046	0.053	0.053	0.053	0.007	0.050	0.050	0.016	0.062	0.060	0.060	0.053	0.053	0.057	0.064	0.062	0.064	0.014	0.011				
	KC249036.1_KC249361																								
23	<i>T. costalimai</i>	0.020	0.020	0.032	0.032	0.032	0.067	0.044	0.044	0.063	0.063	0.056	0.048	0.052	0.056	0.044	0.044	0.060	0.067	0.060	0.063	0.071	0.068		
	KC571993_KC249327																								
24	<i>Panstrongylus megistus</i>	0.094	0.094	0.087	0.087	0.087	0.117	0.108	0.108	0.115	0.092	0.089	0.094	0.108	0.099	0.103	0.094	0.094	0.094	0.117	0.122	0.113	0.124		
	KC248975_KC249312																								

Uncorrected *p*-distances for *COI* gene of mitochondrial DNA

1	<i>T. costalimai_06</i>																								
2	<i>T. costalimai_09</i>	0.000																							
3	<i>T. jatai_03</i>	0.100	0.100																						
4	<i>T. jatai_05</i>	0.097	0.097	0.009																					
5	<i>T. jatai_16</i>	0.097	0.097	0.006	0.004																				
6	<i>T. matogrossensis</i>	0.129	0.129	0.129	0.123	0.127																			
7	<i>T. williamsi_04</i>	0.139	0.139	0.124	0.120	0.118	0.150																		
8	<i>T. williamsi_05</i>	0.119	0.119	0.108	0.108	0.106	0.129	0.040																	

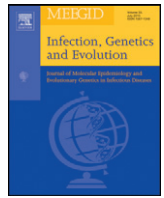
(continued)

SUPPLEMENTAL TABLE 1
Continued

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
9 <i>T. sordida</i> _PAR03	0.134	0.134	0.121	0.112	0.116	0.061	0.143	0.131																	
10 <i>T. sordida</i> _ITA24	0.134	0.134	0.123	0.114	0.117	0.057	0.146	0.138	0.019																
11 <i>T. brasiliensis</i> KC248985_KC249318	0.161	0.161	0.146	0.144	0.148	0.157	0.152	0.125	0.148	0.142															
12 <i>T. sherlocki</i> KC249068.1_KC249377	0.148	0.148	0.139	0.139	0.136	0.166	0.161	0.133	0.163	0.086															
13 <i>T. maculata</i> AF324524.1_AAF49139.1	0.171	0.171	0.171	0.163	0.165	0.171	0.185	0.171	0.165	0.162	0.162	0.164													
14 <i>T. circummaculata</i> KC248994.1_KC249323	0.110	0.110	0.117	0.119	0.116	0.125	0.105	0.091	0.125	0.129	0.134	0.145	0.171												
15 <i>T. rubrovaria</i> KC249066.1_KC249375	0.110	0.110	0.114	0.108	0.112	0.121	0.110	0.093	0.117	0.117	0.123	0.133	0.163	0.027											
16 <i>T. carcavalloi</i> KC248990.1_KC249322	0.108	0.108	0.116	0.114	0.114	0.131	0.116	0.095	0.127	0.127	0.131	0.136	0.171	0.028	0.017										
17 <i>T. infestans</i> KC249014_KC249348	0.153	0.153	0.144	0.148	0.146	0.189	0.165	0.146	0.186	0.182	0.150	0.145	0.186	0.140	0.142	0.144									
18 <i>T. platensis</i> KC249363_KC249047	0.157	0.157	0.140	0.144	0.142	0.186	0.162	0.142	0.182	0.178	0.146	0.139	0.186	0.140	0.142	0.144	0.004								
19 <i>T. delponteii</i> KC249332_KC249001.1	0.152	0.152	0.140	0.144	0.142	0.180	0.152	0.140	0.184	0.176	0.148	0.139	0.179	0.142	0.144	0.146	0.028	0.025							
20 <i>T. sordida</i> KC249077.1_KC249386	0.136	0.136	0.121	0.112	0.116	0.059	0.144	0.136	0.006	0.017	0.148	0.166	0.167	0.123	0.119	0.129	0.184	0.180	0.182						
21 <i>T. guasayana</i> KC249342_KC249010	0.138	0.138	0.127	0.117	0.121	0.059	0.146	0.134	0.009	0.017	0.146	0.169	0.165	0.125	0.121	0.131	0.188	0.184	0.186	0.008					
22 <i>T. matogrossensis</i> KC249036.1_KC249361	0.129	0.129	0.129	0.123	0.127	0.000	0.150	0.129	0.061	0.057	0.157	0.166	0.171	0.125	0.121	0.131	0.189	0.186	0.180	0.059	0.059				
23 <i>T. costalimai</i> KC571993_KC249327	0.032	0.032	0.110	0.102	0.106	0.129	0.148	0.121	0.140	0.142	0.157	0.151	0.171	0.129	0.121	0.119	0.155	0.159	0.157	0.144	0.146	0.129			
24 <i>P. megistis</i> KC248975_KC249312	0.174	0.174	0.169	0.167	0.167	0.189	0.186	0.176	0.188	0.189	0.167	0.186	0.133	0.180	0.182	0.189	0.174	0.176	0.172	0.191	0.189	0.189	0.176		

ANEXO F

**ARTIGO PUBLICADO PELA AUTORA RELACIONADO COM ESTA TESE,
MAS QUE NÃO INTEGRA A MESMA.**



Research paper

New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae)



Sebastián Pita^a, Pedro Lorite^b, Julieta Nattero^{c,1}, Cleber Galvão^d, Kaio C.C. Alevi^e, Simone C. Teves^{f,g}, Maria T.V. Azeredo-Oliveira^e, Francisco Panzera^{a,*}

^a Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Departamento de Biología Experimental, Área de Genética, Universidad de Jaén, Jaén, Spain

^c Cátedra de Introducción a la Biología, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT), Universidad Nacional de Córdoba (UNC-CONICET), Córdoba, Argentina

^d Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (IBILCE-UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

^f Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera (LIVEDIH), Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^g Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2016

Received in revised form 18 May 2016

Accepted 19 May 2016

Available online 28 May 2016

Keywords:

Triatominae

Chagas disease vectors

Holocentric chromosomes

Location changes of rDNA clusters

FISH

ABSTRACT

The hemipteran subfamily Triatominae includes 150 blood-sucking species, vectors of Chagas disease. By far the most speciose genus is *Triatoma*, assembled in groups, complexes and subcomplexes based on morphological similarities, geographic distribution and genetic data. However, many molecular studies questioned the species integration of several subcomplexes as monophyletic units. In triatomines, chromosomal position of major ribosomal DNA (rDNA) loci is extremely variable but seems to be species-specific and an evolutionary conserved genetic trait, so that closely related species tend to have ribosomal clusters in the same chromosomal location. Considering that the autosomal position as the ancestral character for all heteropteran species, including triatomines, we suggest that the movement of rDNA loci from autosomes to sex chromosomes rapidly established reproductive barriers between divergent lineages. We proposed that the rDNA translocation from the autosomes to the sex chromosomes restrict reproductive compatibility and eventually promote speciation processes. We analyzed the chromosomal position of 45S rDNA clusters in almost all species of the *matogrossensis*, *rubrovaria*, *maculata* and *sordida* subcomplexes. The fluorescent in situ hybridization results are discussed considering the available genetic data and we proposed new arrangements in the species that constitute each one of these subcomplexes.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Triatomines are blood-sucking insects which are well known for being vectors of Chagas disease or American trypanosomiasis. This illness is considered as the most serious human parasitic disease of Latin America with around 6–7 million infected people (WHO, 2016). In the absence of vaccines or adequate drugs for large-scale treatment, the reduction of disease burden critically depends on the control of vector

transmission by triatomines. Given so, a correct taxonomic identification of species is extremely important for successful control campaigns.

The subfamily Triatominae includes 150 species in 15 to 18 genera, being by far the more frequent the *Triatoma* genus with 73 species (Galvão and Paula, 2014). Historically, several authors have assembled the *Triatoma* species in different groups and complexes based on their external characters and the genitalia of both sexes (Ryckman, 1962; Usinger et al., 1966; Lent and Wygodzinsky, 1979; Carcavallo et al., 2000). Currently, the most accepted grouping was proposed by Schofield and Galvão (2009), which subdivides *Triatoma* species in groups, complexes and subcomplexes based on morphological similarities, geographic distribution and genetic data. Although complex and subcomplexes are not considered as taxonomic categories for the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 1999) its application on Triatominae attempt to reveal phylogenetic relationships. This

* Corresponding author at: Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo, Uruguay.

E-mail address: fcopanzera@gmail.com (F. Panzera).

¹ Current address: Laboratorio de Eco-Epidemiología, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (IEGEB-UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina.

means that a subcomplex species represents a monophyletic unit including evolutionarily closed related species derived from a common ancestor. The establishment of monophyletic assemblages is very important in order to infer possible common attributes related to their biology, epidemiological significance and response to control interventions (Schofield and Galvão, 2009). Within *Triatoma* genus, these authors recognized 14 monophyletic units, most of them supported with different genetic analyses. However, new studies based on comparisons of DNA sequences question the species integration of several subcomplexes. These questions mainly involves almost all *Triatoma* subcomplexes from South America, such as *brasiliensis* (Gardim et al., 2014), *maculata* (Dos Santos et al., 2007; Carbajal de la Fuente et al., 2008), *matogrossensis* (Gardim et al., 2013; Teves et al., 2016) and *rubrovaria* (Noireau et al., 2002; Almeida et al., 2009; Justi et al., 2014).

Triatominae subfamily species, similar to other heteropterans have holocentric chromosomes, i.e. chromosomes with diffuse or non-localized centromeres (Hughes-Schrader and Schrader, 1961). The absence of a primary constriction and their homogeneity in their autosomal number limited comparative and evolutionary chromosomal studies (Panzer et al., 2010). As a taxonomic tool, banding techniques application has been a valuable for karyotypic differentiation and to detect cryptic species, particularly in *sordida* subcomplex (Panzer et al., 1997, 2015). Recent application of fluorescent in situ hybridization (FISH) to determine the chromosomal position of major ribosomal clusters shows that this trait is species-specific and also with a striking inter-specific variability, revealing an extraordinary dynamics of change in the genomes during the evolution in this insect group (Panzer et al., 2012). Ribosomal ribonucleic acid (rRNA) is the main structural and catalytic component of the ribosome, being essential for protein synthesis in all living organisms. It is indispensable for cell viability and is one of only a few gene products present in all cells. In eukaryotes, the genes encoding ribosomal RNA (rDNA) are present in multiple copies, arranged as clusters and located in one or more chromosomes, named nucleolar chromosomes. Typically, each repeat unit of the major ribosomal cluster (45S rDNA) contains three regions encoding the 18S, 5.8S and 28S rRNAs.

In a wide range of organisms, including fungi, animals and plants, the location, size and degree of repetition of the basic repeat unit are highly variable. However, the nucleotide sequences of the coding regions are evolutionarily highly preserved by concerted evolution and they are frequently used to develop DNA probes that allow the chromosome location of the rDNA loci by FISH (reviewed in Richard et al., 2008). In different insect groups, such as Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera and Orthoptera, the distribution of these conserved rDNA clusters can be apply for the establishment of physical maps with phylogenetic and evolutionary goals (Hirai et al., 1996; Proença et al., 2005; Roy et al., 2005; Cabrero and Camacho, 2008; Cabral de Mello et al., 2011; Šíchová et al., 2013).

In Heteroptera order, FISH analyses of a hundred species from 38 genera showed that the rDNA clusters are restricted to one or two loci per haploid genome. The chromosomal position is extremely variable; on a pair of autosomes (exceptionally 2), on m-chromosomes, on one or two sex chromosomes or simultaneously on a pair of autosomes and the X chromosome. The most predominant location is on one autosomal pair, recorded in species with different chromosome numbers and sex chromosome systems, involving eight of ten studied families including the most ancient groups (Grozeva et al., 2015), being considered as an ancestral character of the Heteroptera order. In spite of that ribosomal loci are regularly inherited by Mendelian fashion, changes in the position of rDNA loci are often originated by chromosomal rearrangements such as fusions, fissions or translocations. In some ants and heteropteran species, these changes may imply modifications in the chromosome number (Hirai et al., 1996; Bressa et al., 2009). However, in *Triatominae*, given that the number of autosomes remains almost unaffected (almost all species have 20 autosomes), we can rule out that these chromosomal rearrangements are responsible for variation of

rDNA position. Inter-chromosomal mobility of rDNA by other mechanisms such as ectopic recombination and transposition is frequently reported in several insect groups (Cabrero and Camacho, 2008; Nguyen et al., 2010; Cabral de Mello et al., 2011) that could be also the origin of the rDNA location changes observed in Heteroptera (Panzer et al., 2012). In *Triatominae*, chromosomal position of rDNA loci seems to be an evolutionary conserved genetic trait, so that closely related species tend to have the ribosomal genes in the same chromosomal location (Panzer et al., 2012, 2015).

In the current paper, we analyzed the 45S rDNA clusters chromosomal position in almost all species of the *matogrossensis*, *rubrovaria*, *maculata* and *sordida* subcomplexes, using an 18S rDNA probe isolated from *Triatoma infestans*. Our FISH results are discussed considering genetic data available and we proposed new arrangements in the species that constitute each one of these subcomplexes.

2. Materials and methods

In this paper we compared the 45S rDNA clusters chromosomal location in 21 of the 25 recognized species of *matogrossensis*, *rubrovaria*, *maculata* and *sordida* subcomplexes, ten of them described here for the first time (Table 1). About previously reported species, we improve our analysis including new populations. The four misplaced species (*Triatoma deanorum*, *Triatoma limai*, *Triatoma oliveirai*, and *Triatoma arthurneivai*) were not analyzed because of the great difficulty to collect and keep them alive in insectariums (Noireau et al., 2002). Geographical origin, number of individuals analyzed and results about the chromosome location of ribosomal clusters are detailed on Table 1, including previous FISH data.

FISH was carried out using squashed gonad preparations. The gonads were extracted from living adult insects and fixed in ethanol-acetic acid (3:1). FISH procedure was applied using as probe an 18S rDNA fragment of 807-bp isolated from *T. infestans* from Uruguay as described by Panzer et al. (2012). Chromosome slides were examined under a Nikon Eclipse 80i microscope and the images were obtained with a DS-5Mc-U2 digital camera. For each specimen, at least 20 cells in meiotic (metaphase I, II or diplotene) or mitotic divisions were analyzed to determine 45S rDNA clusters chromosomal location. Images were processed with the Adobe Photoshop® software.

3. Results

All species from *matogrossensis*, *rubrovaria*, *maculata* and *sordida* subcomplexes present the same diploid chromosome number of 22 chromosomes, constituted by 20 autosomes plus two sex chromosomes (XY in males and XX in females). In all species, the Y chromosome presents an intermediate size and always appears C-heterochromatic.

The 45S rDNA cluster has 1 or 2 chromosome loci per haploid genome, showing three location patterns: on one autosomal pair (14 species) (Fig. 1A, B and C), on the X and Y chromosomes (5 species) (Fig. 1D and E) and on the X chromosome (2 species) (Fig. 1F). Each analyzed species presented only one rDNA location pattern; intraspecific variation was not observed. In species that show the ribosomal clusters on both sex chromosomes, the X chromosome signal is much more intense than that observed in the Y chromosome (Fig. 1E), except in *T. jurbergi* which both sex chromosomes have similar signal intensity (Fig. 1D). In all cases, the hybridization signals were located in a terminal or sub-terminal chromosomal position. FISH results are summarized in Table 1, including new and previous data.

Considering the subcomplexes until now recognized (Table 1), all *rubrovaria* subcomplex species are homogenous in their ribosomal clusters chromosomal location, presenting the rDNA signals on an autosomal pair (Fig. 1A). On the contrary, *matogrossensis*, *maculata* and *sordida* subcomplexes include species with rDNA clusters in different chromosomes. *Matogrossensis* and *maculata* subcomplex species present two ribosomal patterns: some species with 45S rDNA on an

Table 1

Geographical origin of analyzed species and chromosomal location of 45S rDNA clusters by fluorescent in situ hybridization (FISH), according to the subcomplexes proposed by Schofield and Galvão (2009). Between brackets we included the number of individuals analyzed. LNIRTT = Laboratório Nacional e Internacional de Referencia em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; LIVEDIH = Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. CE = Ceará; GO = Goiás, MG = Minas Gerais; MS = Mato Grosso do Sul; MT = Mato Grosso; ND = not determined RS = Rio Grande do Sul; RO = Roraima; SP = São Paulo, TO = Tocantins; D = domestic; P = peridomestic; S = sylvatic.

Species	Geographical origin	45S rDNA location
Rubrovaria subcomplex		
<i>T. carvalhoi</i>	São Jerônimo, RS, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^b
<i>T. circummaculata</i>	Cerro Largo, Uruguay. S. [2]	One autosomal pair ^d
	Vila São Jerônimo, RS, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^d
<i>T. klugi</i>	Nova Petrópolis, RS, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^d
<i>T. rubrovaria</i>	Artigas, Uruguay. S. [2]	One autosomal pair ^b
	ND. Araraquara (SP) & LNIRTT insectaries. [10]	One autosomal pair ^a
<i>T. pintodiasi</i>	Caçapava do Sul, RS, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^d
Matogrossensis subcomplex		
<i>T. baratai</i>	Corumbá, MS, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^d
<i>T. costalimai</i>	Posse, GO, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^d
	Aurora de Tocantins, TO, Brazil. LIVEDIH. [2]	One autosomal pair ^d
<i>T. guazu</i>	Barra do Garças, MT, Brazil. LNIRTT. [3]	One autosomal pair ^d
<i>T. jatai</i>	Paraná, TO, Brazil. LIVEDIH. [3]	One autosomal pair ^d
<i>T. williami</i>	Fazenda Nova, GO, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^d
	Barra do Garças, MT, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^d
<i>T. jurbergi</i>	Alto Garças, MT, Brazil. LNIRTT. [3]	X & Y chromosomes ^d
<i>T. matogrossensis</i>	Serra das Arenas, MT, Brazil. LNIRTT. [3]	X & Y chromosomes ^b
	ND. Araraquara (SP) & LNIRTT insectaries. [11]	X & Y chromosomes ^a
<i>T. vandae</i>	Rondonópolis, MT, Brazil. LNIRTT. [3]	X & Y chromosomes ^b
Maculata subcomplex		
<i>T. maculata</i>	Boa Vista, RO, Brazil. P. [2]	X & Y chromosomes ^b
	Bolívar, RO, Venezuela. LNIRTT. [2]	X & Y chromosomes ^d
<i>T. pseudomaculata</i>	Sobral, CE, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^b
	Alem Paraíba, MG, Brazil. S. [2]	One autosomal pair ^d
<i>T. wygodzinsky</i>	São João da Boa Vista, SP, Brazil. S. [2]	One autosomal pair ^b
	Espírito Santo do Pinhal, SP, Brazil. LNIRTT. [2]	One autosomal pair ^d
Sordida subcomplex		
<i>T. sordida Argentina</i>	Populations from Argentina, Bolivia & Paraguay. D, P, S. [29]	X & Y chromosomes ^c
<i>T. sordida sensu stricto</i>	Populations from Brazil, Bolivia & Paraguay. D, P. [34]	X chromosome ^{b,c}
<i>T. garciabesi</i>	Populations from Argentina, Bolivia & Paraguay. P, S. [39]	X chromosome ^{b,c}
<i>T. patagonica</i>	9 de julio, Santa Fe, Argentina. P. [4]	One autosomal pair ^d
	Mitre, Santiago del Estero, Argentina. P. [4]	One autosomal pair ^d
	San Martín, San Luis, Argentina. P. [1]	One autosomal

Table 1 (continued)

Species	Geographical origin	45S rDNA location
	Utracán, La Pampa, Argentina, P. [3]	pair ^d
	Avellaneda, Rio Negro, Argentina, P. [3]	One autosomal pair ^d
<i>T. guasayana</i>	Populations from Argentina & Bolivia. S. [24]	One autosomal pair ^c

FISH data from Bardella et al. (2010)^a, Panzera et al. (2012)^b, Panzera et al. (2015)^c and this paper^d.

autosomal pair (Fig. 1B), while other carry them on both sex chromosomes (X and Y) (Fig. 1D). Sordida subcomplex species have three ribosomal patterns: on an autosomal pair (Fig. 1C), on both sex chromosomes (Fig. 1E) or on one sex chromosome (X chromosome) (Fig. 1F).

4. Discussion

4.1. Chromosomal location of rDNA clusters as taxonomic marker

In the 47 Triatomini tribe species currently studied, including ten species here described for the first time, the most frequent location of the rDNA is on one autosomal pair (30 species), usually the largest one, so it could be considered as ancestral for this group. The movement of the ribosomal clusters from autosomes to one (8 species) or both sex chromosomes (7 species) would be a secondary change, so the location of rDNA loci on sex chromosomes should be considered as an apomorphic character. Since the location of the rDNA loci on one or both sex chromosomes is observed in phylogenetically distant triatomini groups (*Dipetalogaster*, *Eratyrs*, *Mepraia* and several *Triatoma* species), it is likely that the transfer of rDNA loci from autosomes to sex chromosomes occurred several times during the evolution of this group. Analysis of rDNA loci in Triatomini suggests that each species tend to fix its chromosomal position (character species-specific), so that groups with a common ancestry tend to have the same chromosomal location for rDNA loci.

4.2. Changes of location of rDNA clusters as an isolation mechanism and promoter of speciation

Such as observed in other insects, the movements of rDNA clusters from autosomal to sex chromosomal positions could alter the dynamics of gene recombination as well as the gene flow, genetic differentiation and speciation (Sætre et al., 2003). The genes residing on the X chromosome present a very different environment than autosomal genes in terms of gene expression and natural selection (Vicoso and Charlesworth, 2006). Recombination rates vary widely depending on the genomic position (autosomes or sex chromosomes) and the linkage with genes under selection. Since the sex chromosomes in male triatomines are asynaptic and achiasmatic (Solari, 1979), their rates of homologous recombination are reduced by half for the X chromosomes (which occurs only in females) and to virtually zero for the Y chromosome. In addition, the hemizygoty of the X chromosome in males will greatly increase the selection of recessive mutations, differentiating thus the rate of mutational changes between the autosomes and sex chromosomes. This can result in faster adaptive evolution of X chromosomes (the faster X effect) (Kaiser and Bachtrog, 2010). As the result of reduced recombination, genetic barriers to gene flow may arise rapidly between populations which fixed sex chromosomal variants. Similar as suggested in lepidopteran speciation (Šichová et al., 2013), the reduced recombination of sex chromosomes enable the accumulation of genetic incompatibilities and leads to divergence and speciation in triatomines.

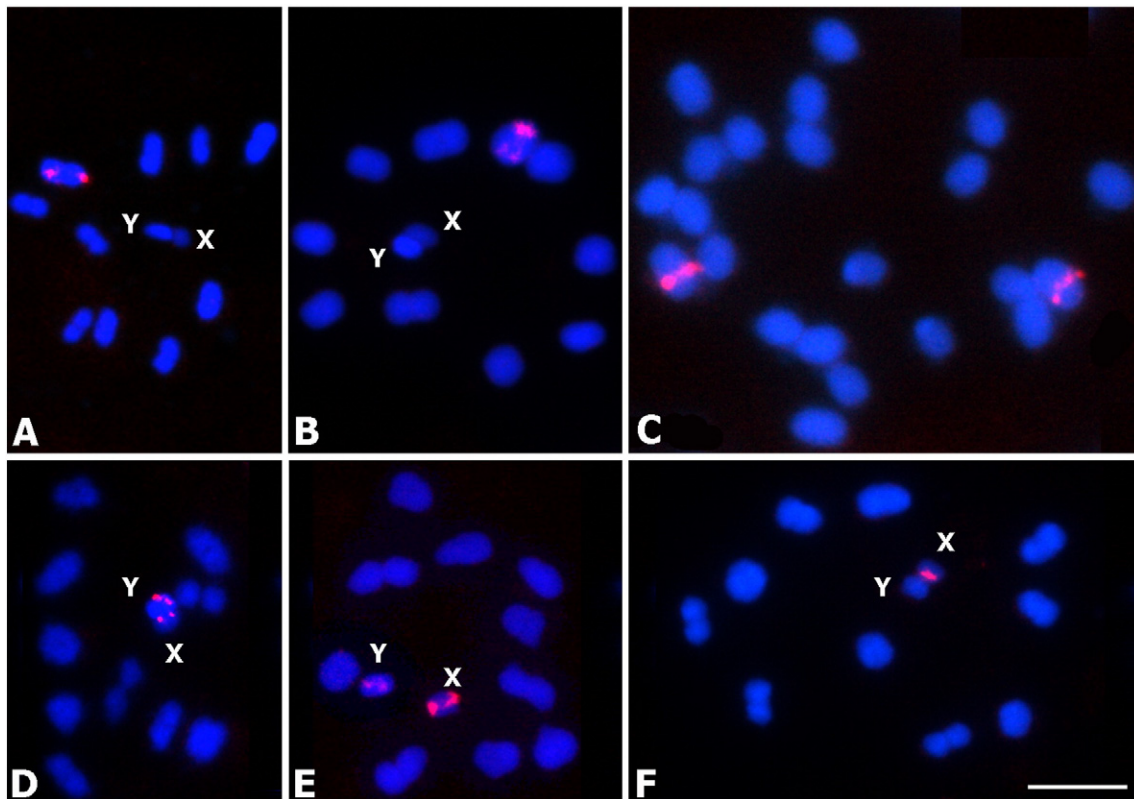


Fig. 1. Localization of 45S ribosomal DNA by fluorescent in situ hybridization (FISH) in male meiosis and spermatogonial prometaphase in different *Triatoma* species from South America, using 18S rDNA as probe. All species showed a diploid chromosome number of 22 chromosomes ($2n = 20$ autosomes plus XY in males, XX in females). rDNA hybridization signals (in red) are located on one autosomal pair (A–B–C), on both XY sex chromosomes (D–E) or only on one X chromosome (F). (A): *T. klugi*. Second meiotic metaphase (MII). (B): *T. costalimai*. First meiotic metaphase (MI). (C): *T. patagonica*. Spermatogonial prometaphase. Hybridization signals are located in interstitial position on one pair of autosomes. (D): *T. jurbergi*. MI. Hybridization rDNA signals of similar intensities are located on both sex chromosomes. (E): *T. maculata*. MI. Ribosomal DNA signals on X chromosome are more intensity than the observed on the Y chromosome. (F): *T. sordida sensu stricto*. MI. Only one sex chromosome (X) shows rDNA clusters. Scale bar = 10 μm .

Another important consequence of the rDNA change from autosomes to sex chromosomes is the generation of new linkage groups in the X chromosomes. According to the available information in Diptera, controlling sex genes and reproduction-related traits genes are abundant on the X chromosomes, and many of them are involved in barriers to gene flow between diverging lineages (Noor and Feder, 2006). These genes, so-called “speciation” or “barrier” are related with reproductive isolation, including both pre-zygotic (such as pheromones) and post-zygotic isolations (hybrid sterility and hybrid inviability) (for review see Qvarnström and Bailey, 2009). As a result of the insertion of the ribosomal genes it is likely that the formation of new linkage groups in the X chromosome establishes reproductive isolation among populations with different locations of the ribosomal genes. The translocation of ribosomal genes to sex chromosomes results in changes of the evolutionary dynamics and also has an effect on speciation. A hybrid resulting from a cross between two individuals with different localization of the rDNA loci (autosomes and sex chromosomes) produces unbalanced gametes in the number of rDNA loci resulting in reproductive disadvantage. Depending on the particular genotypes participating in a breeding, the combination of certain gametes could lead to a significant proportion of unviable zygotes (e.g., without rDNA clusters), selecting against heterozygotes and maintenance of polymorphisms in a population. These negative effects can be overcome if the two populations have fixed rDNA loci in both chromosomal positions. The simultaneous presence of rDNA loci in at least one sex chromosome and autosomes is reported in few species of Diptera (Roy et al., 2005), Coleoptera (Cabral de Mello et al., 2011) and Orthoptera (Cabrero and Camacho, 2008). In holocentric chromosomes, this double location is exceptional, having been reported only in two triatomine species: *T. delpontei* and *T. infestans* (Panzer et al., 2012, 2014). The last one exhibits an extensive

rDNA polymorphism involving more than one autosomal pair together with the X chromosome in their putative center of origin, but shows a strong tendency to fix the ribosomal clusters on the X chromosome during its dispersion process (Panzer et al., 2014). In conclusion, we propose that the rDNA translocation from the autosomes to the sex chromosomes limits reproductive compatibility and eventually promote speciation, similar as reported for other chromosomal rearrangements (Butlin, 2005). Perhaps the reverse movement of rDNA loci, i.e. from the sex chromosomes to autosomes is highly unlikely, given the new gene linkage relationships in the X chromosome and the establishment of isolation barriers to gene flow. Probably this mechanism may be acting on other insect groups, including with monocentric chromosomes such as Coleoptera, provided that the number of ribosomal clusters is present on one or two chromosomes per haploid complement.

4.3. Phylogenetic relationships in *Triatominae* subcomplexes

Triatominae species show high morphological plasticity which suggests that ecological factors may be the main force driving speciation in *Triatominae* (Dujardin et al., 1999). Very closely related species are able to develop rapid morphological changes in response to the adaptation to new environments. Conversely, similar morphs adapted to the same ecotope could be derived from different ancestors (Dujardin et al., 1999). Thus the existence of morphologically similar species could be reflecting both their evolution from a common ancestor or convergent adaptation to the same ecological niche. This phenotypic flexibility leads to misidentification of distinct genetic units by morphological convergence, arising taxonomic uncertainties in the description of new subspecies, species or even genera. Considering that the *Triatominae* species groupings in complexes and subcomplexes are

mainly based on morphological similarities (Schofield and Galvão, 2009), the morphological plasticity confused both species identification and the establishment of evolutionarily related groups.

Phylogenetic origin of blood-feeding Triatominae has received considerable attention due to the epidemiological significance as vectors of Chagas disease. Conflicting hypotheses support Triatominae as a monophyletic (Hypša et al., 2002; Patterson and Gaunt, 2010; Weirauch and Munro, 2009), polyphyletic (Schofield, 1988; Paula et al., 2005; Schofield and Galvão, 2009) or paraphyletic group (Hwang and Weirauch, 2012). Although that the monophyly or polyphyly of *Triatoma* genus is unclear, there is unanimity in considering that the South American *Triatoma* species (except *T. melanocephala*, *T. tibiamaculata* and *T. vitticeps*) constitute a monophyletic group (Hypša et al., 2002; Schofield and Galvão, 2009; Gardim et al., 2014; Justi et al., 2014).

Chromosomal differentiation in triatomines is mainly restricted to the variation of different repeated sequences, particularly the C-heterochromatin and ribosomal clusters (for reviews see Panzera et al., 2010, 2012). Cytogenetic analyses of more than 80 species reveal that most species which constitute each subcomplex share similar chromosomal characteristics, such as autosomal heterochromatin localization and rDNA clusters chromosomal position. Chromosomal change rate is very different among subcomplexes, some of them where species change rapidly (e.g., infestans subcomplex) and others where the species remain completely undifferentiated (e.g., phyllosoma subcomplex). Our working hypothesis is that the chromosomal location of major rDNA clusters is a species-specific character and evolutionary conserved trait, so that closely related species tend to have the major ribosomal clusters in the same chromosomal location.

In this paper, considering the ribosomal clusters chromosomal location by FISH and in the light of the available molecular data, we have evaluated the species integration of maculata, matogrossensis, rubrovaria and sordida subcomplexes, and propose new arrangements that reflect their evolutionary relationships more accurately.

4.3.1. Rubrovaria subcomplex

It includes seven species that share morphological characteristics and geographical distribution (southern Brazil, Uruguay and North-western Argentina): *T. rubrovaria*, *T. carvalhoi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. limai* and *T. oliveirai* (Schofield and Galvão, 2009). Recently, *T. pintodiasi* was described and incorporated in this subcomplex due to its close morphological, morphometric and biochemical (hemolymph proteins) similarities (Jurberg et al., 2013).

Several morphometric and molecular analyses show close evolutionary relationships among *T. carvalhoi*, *T. circummaculata*, *T. klugi* and *T. rubrovaria* (García et al., 2001; Hypša et al., 2002; Sainz et al., 2004; Paula et al., 2005; Almeida et al., 2009, Gardim et al., 2014). Morphometric similarities between *T. klugi* and *T. oliveirai* were reported by Noireau et al. (2002). Membership in this subcomplex of *T. limai*, *T. oliveirai* and *T. pintodiasi* must be confirmed as there are no molecular data on these 3 species.

Our FISH results show that all rubrovaria species analyzed hitherto present the ribosomal clusters on an autosomal pair (Tables 1 and 2), confirming their close phylogenetic relationships. Furthermore, two other species belonging to sordida subcomplex show the same chromosome location: *T. guasayana* and *T. patagonica* (Table 1). Analyses of several nuclear and mitochondrial fragments also cluster these two species in the same clade within rubrovaria subcomplex (García et al., 2001; Hypša et al., 2002; Sainz et al., 2004; Paula et al., 2005; Almeida et al., 2009; Gardim et al., 2014). The close association among *T. sordida* and *T. guasayana* observed in phylogenetic trees with COI and Cyt b fragments reported by Gardim et al. (2013) and Justi et al. (2014) probably are due to an incorrect identification of the analyzed specimens since to their great morphological similarity, as has been suggested by Panzera et al. (2015).

Table 2

New proposal of South American *Triatoma* species involving maculata, matogrossensis, rubrovaria and sordida subcomplexes previously grouping by Schofield and Galvão (2009).

Subcomplex proposed by Schofield & Galvão (2009)	Our new proposal	Chromosomal localization of ribosomal clusters
Rubrovaria: <i>T. carvalhoi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. limai</i> , <i>T. oliveirai</i> , <i>T. rubrovaria</i>	RUBROVARIA: <i>T. carvalhoi</i> , <i>T. circummaculata</i> , <i>T. klugi</i> , <i>T. limai</i> ^{a,b} , <i>T. oliveirai</i> ^{a,b} , <i>T. rubrovaria</i> plus <i>T. pintodiasi</i> ^a , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> (from sordida subcomplex)	One autosomal pair
Matogrossensis: <i>T. baratai</i> , <i>T. costalimai</i> , <i>T. deaneorum</i> , <i>T. guazu</i> , <i>T. jurbergi</i> , <i>T. matogrossensis</i> , <i>T. vanda</i> , <i>T. williami</i> .	ELIMINATED	
Sordida: <i>T. garciabesi</i> , <i>T. guasayana</i> , <i>T. patagonica</i> , <i>T. sordida</i> .	SORDIDA: <i>T. garciabesi</i> , <i>T. sordida</i> , <i>T. sordida</i> Argentina (new species) plus <i>T. jurbergi</i> , <i>T. matogrossensis</i> , <i>T. vanda</i> (from matogrossensis subcomplex)	One (X) or two sex chromosomes (XY)
Maculata: <i>T. arthurneivai</i> , <i>T. maculata</i> , <i>T. pseudomaculata</i> , <i>T. wygodzinskiyi</i> .	MACULATA: <i>T. maculata</i> NEW SUBCOMPLEX: PSEUDOMACULATA or ARTHURNEIVAI: <i>T. arthurneivai</i> ^{a,b} , <i>T. pseudomaculata</i> , <i>T. wygodzinskiyi</i> plus <i>T. baratai</i> , <i>T. costalimai</i> , <i>T. deaneorum</i> ^{a,b} , <i>T. guazu</i> , <i>T. jatai</i> , <i>T. williami</i> (from matogrossensis subcomplex)	Sex chromosomes (XY) One autosomal pair

^a Molecular data unknown.

^b FISH data unknown.

In brief, considering all genetic data available and the similar ribosomal clusters location, we proposed that the rubrovaria subcomplex would be constituted by the following species: *T. carvalhoi*, *T. circummaculata*, *T. guasayana*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliveirai*, *T. patagonica*, *T. pintodiasi* and *T. rubrovaria*.

4.3.2. Maculata subcomplex

Currently, this subcomplex is constituted by four species: *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskiyi* (Schofield and Galvão, 2009). These species are extremely similar and cannot be easily distinguished considering external characters alone. However, their ecological behavior is very different; the first two are arboreal while the latter are rupicolous (Lent and Wygodzinsky, 1979). Geometric morphometric analyses on wings suggested a misidentification between *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskiyi* (Carbajal de la Fuente et al., 2010). For this reason all published genetic data on *T. arthurneivai* must correspond to *T. wygodzinskiyi*. *T. arthurneivai* would be restricted to Sierra do Cipó (Minas Gerais, Brazil) and no genetic data are available.

According to Schofield (1988), *T. maculata* and *T. pseudomaculata* resulted from the evolution of two geographic populations derived from a common ancestor. Our FISH results clearly splits the maculata subcomplex in two clades: species with the ribosomal genes in an autosomal pair (*T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskiyi*) and a species having the ribosomal genes in both sex chromosomes (*T. maculata*) (Table 1, Fig. 1). This clear division (*T. maculata* vs *T. pseudomaculata*/*T. wygodzinskiyi*) and the close evolutionary relationship between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskiyi* were also being reported by isoenzymes (Dos Santos et al., 2007), nuclear (Bargues et al., 2008; Justi et al., 2014) and mitochondrial sequences (Hypša et al., 2002; Paula et

al., 2005; Justi et al., 2014). Genetic similarity between *T. maculata* and *T. pseudomaculata* is only reported by two papers (Sainz et al., 2004; Gardim et al., 2014). In the first paper the similarity between both species is due to a species misidentification, considering that *T. maculata* is not distributed in Sergipe (Brazil) (AF324512/AF324524). Same issue is probably happening with the specimens used by Gardim et al. (2014) which are from an unknown origin and at least 30 years old insectary colony.

In brief, unlike Schofield (1988) proposal, genetic data including our FISH results strongly suggest that *T. maculata* and *T. pseudomaculata*/*T. wygodzinskyi* not derived from a recent common ancestor and are evolutionarily distinct units. We propose the formation of a new subcomplex provisionally named Pseudomaculata including *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (Table 2) along with other species (see below). Molecular analyses on *T. arthurneivai* should determine whether this species belongs to maculata or pseudomaculata subcomplexes. In the latter case the new subcomplex will be called arthurneivai since as it would be the first species originally described. Considering the similar geographical distribution and habits of both species, probably *T. arthurneivai* is close to *T. wygodzinskyi*. On the other hand, we proposed that *T. maculata* constituted a separated subcomplex formed only by this species. Phylogenetic trees positioned this species alone and in a basal position within South American *Triatoma* (Hypša et al., 2002; Paula et al., 2005; Justi et al., 2014).

4.3.3. Matogrossensis subcomplex

Includes nine species which share morphological characteristics, all terrestrial and distributed throughout the Pantanal ecosystem in Central-Western Brazil and Paraguay: *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. guazu*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vandae* and *T. williami* (Schofield and Galvão, 2009). Recently, *T. jatai* was described and incorporated in the matogrossensis subcomplex due to its close morphological, morphometric and genetic similarities with *T. costalimai* (Gonçalves et al., 2013; Teves et al., 2016). Molecular data of *T. deaneorum* are not available.

None DNA sequences analysis succeeded to recover a clade formed by matogrossensis subcomplex species, reflecting a conflict between ecologic and genetic data (Hypša et al., 2002; Sainz et al., 2004; Paula et al., 2005; Gardim et al., 2013; Justi et al., 2014; Teves et al., 2016). Our FISH results clearly splits the matogrossensis subcomplex in two clusters: species with the ribosomal genes on an autosomal pair (*T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. jatai* and *T. williami*), and species bearing the ribosomal clusters on both sex chromosomes (*T. jurbergi*, *T. matogrossensis* and *T. vandae*) (Table 1, Fig. 1). A same dichotomy was also reported by morphometry (eight measurements of head and thorax) and isoenzyme (18 loci) analyses (Noireau et al., 2002) on the former called “*T. oliveirai complex*” (Carcavallo et al., 2001) currently matogrossensis subcomplex. Several analyses with mitochondrial genes (mainly 12S and 16S rDNA) have shown that *T. jurbergi*, *T. matogrossensis* and *T. vandae* are closely related among them and with sordida species (*T. sordida* and *T. garciabesi*) (García et al., 2001; Hypša et al., 2002; Sainz et al., 2004; Paula et al., 2005; Gardim et al., 2013; Justi et al., 2014; Teves et al., 2016). All these species showed the rDNA clusters on one or two sex chromosomes (Table 1). In conclusion, considering all available genetic data and the similar ribosomal clusters localization (all bearing ribosomal genes on sex chromosomes, either both or just the X chromosome), we proposed that the sordida subcomplex must be constituted by the following species: *T. garciabesi*, *T. sordida*, *T. sordida* Argentina (putative new species suggested by Panzera et al., 2015) plus *T. jurbergi*, *T. matogrossensis* and *T. vandae* (from matogrossensis subcomplex). From this subcomplex we excluded *T. guasayana* and *T. patagonica* which has been proved to be related with the rubrovirata subcomplex (Table 2).

In the other matogrossensis subcomplex subdivision, constituted by *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu* and *T. williami*, their phylogenetic relationships among them are not clear, particularly the position of *T.*

costalimai. In this species, molecular analyses of different mitochondrial genes (COI, COII and cyt b) performed on individuals from Brazil and Bolivia (numbers 35 and 42, respectively) show very large genetic distances (over 8.3%), which reveals an incorrect species identification in at least one of the specimens analyzed by Justi et al. (2014).

Isoenzyme and morphometric analyses clearly indicate a lack of differentiation between *T. guazu* and *T. williami* (Noireau et al., 2002). DNA sequence comparison between these two species of all mitochondrial fragments available in GenBank (12S, 16S, COI, COII and Cyt b) reveals nucleotide differences not exceeding 1.8% (data not showed), similar as observed among conspecific populations. All this information, along with a similar geographic distribution (Mato Grosso, Brazil), questions the existence of *T. guazu* and *T. williami* as two separate species.

Our FISH results in *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. guazu*, *T. jatai* and *T. williami* (from matogrossensis subcomplex) as well as in *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (from maculata subcomplex) showed that the ribosomal clusters are localized on one autosomal pair. Evolutionary relationships between these two groups of species are not constant, and vary according to the specimens used and the molecular markers analyzed (Gardim et al., 2013). These inconsistencies clearly reveal improper sequencing or misidentification of species, such as above mentioned for *T. costalimai*. In spite of this, several phylogenetic trees, mainly with 12S and 16S fragments, show a close association among the two species groups afore mentioned (Hypša et al., 2002; Paula et al., 2005; Justi et al., 2014).

In summary, considering the available genetic data and the similar ribosomal clusters localization, we propose the inclusion of *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. guazu*, *T. jatai* and *T. williami* within the same subcomplex that *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (Table 2).

5. Conclusions

We suggest that the movement of rDNA loci from autosomes to sex chromosomes rapidly established reproductive barriers between divergent lineages in triatomines. The same chromosomal location of the ribosomal genes reveals evolutionarily close species with a common ancestor. Since these changes can occur several times independently in distant triatomine groups, it is necessary to contrast the evolutionary relationships obtained with rDNA location with phylogenetic markers, such as the sequence comparisons of nuclear and mitochondrial genes. Based on these assumptions, we propose a reordering of species that composed several subcomplexes of *Triatoma* from South America.

Acknowledgements

This work was supported by project grants (no. 370) from the “Comisión Sectorial de Investigación Científica” (CSIC-Udelar-Uruguay), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA Uruguay), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil) (Processo n° 13/19764-0) and by the “Conserjería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía”, sponsor of Program of Academic Mobility of AUJP (Ibero-American University Postgraduate Association) for SP and FP. This paper is included in the Ph.D. Thesis of Sebastián Pita (Udelar-University of Jaén).

References

- Almeida, C.E., Marcet, P.L., Gumiel, M., Takiya, D.M., Cardozo-de-Almeida, M., Pacheco, R.S., Lopes, C.M., Dotson, E.M., Costa, J., 2009. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavalloii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul state, Brazil. *J. Vector Ecol.* 34, 164–173.
- Bardella, V.B., Gaeta, M.L., Vanzela, A.L., Azeredo-Oliveira, M.T., 2010. Chromosomal location of heterochromatin and 45S rDNA sites in four South American triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *Comp. Cytogenet.* 4, 141–149.
- Bargues, M.D., Klisiowicz, D.R., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J.M., 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., 2008. Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas' disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e233.
- Bressa, M.J., Papeschi, A.G., Vitková, M., Kubíčková, S., Fuková, I., Pigozzi, M.L., Marec, F., 2009. Sex chromosome evolution in cotton stainers of the genus *Dysdercus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Cytogenet. Genome Res.* 125, 292–305.
- Butlin, R.K., 2005. Recombination and speciation. *Mol. Ecol.* 14, 2621–2635.
- Cabral-de-Mello, D.C., Oliveira, S.G., Moura, R.C., Martins, C., 2011. Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genet.* 12, 88.
- Cabrero, J., Camacho, J.P.M., 2008. Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosom. Res.* 16, 595–607.
- Carbajal de la Fuente, A.L., Noireau, F., Catalá, S.S., 2008. Inferences about antennal phenotype: the "Triatoma maculata complex" (Hemiptera: Triatominae) is valid? *Acta Trop.* 106, 16–21.
- Carbajal de la Fuente, A.L., Jaramillo, N., Barata, J.M.S., Noireau, F., Diotaiuti, L., 2010. Misidentification of two Brazilian triatomines, *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi*, revealed by geometric morphometrics. *Med. Vet. Entomol.* 25, 178–183.
- Carcavallo, R.U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., Galvão, C., 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol. Vectores* 7, 1–99.
- Carcavallo, R.U., Jurberg, J., Lent, H., Galvão, C., Steindel, M., Pinto, C.J., 2001. Nova espécie do complexo oliveirai (nova denominação para o complexo matogrossensis) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 71–79.
- Dos Santos, S.M., Lopes, C.M., Dujardin, J.P., Panzera, F., Pérez, R., Carbajal de la Fuente, A.L., Pacheco, R.S., Noireau, F., 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infect. Genet. Evol.* 7, 469–475.
- Dujardin, J.P., Panzera, P., Schofield, C.J., 1999. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 223–238.
- Galvão, C., Paula, A.S., 2014. Sistemática e evolução dos vetores. In: Galvão, C. (Org.), Vetores da doença de Chagas no Brasil [online]. Chapter 3, Sociedade Brasileira de Zoologia. doi: 10.7476/9788598203096. pp. 26–32.
- García, B.A., Moriyama, E.N., Powell, J.R., 2001. Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. *J. Med. Entomol.* 38, 675–683.
- Gardim, S., Rocha, C.S., Almeida, C.E., Takiya, D.M., Silva, M.T.A., Ambrósio, D.L., Cicarelli, R.M.B., Rosa, J.A., 2013. Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic *Triatoma* in Central-Western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 89, 766–774.
- Gardim, S., Almeida, C.E., Takiya, D.M., Oliveira, J., Araújo, R.F., Cicarelli, R.M.B., Rosa, J.A., 2014. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infect. Genet. Evol.* 23, 74–79.
- Gonçalves, T.C.M., Teves-Neves, S.C., dos Santos-Mallet, J.R., Carbajal-de-la-Fuente, A.L., Lopes, C.M., 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 429–437.
- Grozeva, S., Anokhin, B.A., Kuznetsova, V.G., 2015. Bedbugs (Hemiptera). In: Sharakhov, I.V. (Ed.), Protocols for Cytogenetic Mapping of Arthropod Genomes, Chapter 8. CRC Press, Boca Raton, pp. 285–326.
- Hirai, H., Yamamoto, M.T., Taylor, R.W., Imai, H.T., 1996. Genomic dispersion of 28S rDNA during karyotypic evolution in the ant genus *Myrmecia* (Formicidae). *Chromosoma* 105, 190–196.
- Hughes-Schrader, S., Schrader, F., 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12, 327–350.
- Hwang, W.S., Weirauch, C., 2012. Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. *PLoS One* 7, e45523.
- Hypša, V., Tietz, D.F., Zrzavý, J., Rego, R.O.M., Galvão, C., Jurberg, J., 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a new world origin of the Asiatic clade. *Mol. Phylogenet. Evol.* 23, 447–457.
- ICZN (International Code of Zoological Nomenclature), 1999. Fourth edition. American Association for Zoological Nomenclature (ed.). London, (306 pp).
- Jurberg, J., Cunha, V., Cailleaux, S., Raigorodski, R., Lima, M.S., Rocha, D.S., Moreira, F.F., 2013. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev. Pan-Amaz Saude* 4, 43–56.
- Justi, S.A., Russo, C.A.M., Mallet, J.R.S., Obara, M.T., Galvão, C., 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit. Vectors* 7, 149.
- Kaiser, V.B., Bachtrog, D., 2010. Evolution of sex chromosomes in insects. *Annu. Rev. Genet.* 44, 91–112.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas's disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163, 123–520.
- Nguyen, P., Sahara, K., Yoshido, A., Marec, F., 2010. Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138, 343–354.
- Noireau, F., Menezes, S., Gumieli, M., Dujardin, J.P., Santos Soares, R.U., Galvão, C., Jurberg, J., 2002. Phylogenetic relationships within the Oliveirai complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infect. Genet. Evol.* 2, 11–17.
- Noor, M.A.F., Feder, J.L., 2006. Speciation genetics: evolving approaches. *Nat. Rev. Genet.* 7, 851–861.
- Panzera, F., Hornos, S., Pereira, J., Cestau, R., Canale, D., Diotaiuti, L., Dujardin, J.P., Pérez, R., 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 57, 732–739.
- Panzera, F., Pérez, R., Panzera, Y., Ferrandis, I., Ferreiro, M.J., Calleros, L., 2010. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenet. Genome Res.* 128, 77–87.
- Panzera, F., Ferreiro, M.J., Pita, S., Calleros, L., Pérez, R., Basmadjian, Y., Guevara, Y., Brenière, S.F., Panzera, Y., 2014. Evolutionary and dispersal history of *Triatoma infestans*, main vector of chagas disease, by chromosomal markers. *Infect. Genet. Evol.* 27, 105–113.
- Panzera, F., Pita, S., Nattero, J., Panzera, Y., Galvão, C., Chavez, T., Rojas De Arias, A., Cardozo Téllez, L., Noireau, F., 2015. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Parasit. Vectors* 8, 495.
- Panzera, Y., Pita, S., Ferreiro, M.J., Ferrandis, I., Lages, C., Pérez, R., Silva, A.E., Guerra, M., Panzera, F., 2012. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenet. Genome Res.* 138, 56–67.
- Patterson, J.S., Gaunt, M.W., 2010. Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 608–621.
- Paula, A.S., Diotaiuti, L., Schofield, C.J., 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 35, 712–718.
- Proença, S.J.R., Collares-Pereira, M.J., Serrano, A.R.M., 2005. Chromosome evolution in tiger beetles: karyotypes and localization of 18S rDNA loci in Neotropical Megacephalini (Coleoptera, Cicindelidae). *Genet. Mol. Biol.* 28, 725–733.
- Qvarnström, A., Bailey, R.L., 2009. Speciation through evolution of sex-linked genes. *Heredity* 102, 4–15.
- Richard, G.-F., Kerrest, A., Dujon, B., 2008. Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 686–727.
- Roy, V., Monti-Dedieu, L., Chaminade, N., Siljak-Yakovlev, S., Aulard, S., Lemeunier, F., Montchamp-Moreau, C., 2005. Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species subgroups: *ananassae* and *melanogaster*. *Heredity* 94, 388–395.
- Ryckman, R.E., 1962. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North America. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* 27, 93–239.
- Sætre, G.P., Borge, T., Lindroos, K., Haavie, J., Sheldon, B.C., Primmer, C., Syvänen, A.C., 2003. Sex chromosome evolution and speciation in *Ficedula flycatchers*. *Proc. R. Soc. London B* 270, 53–59.
- Sainz, A.C., Mauro, L.V., Moriyama, E.N., García, B.A., 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 121, 229–240.
- Schofield, C.J., 1988. Biosystematics of the Triatominae. In: Service, M.W. (Ed.), Biosystematic of Haematophagous Insects Vol. 37. Clarendon Press, Oxford, pp. 284–312.
- Schofield, C.J., Galvão, C., 2009. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110, 88–100.
- Šichová, J., Nguyen, P., Dalíková, M., Marec, F., 2013. Chromosomal evolution in tortricid moths: conserved karyotypes with diverged features. *PLoS One* 8, e64520.
- Solari, A.J., 1979. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 72, 225–240.
- Teves, S.C., Gardim, S., Carbajal de la Fuente, A.L., Lopes, C.M., Gonçalves, T.C.M., dos Santos Mallet, J.R., da Rosa, J.A., Almeida, C.E., 2016. Mitochondrial genes reveal *Triatoma jatai* as a sister species to *Triatoma costalimai* (Reduviidae: Triatominae). *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 94, 686–688.
- Usinger, R.L., Wygodzinsky, P., Ryckman, R.E., 1966. The biosystematics of Triatominae. *Annu. Rev. Entomol.* 11, 309–330.
- Vicoso, B., Charlesworth, B., 2006. Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. *Nat. Rev. Genet.* 7, 645–653.
- Weirauch, C., Munro, J.B., 2009. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 53, 287–299.
- WHO (World Health Organization), 2016. Chagas disease (American trypanosomiasis). (Available:) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.