

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública
Departamento de Epidemiologia**

**ANÁLISE DAS RELAÇÕES TAXONÔMICAS E
SISTEMÁTICAS ENTRE ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE) DE COLÔNIAS MANTIDAS
PELO SERVIÇO ESPECIAL DE SAÚDE DE
ARARAQUARA, INFÉRIDA DE SEQÜÊNCIAS DE GENES
MITOCONDRIAIS**

WALTER CERETTI JUNIOR

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA DA
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE "DOUTOR EM
SAÚDE PÚBLICA".

ORIENTADOR: PROF. TIT. JOSÉ M. S. BARATA

**SÃO PAULO
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Tese, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

AGRADECIMENTOS:

Ao Prof. Titular José Maria Soares Barata, pela orientação e zelosa amizade, que tanto me incentivaram para realização deste trabalho.

Ao Dr. Mauro Toledo Marrelli, Jovem Pesquisador do Departamento de Epidemiologia desta Faculdade pela colaboração e auxílio nas análises biomoleculares, decisivos para a conclusão deste trabalho.

Ao companheiro Daniel Pagotto Vendrami, futuro Biologista Molecular, pelo auxílio durante a fase experimental, essencial para elaboração desta Tese.

Ao Dr. João Aristeu da Rosa do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara, pela amizade e sugestões que contribuíram para realização deste.

À Profa. Dra. Eunice Bianchi Galati pelas sugestões e conselhos que em muito colaboraram para a realização deste trabalho.

Á Dra. Ana Laura Carbajal de La Fuente pelas correções e sugestões que foram muito úteis para o término desta Tese.

Ao Prof. Associado Delsio Natal pelo incentivo e amizade destes tantos anos de convívio.

Ao companheiro Paulo Roberto Urbinatti, Biólogo do Departamento de epidemiologia da FSP/USP, pelo apoio e incentivo nas horas mais difíceis da realização deste trabalho.

Ao companheiro Marcos Takashi Obara, Biólogo Pós-graduando do Departamento de Epidemiologia da FSP/USP, pelo apoio incentivo devotados na elaboração desta Tese.

Aos companheiros João Luis Molina Gil e João da Nobrega do Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, pelo envio dos Triatomíneos, fator determinante para a realização desta Tese.

Ao amigo Paulo Silva de Almeida, Coordenador de Controle de Vetores do Núcleo Regional de entomologia de Campo Grande Mato Grosso do Sul, pelo envio de dos espécimes de *Triatoma baratai* e *Triatoma matogrossensis* utilizados nesta Tese.

À Amiga Sirlei Antunes de Moraes pelo apoio dado durante a execução desta Tese.

Aos amigos Aristetes, Márcia Bicudo, Marcia Gutierrez, Dulce e Rosa, da Entomologia que, sempre me apoiaram em todos os momentos, não apenas desta tese, mas, de nosso convívio profissional e pessoal.

À amiga Elisabete Regina Forte Garcia dos Santos, secretária da CPG-HEP pelas orientações quanto aos trâmites necessários à apresentação desta pesquisa.

Ao companheiro Rodrigo Alexandre Sportello, técnico em informática do Depto. de Epidemiologia da FSP/USP, por todas as vezes em nos prestou auxílio durante a edição desta Tese.

Às funcionárias da Assessoria Acadêmica: Maria Aparecida Mendes, Renilda Maria de Figueiredo Shimono e Vania Santos pela dedicação e carinho com que nos auxiliaram durante a execução desta Tese.

Às amigas Tatiani Cristina Marques e Patricia Pereira de Souza, estagiárias do laboratório, pelo apoio dispensado durante a execução deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Dedicatória:

*Às minhas adoráveis:
Esposa Vera e Filha
Paula.
Aos meus pais:
Walter e Walderez
A Deus.*

RESUMO

Os insetos da subfamília Triatominae Jeannel, 1919 de Reduviidae (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae), também conhecidos como barbeiros, constituem um grupo amplamente distribuído pela região Neotropical que comporta hoje, 142 espécies ocorrentes e uma fóssil, distribuídas em 18 gêneros, são insetos hematófagos estritos em todas as fases da vida e reconhecidos vetores da Doença de Chagas. Essa enfermidade é considerada um dos mais importantes problemas de saúde na América Latina, com cerca de 12 a 14 milhões de indivíduos chagásicos, 60 milhões vivendo em risco e cerca de 20.000 caso/ano em 18 países da América do Sul e Central. Neste estudo foram analisadas seqüências de nucleotídeos dos genes 16S e CitB mitocondrial em populações de triatomíneos, dos gêneros *Panstrongylus* Berg, 1879, *Rhodnius* Stål, 1859 e *Triatoma* Laporte, 1832, mantidos em colônias no insetário Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) – SP, comparando-as com seqüências dos mesmos genes disponíveis no GenBank. Os fragmentos obtidos variaram de 311 a 317 pb (16S) e 393 pb (CitB). Observou-se baixa variação intra-específica entre as distâncias genéticas do gene 16S, enquanto o gene CitB mostrou-se mais polimórfico, podendo ser utilizado para estudos de populações geográficas. As seqüências geradas foram alinhadas com seqüências dos mesmos genes para outros triatomíneos e também de *Arilus cristatus* Linnaeus, 1763 (Hemiptera: Reduviidae: Harpactorinae) (16S e CitB) e *Oncerothachus* sp. Stål, 1868 (Hemiptera: Reduviidae: Saicinae) (16S). As relações entre as espécies foram avaliadas pelos métodos de Distância (Neighbor Joining), Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança. As análises de fragmentos para os dois genes demonstraram a parafilia de Rhodniini e Triatomini, confirmando resultados anteriores. Evidenciou-se a possível origem dos “Triatomas” Neotropicais a partir de derivações de Triatomas Neárticos, verificada pela estreita relação genética de

Panstrongylus e *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) com o ramo Norte-Centro Americano de *Triatoma*; por meio das relações com *T. protracta* (Uhler, 1894), *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894) e *T. dimidiata* Latreille, 1811. É dada a conhecer a primeira seqüência de bases nitrogenadas de fragmentos do gene 16S para *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira e Barata, 2002. Os resultados mostraram a utilidade de 16S e CitB como marcadores moleculares de espécies e de populações de triatomíneos e sua importância em questões de sistemática e taxonomia, no entanto, exigem um alto grau de segurança e controle de contaminação. Há necessidade de novos estudos envolvendo outros marcadores e o uso de caracteres sistemáticos clássicos de morfologia, ecologia e comportamento, indispensáveis para decisões sistemáticas adequadas uma vez, que teriam impacto não apenas sistemático mas, para as estratégias de controle. As colônias de triatomíneos do SESA revelaram-se importante fonte de material para estudos sistemáticos de triatomíneos, pois compreendem amostras significativas de várias populações triatomínicas da América, principalmente de espécies consideradas vetores principais do mal de Chagas como *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 e *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. Algumas questões sistemáticas relativas a origem e relacionamento filogenético dos triatomíneos continuam em aberto; novos reagrupamentos serão necessários para que a Subfamília continue válida; Análises mais completas, com a inclusão de representantes das tribos Alberproseniini, Bolboderini e Cavernicolini, são ainda necessárias.

Palavras-chaves: Triatominae, Vetores da doença de Chagas, sistemática, 16S, Citocromo B, mitochondrial DNA.

SUMMARY

The insects of the Triatominae subfamily Jeannel, 1919 of Reduviidae (Hemiptera: Heteroptera), also known as triatomine bugs, constitute a widely distributed group in the Neotropical region and including 142 current species and a fossil one, distributed in 18 genera. They are strict hematophagic insects in all phases of their life cycle and recognized vectors of the Chagas disease. This disease is considered one of the most serious Health problem in Latin America, with about 12 to 14 million of chagasic individuals, 60 million people living at risk and about 20,000 cases/year in 18 Central and South American countries. In this study mitochondrial 16S and CytB nucleotide sequences were analyzed in populations of triatomine bugs of the genera *Panstrongylus* Berg, 1879, *Rhodnius* Stål, 1859 and *Triatoma* Laporte, 1832 from colonies maintained in the Insectary of Special Health Service of Araraquara – SESA (acronym in Portuguese), Araraquara- SP, comparing them with sequences of the same available genes deposited in the GenBank. The obtained fragments varied from 311 to 317 bp (16S gene) and 393 pb (CytB). Low intra-specific variation among the genetic distance of the 16S gene, while the CytB gene revealed a higher polymorphism, being able to be used in geographic population studies. The generated sequences were aligned with sequences of the same genes for other triatomine bugs and also with *Arius cristatus* Linnaeus, 1763 (16S and CytB) and *Oncerothelus* sp Stål, 1868 (16S). The relationships among the species had been evaluated by the methods of Distance (Neighbor Joining), Maximum Parsimony and Maximum Likelihood. The analyses of fragments for the two genes had demonstrated the paraphily of Rhodniini and Triatomiini, confirming previous results. It was hypothesized the possible origin of the Neotropical “Triatomas” from derivations of Nearctic triatomines, verified for the narrow genetic relation of *Panstrongylus* and *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) with the North-Center

American branch of *Triatoma* by the relationships with *T. protracta* (Uhler, 1894), *D. maxima* (Uhler, 1894) and *T. dimidiata* Latreille, 1811. It is known the first sequence of nitrogen bases of fragments of the 16S gene for *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira e Barata, 2002. The results had shown the utility of 16S and CytB as markers of species and of triatomine populations and their importance in systematic and taxonomy questions. However, demands one high degree of security and control of contamination. There is a necessity of new studies involving other molecular markers and the use of classic systematic characters of morphology, ecology and behavior, indispensable for systematic decisions adjusted a time, that would have not only systematic impact but, for the control strategies. The colonies of triatomine of the SESA had shown important source of material for systematic studies of this kind of insect, since they include significant samples of triatomine populations of America, mainly of species considered the main vectors of the Chagas disease such as *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 and *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. Some systematic questions related to the origin and phylogenetic relationship of the triatomine bugs have kept opened; new regroupings will be necessary so that the Subfamily continues valid; more complete analyses, with the inclusion of representative members of the Alberproseniini, Bolboderini and Cavernicolini tribes, are still necessary.

Key-words: Triatominae, Chagas disease vectors, systematics, 16S, CytB, mitochondrial DNA.

ÍNDICE

I. Introdução	01
II. Justificativa	38
III. Objetivos.	40
IV. Material e Métodos.	41
V. Resultados e Discussão	49
VI. Conclusões.	89
VII. Comentários Finais.	91
VIII. Referências Bibliográficas	93

IX. Anexos:

Anexo 1: Carta de Acusa de recebimento de Artigo da Revista Bras. Entomol.

Anexo 2: Artigo submetido à Rev. Bras. de Entomol.

Anexo 3: Produtos de PCR amplificados para o gene 16S em gel de agarose.

Anexo 4: Produtos de PCR amplificados para o gene CitB em gel de agarose.

I. INTRODUÇÃO

1. A subfamília Triatominae:

1.1. Posição Sistemática e Distribuição Geográfica

Os insetos da subfamília Triatominae Jeannel, 1919 de Reduviidae (Hemiptera, Reduviidae, Triatomínea), também conhecidos como barbeiros, constituem um grupo amplamente distribuído pela região Neotropical (Lat. 42 N e 46 S) entre os Grandes Lagos da América do Norte e a província de Chubut no Sul da Argentina. No entanto, *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773), espécie tipo do gênero, é tropicopolitana ou cosmopolita, tendo registros na África, Ásia e Austrália. Sete outras espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 são registradas apenas na Ásia e Austrália. Enquanto que, as seis espécies de *Linshcosteus* Distant, 1904, único gênero extra-americano, têm ocorrência apenas registrada para a Índia, ver **Tabela 1** (WEINMAN D et al., 1978; LENT e WYGODZINSKY, 1979; GORLA et al., 1997; CARCAVALLO et al., 2000b; GALVÃO et al., 2002; 2003, SCHAEFER, 2003, 2005).

1.2. Primeiros Relatos

Os primeiros relatos sobre o comportamento hematofágico desses hemípteros datam de 1590 e são atribuídos ao Pe. Reginaldo Lizarrága em sua passagem pela região do Peru e Chile. Há também citações do Pe. Martin Dobizoffer, em 1784 e relatos de 1835 deixados por Charles R. Darwin (ABALOS e WIGODZINSKY, 1951, SHERLOCK, 1979, LENT e WIGODZINSKY, 1979, OSÓRIO-QUINTERO, 2002, GALVÃO, 2003).

Tabela 1. Gêneros e espécies de Triatominae, segundo autor, ano de descrição e local tipo, que ocorrem fora da Região Neotropical.

Gênero	Espécie e autor	Ocorrência
<i>Triatoma</i>	<i>T. rubrofasciata</i>	Tropicopolitana
	<i>T. amicitiae</i> Lent, 1951	Sri Lanka
	<i>T. bouvieri</i> Larrousse, 1924	Ilhas Nicobar, Filipinas, Vietnã
	<i>T. cavernicola</i> Else & Cheong, 1977	Malásia
	<i>T. leopoldi</i> (Schoudeten, 1933)	Austrália e Indonésia
	<i>T. migrans</i> Breddin, 1903	Índia, Indonésia
	<i>T. pugasi</i> Lent, 1953	Java (Indonésia)
	<i>T. sinica</i> Hsiao, 1965	China
<i>Linshcosteus</i>	<i>L. carnifex</i> Distant, 1904	Índia
	<i>L. chota</i> Lent & Wygodzinsky, 1979	Sul da Índia
	<i>L. confusus</i> Ghauri, 1976	Mysore: Sul da Índia
	<i>L. costalis</i> Ghauri, 1976	Mysore: Sul da Índia
	<i>L. kali</i> Lent & Wygodzinsky, 1979	Madras: Sul da Índia
	<i>L. karupus</i> Galvão, Peterson, Rocha & Jurberg,	Tamil Nadu: Sul da Índia

1.3. Aspectos biológicos:

Os triatomíneos são insetos de tamanho variável: 5,0 mm em *Alberprosenia goyovargasi* Martínéz e Carcavallo, 1977 a 44,0 mm em *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894). São considerados lentos, de vôo difícil e têm hábitos noturnos. Como qualquer hemíptera, são hemimetábolos, com o ciclo de vida que varia de 3 a 15 meses, dependendo da espécie e de condições de laboratório. São pouco prolíferos, mas, podem formar colônias, algumas vezes, com centenas de indivíduos (LENT e WYGODZINSKY, 1979; SCHOFIELD, 2000; CERETTI JUNIOR, 2003).

Essas colônias sempre estão associadas a abrigos, ou ninhos de um grande rol de vertebrados, principalmente lacertílios, aves e mamíferos, suas fontes naturais de alimento, pois são hematófagos estritos em todas as fases do desenvolvimento. Porém, várias espécies, principalmente ninfas jovens, foram observadas alimentando-se da hemolinfa de outros artrópodes (hemolinfagia) ou ainda, praticando uma forma de “pseudocanibalismo” conhecida por cleptohemodipnismo ou cleptohematofagismo. Neste aspecto, os triatomíneos são muito resistentes ao jejum o que, para muitos autores, é um aspecto relativo às populações **K-estrategistas** (NEIVA, 1914, COSTA LIMA, 1940; BRUMPT, 1941; ABALOS e WYGODZINSKY, 1951; RYCKMAN, 1951; RABINOVICH, 1972, BARRETO, 1976, 1979, 1985; LENT e WYGODZINSKY, 1979; MILES, 1981; JURBERG e LOROSA, 1999; LOROSA, 2000; SCHOFIELD, 2000; SANDOVAL, 2000; BARBOSA et al., 2001; RUAS-NETO, 2001; CERETTI JUNIOR, 2003).

1.4. Importância Médica dos triatomíneos

Os hábitos alimentares descritos acima são relevantes para a preservação dos ciclos enzoóticos do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 e de outros tripanosomatídeos como *T. rangeli* Tejera, 1920. *T. cruzi* é o agente etiológico da Tripanosomíase americana (TA) enquanto *T. rangeli* causa infecção não patogênica em humanos e nos demais hospedeiros mas, é patogênico para os triatomíneos. Nos insetos *T. cruzi* instala-se no trato intestinal e *T. rangeli* invade as glândulas salivares (GRISARD et al., 1999; MARCONDES, 2001, PALAU CASTAÑO et al., 2001; GUHL e VALLEJO, 2003; MONROY et al., 2003).

Além disso, esses insetos são inseridos no contexto da Entomologia Médica pelo importante papel epidemiológico que alguns membros da subfamília desempenham como

vetores da doença de Chagas humana (DCH) e por serem capazes de ingerir relevantes quantidades de sangue podendo contribuir também, para a anemia crônica por carência de ferro (CHAGAS, 1909; SCHOFIELD, 1994; COURA et al., 1996; BRAGA et al., 1998; MARCONDES, 2001; GUHL e VALLEJO, 2003).

1.5. Aspectos Epidemiológicos da Doença de Chagas

A doença de Chagas humana (DCH), primitivamente uma zoonose silvestre, tornou-se uma patologia também humana, antropozoonose, a partir das transformações do ambiente natural determinadas pela ação antrópica, fator causal do deslocamento dos vetores de seus ecótopos naturais para o domicílio humano ou suas proximidades, determinando a domiciliação desses vetores e conseqüentemente a “endemização” dessa enfermidade (DIAS e DIAS, 1979; FORATTINI, 1980; SILVA, 1980; DIAS, 2000; SILVEIRA, 2000; WHO, 1991).

Nesse contexto, autores como BARRETO (1979, 1985) LAINSON et al. (1979) e SCHENONE et al. (1985) distinguem dois ciclos epidemiológicos: o ciclo silvestre que é de caráter estritamente enzoótico, no qual o *T. cruzi* circula entre os vetores triatomíneos e uma extensa gama de mamíferos de pequeno e médio porte que constituem seus reservatórios naturais e o ciclo domiciliar, antropozoonótico, em que o parasito circula entre o homem e seus animais domésticos por intermédio do vetor sinantrópico. O uso de biologia molecular revelou nos últimos anos a ocorrência de DCH em múmias procedentes dos andes peruanos e chilenos com até 2.500 a 9.000 anos (ROTHHAMMER, 1985; GUHL et al., 1999; FERREIRA et al., 2000, GUHL et al., 2002; AUFDERHEIDE et al., 2004).

FORATTINI (1980), CARCAVALLO (1985, 1995) e MORENO e CARCAVALLO (1999) incluem ainda, um terceiro ciclo de caráter peridomiciliar onde, mamíferos hemissinantrópicos como os gambás, que são excelentes hospedeiros para o *T. cruzi*, fazem a ponte entre o ciclo silvestre e o domiciliar.

O processo de domiciliação tem como fatores de causalidade aspectos de ordem sociais, políticas, culturais e ambientais, sendo objeto de estudos de vários autores (CALDAS JUNIOR, 1980, DIAS, 1987, 1998, 2000, 2001; SILVA, 1980; MONCAYO, 1999; SCHOFIELD, 1994; SILVEIRA e VINHAES, 1998) e desencadeado uma “torrente” de trabalhos nessa área.

T. cruzi é transmitido naturalmente ao homem e outros mamíferos por meio da contaminação da pele ou mucosas pelas fezes dos vetores infectados, que durante o repasto sanguíneo evacuam próximo ao local da picada. Porém, esses organismos podem também, infectar-se pela ingestão de insetos, de suas fezes, ou de alimentos contaminados com o parasito. Muitos autores admitem que a via oral constitua a forma mais primitiva e natural de transmissão da doença nos ambientes silvestres e entre os mamíferos domésticos ou domiciliados (CHAGAS, 1909; ZERPA e YÉPES, 1967; LENT e WYGODZINKY, 1979; FORATTINI, 1980; WHO, 1991; DIAS, 2000; SCHOFIELD, 2000; CERETTI JUNIOR, 2003).

A transmissão vetorial na extensa área endêmica é responsável por taxas de infecção que variam entre 80% e 90% dos totais encontrados para DCH constituindo-se na principal via de circulação do parasito. No entanto, casos de infecção por transfusão sanguínea, infecção oral por ingestão, transplante de órgãos e contaminação fetal já foram relatados

(KIRCHHOFF et al., 1987; GRANT et al., 1987; OMS, 1991; DIAS e SCHOFIELD, 1999; DIAS, 2000, 2006).

A DCH constitui, ainda em nossos dias, um dos grandes desafios à Saúde na América Latina. Na década de 1990, estimava-se sua incidência ao redor de 16 a 18 milhões de indivíduos e cerca de 90 milhões, vivendo em condições de risco, sendo a terceira causa de morbidade e mortalidade por doenças transmissíveis na América Latina. Seu custo em Anos de Vida Ajustado à Incapacitação era superado, apenas, pelo conjunto das doenças respiratórias e da Síndrome da Deficiência Imunológica Adquirida (WHO, 1991; SCHOFIELD, 1994; DIAS, 1992, 2000; AKHAVAN, 1998; SCHMUNIS, 2000; SILVEIRA, 2000; CERETTI JUNIOR, 2003).

Após a atitude conjunta dos países ligados ao Cone Sul e Pacto Andino para a eliminação dos vetores domiciliados de *T. cruzi* e pelas alterações demográficas que a tornaram uma infecção urbana, esses números tiveram sensível melhora, estima-se hoje, 12 a 14 milhões de indivíduos chagásicos, 60 milhões vivendo em risco e cerca de 20.000 caso/ano em 18 países da América do Sul e Central (MONTEIRO, 2001; WHO, 2002; SCHOFIELD et al., 2006).

Por não haver vacina desenvolvida contra *T. cruzi* e, apesar dos avanços recentes, o tratamento em grande escala da doença de Chagas ser pouco prático, o controle da doença consiste na eliminação de populações domésticas do vetor triatomíneo pulverizando as casas infestadas com inseticidas de ação residual. A fim de otimizar o controle do vetor, necessita-se o conhecimento da estrutura das populações de triatomíneos e a exata identificação das principais espécies vetoras de cada localidade pois, essas informações permitem monitorar a emergência potencial de resistência a inseticidas e prever quão

rapidamente e como um gene que condicione essa resistência pode se espalhar na população (SILVEIRA e REZENDE, 1994; MONTEIRO et al., 2001).

Nesse panorama, dentre os gêneros epidemiologicamente mais significantes incluem-se *Rhodnius* Stål, 1859, *Panstrongylus* Berg, 1879 e *Triatoma*, aos quais pertencem o maior número de espécies descritas e aquelas de maior relevância em saúde pública por possuírem consideráveis sinantropia e capacidade de domiciliação e, desta forma, estabelecerem o elo entre o parasito e o homem (SCHOFIELD, 1994).

No contexto acima, as espécies com maior grau de sinantropia são o *T. infestans* (Klug, 1834) e *T. rubrofasciata*, que ocorrem estritamente domiciliadas; *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. dimidiata* (Latreille, 1811), *R. prolixus* Stål, 1859, *P. megistus* Burmeister 1835 e *T. sordida* (Stål, 1859), entre outras, consideradas em processo de domiciliação pois são capturadas tanto em ecótopos silvestres quanto artificiais e são frequentemente capturadas em colônias domiciliares. Essas espécies, portanto, estão entre os principais vetores do mal de Chagas no Continente (SILVEIRA, 1999; DIAS et al., 2002; DIAS, 2006).

As populações domiciliadas desses vetores no Brasil encontram-se hoje praticamente eliminadas, por meio da borrifação de inseticidas de ação residual, em virtude, da atitude conjunta adotada pelos países do Cone Sul em 1991 para esse fim (SCHOFIELD, 1994, 2001; SCHOFIELD et al., 1999). No entanto, é aceito que a erradicação dessas populações do ambiente domiciliar possa deixar um nicho ecológico vago que poderá ser ocupado por populações autóctones de triatomíneos, até então estritamente silvestres ou peridomiciliares (SILVEIRA e REZENDE, 1994).

Há ainda, outro aspecto da transmissão do *T. cruzi*, principalmente no Brasil, que tem merecido atenção nos últimos anos: é o incremento nos surtos de transmissão oral da doença com 24 casos relatados em Santa Catarina (2005) e 100 casos registrados para a região amazônica, associados ao consumo de caldo de cana-de-açúcar e açaí (ARCOVERDE 2006; PÉREZ-GUTIÉRREZ et al., 2006, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2007).

1.6. Morfologia

A estrutura geral do corpo dos triatomíneos não apresenta diferenças significativas em relação aos demais membros da família Reduviidae. Esses insetos distinguem-se dos outros reduviídeos pelo seu hábito alimentar descrito acima que é considerado uma sinapomorfia do grupo e pelos aspectos da morfologia, fisiologia e etologia, plesiomorfismos, que estão relacionados ao mesmo (COSTA LIMA, 1940; ABALOS e WYGODZINSKY, 1951; LENT e WYGODZINSKY, 1979; SCHOFIELD et al., 1999; CERETTI JUNIOR, 2003; SCHAEFER, 2003, 2005).

Desta forma, a característica mais marcante desses insetos relaciona-se ao rostro que é reto, trisegmentado e voltado para trás quando em repouso, estendendo-se paralelamente abaixo da cabeça, com o ápice nunca ultrapassando o par de pernas anteriores, podendo ser distendido para frente no momento da alimentação graças a uma articulação membranosa, exclusiva da subfamília. Entre os predadores esse órgão geralmente é curvo e em geral não pode ser voltado para frente (COSTA LIMA, 1940; ABALOS e WYGODZINSKY, 1951; LENT e WYGODZINSKY, 1979).

Apesar de ser considerada uma sinapomorfia dos triatomíneos, a hematofagia estrita não é exclusiva desse grupo, em Hemiptera, pois, Polictenidae, Cimicidae e alguns Lygaeidae também o são. Há também hematofagia facultativa em outros hemípteros como Physoderinae (SCHOFIELD, 1999; CARVAVALLO et al., 2000). Além disso, como exposto anteriormente, existem exceções também em triatomíneos quanto ao hematofagismo, caso da cleptohematofia e da hemolinfagia observadas principalmente em ninfas de algumas espécies (NEIVA, 1914; COSTA LIMA, 1940, ABALOS e WYGODZINSKY, 1951; RYCKMAN, 1951; RABINOVICH, 1972; LENT e WYGODZINSKY, 1979; MILES, 1981; LOROSA, 2000; SCHOFIELD, 2000; SANDOVAL, 2000; BARBOSA et al., 2001; RUAS-NETO, 2001).

1.7. Origem dos Triatomíneos

A Família Reduviidae compreende cerca de 6000 espécies dispostas por 25 subfamílias sendo em sua maioria insetos predadores e estão distribuídas nas áreas tropicais e temperadas do mundo (GORLA et al., 1997). E como já exposto anteriormente, esse táxon inclui, ainda, os triatomíneos que se distinguem dos demais reduvídeos pelo hábito hamatófago de seus membros, estando distribuídos, com algumas exceções, mais restritamente à Região Neotropical (LENT e WYGODZINSCKY, 1979; GORLA et al., 1997; SCHOFIELD 1988, 2000; CARCAVALLO et al. 1999, 2000).

A hipótese da origem dos triatomíneos a partir de ancestrais não-hematófagos é comumente aceita, porém, a escassez de registro fóssil dificulta muito o reconhecimento de qual grupo (ou grupos) de predadores esses insetos se originaram (GALVÃO, 2003).

Os primeiros registros fósseis de Hemiptera datam do período Permiano entre 232-280 milhões de anos, mas podem ter ocorrido antes, durante o Devoniano (SCHOFIELD 1994; CARCAVALLO et al., 2000) e a emergência dos reduvídeos predadores entre 135-70 milhões de anos, durante o Cretáceo (BARGUES et al., 2000).

Esses hemípteros primitivos, juntamente aos Homoptera, tiveram origem da linhagem Paraneoptera dos Neuroptera, ramo que inclui todos os insetos alados, exceto os Ephemeroptera e Odonata. Admite-se que os ancestrais de Hemiptera e Homoptera eram sugadores de seiva vegetal (CARCAVALLO et al., 2000).

O surgimento das Famílias de Hemiptera, Heteroptera e das subfamílias de Reduviidae até chegar aos Triatominae foram objeto de várias hipóteses, relacionadas à forma de alimentação desses insetos. Estas consideram que o hematofagismo em Hemiptera desenvolveu-se recentemente (CARCAVALLO et al., 1999, 2000; SCHOFIELD 2000).

Tal comportamento pode ter evoluído a partir dos hábitos predatórios de “picar e chupar”, ou de “lacerar e sugar o fluxo”, ou ainda, de “raspar e filtrar”; passando pelo hematofagismo facultativo, que é observado em Cleradini de Lygaeide, em outros reduviídeos, inclusive alguns Triatominae e nas tribos Doufourieellini e Xylocorini de Anthocoridae, ao hematofagismo estrito de Cimicidae e Polycetenidae e da maioria dos Triatominae (CARCAVALLO et al. 1999, 2000; SCHOFIELD 2000).

Admite-se que a hematofagia consista em um evento evolutivo de origem independente, isto é: representa uma convergência adaptativa desses grupos. Deixando a questão sobre a ancestralidade dos triatomíneos ainda num mistério.

No sentido de tentar solucionar essa questão PAULA et al. (2005) executaram uma série de testes relativos aos grupos-irmãos dos triatomíneos. Seus resultados, ainda que não conclusivos, sugeriram que Salyavatinae como grupo-irmão a Rhodniini e Reduviinae como grupo-irmão de Triatomini.

Representantes dos Hemiptera predadores foram encontrados fossilizados em âmbar e já estavam estabelecidos desde o Oligoceno e Eoceno (25 a 65 milhões de anos). Descoberta recente de um triatomíneo nas mesmas condições foi relatada por POINAR (2005) e verificou-se que o mesmo já estava infectado com forma parasita semelhante aos Trypanosomatidae.

Essa descoberta confirma as evidências moleculares, com base em fragmentos do gene 18S do DNA ribossômico, que apontaram para a divergência dos ancestrais dos Triatomini e dos Rhodiini em torno de 48,9 a 64,4 milhões de anos (BARGUES et al., 2000). Entretanto, em análise posterior, os valores obtidos situaram-se ao redor de 99,8-93,5 milhões de anos, coincidindo com a formação do continente Sul Americano durante a separação da Gondwana (> 95 MA) (GAUNT e MILES, 2002). Os gêneros incluídos nas tribos Rhodniini (habitação em palmeiras) e Triatomini (habitação terrestres e arbóreas) são molecularmente muito divergentes sugerindo que começaram a separar-se a cerca de 99,7-93,6 milhões de anos, período aproximado ao do surgimento das grandes palmeiras. Isso abre para a possibilidade de co-evolução para os representantes do gênero *Rhodnius* ou, ainda, para que a separação de Rhodniini-Triatomini resulte da adaptação de cada um de seus gêneros a um certo hábitat. (83,5-71,3 MA), (LYMAN et al. 1999; GAUNT e MILES 2000, 2002; MARCILLA et al. 2001).

Esses dados proporcionaram novas hipóteses sobre a origem dos clados Neártico e Neotropical de Triatomini. Esses podem ter diversificado independentemente ou, ainda, o clado dos triatomíneos neotropicais, percorrido os seguintes caminhos: divergido a partir de um ancestral não-triatomíneo ou de um “Triatomíneo neártico” já estabelecido como *T. rubida* (PATTERSON et al. 2001; HYPŠA et al. 2002; SAINZ et al. 2004; PAULA et al. 2005).

Há grande interesse também, em relação à origem dos triatomíneos do Velho Mundo e das reais relações de *Linshcosteus* com a subfamília. Esses insetos são considerados estreitamente relacionados a Triatomini Sul americanos como *T. rubrofasciata* (GORLA et al., 1997, HYPŠA et al. 2002) ou, a algum representante do complexo *T. lecticularia*, desse gênero, como *Triatoma rubida* (Uhler, 1834) ou, o nominotípico, *Triatoma lecticularia* (Stål 1859) (PATTERSON et al. 2001). Ambos os casos, se confirmados, são exemplos do que se convencionou chamar de evolução rápida (STEARNS e HOEKSTRA 2002; RIDLEY 2006), pois teriam ocorrido entre 500 - 350 anos apenas e admite-se estarem relacionados à dispersão passiva desses barbeiros (DURJARDIN et al. 1999; PATTERSON et al. 2001).

Porém, as massas de terra que atualmente constituem os continentes da América do Sul, Antártica, África, Índia e Austrália estavam unidas durante o Cretáceo (135-65 MA) formando o grande continente da Gondwana (SHIELDS, 1979, 1998). Como dados moleculares indicam que as linhagens de Rhodniini e Triatomini já estavam estabelecidas a cerca de 95 MA (GAUNT e MILES, 2002) é provável que o suposto ancestral comum a *T. rubrofasciata* e o representantes do Gênero *Linshcosteus* já estivesse

diversificado dos demais Triatominae e iniciado sua dispersão da América do Sul para o bloco que hoje, constitui a Índia e por vicariância dado origem ao ramo indiano.

1.8.Sistemática de Triatomíneos

Até o ano de 2003, a subfamília Triatominae estava composta por 137 espécies distribuídas em 19 gêneros (GALVÃO et al., 2003). Em 2004, foi demonstrada a sinonímia de *Torrealbaia* Carcavallo, Jurberg e Lent, 1998 (Triatominae) com *Amphibolus* Klug, 1830 (Harpactorinae). O ano de 2005 é marcado pela descrição de *Triatoma dominica* Poinar 2005, único triatomíneo fóssil até aqui registrado. No ano de 2006 houve a redescritção de *Triatoma melanica* Neiva e Lent, 1941 e de uma nova espécie do gênero *Belminus*, *Belminus corredori* Galvão e Ângulo, 2006. Em 2007 acrescentou-se ao rol da subfamília *Belminus ferroae* Sandoval, Pabon, Jurberg e Galvão, 2007, *Triatoma juazeirensis* Costa e Felix, 2007 e as recém descritas, *Panstrongylus mitarakaensis* Bérenger e Blanchet, 2007 e *Triatoma boliviana* Martínez, Chávez, Sossa, Aranda, Vargas e Vidaurre 2007 (FORRERO et al., 2004; POINAR, 2005; COSTA et al., 2006; GALVÃO E ÂNGULO, 2006; BÉRENGER e BLANCHET, 2007; COSTA E FELIX, 2007, MARTÍNEZ et al., 2007; SANDOVAL et al., 2007). Portanto, atualmente são reconhecidas 142 espécies ocorrentes e uma fóssil, distribuídas em 18 gêneros (**Tabela 2**).

Tabela 2. Tribos e Gêneros, segundo número de espécies conhecidas, de Triatomíneos, até o momento.

Tribo	Gêneros	No. espécies
ALBERPROSENINI	1- <i>Alberprosenia</i>	2
BOLBODERINI	2- <i>Belminus</i>	8
	3- <i>Bolbodera</i>	1
	4- <i>Microtriatoma</i>	2
	5- <i>Parabelminus</i>	2
	CAVERNICOLINI	6- <i>Cavernicola</i>
RHODNINI	7- <i>Psammolestes</i>	3
	8- <i>Rhodnius</i>	16
LINSHCOSTEINI	9- <i>Linshcosteus</i>	6
TRIATOMINI	10- <i>Dipetalogaster</i>	1
	11- <i>Eratyrus</i>	2
	12- <i>Hermanlentia</i>	1
	13- <i>Meccus</i>	6
	14- <i>Mepraia</i>	2
	15- <i>Nesotriatoma</i>	3
	16- <i>Panstrongylus</i>	14
	17- <i>Paratriatoma</i>	1
	18- <i>Triatoma</i>	70 + 1 fóssil
TOTAL		142

Os diversos caracteres morfológicos dos Triatominae permitem, em geral, a fácil distinção entre as espécies da subfamília. De fato, desde a publicação de *Systemae Naturae* por Linaeus a morfologia sempre foi a ferramenta mais utilizada para resolver os problemas de classificação (ou taxonomia) i.é.: referentes à teoria e à prática de descrição e identificação dos seres vivos como também na ordenação e evolução (sistemática) dos mesmos (LENT e WYGODZINSKY, 1979; ZELEDON, 1993; FORATTINI, 1996; CARCAVALLO et al., 1997; GIRON e TORRES, 1999).

No entanto, alguns grupos apresentam tão grande similaridade morfológica que para diagnose específica são necessárias técnicas taxonômicas mais sofisticadas para caracterizar um táxon (SCHOFIELD, 1988, BARATA et al., 1998a; CARCAVALLO et al., 2001, JURBERG, 2003).

Esses grupos, por praticidade, são agrupados em “complexos específicos” que porém, não constituem uma categoria do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (USINGER, 1966, LENT e WYGODZINSKY, 1979; SCHOFIELD, 1988, 2000; CARCAVALLO et al., 1999, 2000, 2001).

Segundo GALVÃO (2003) os estudos taxonômicos e sistemáticos dos triatomíneos podem ser divididos nas eras pré-cladística e cladística.

A primeira inicia-se com a descrição de *T. rubrofasciata* por DE GEER (1773). Essa espécie foi descrita originalmente por *Cimex rubrofasciatus* mais tarde, designada por Laporte como espécie tipo do gênero *Triatoma*. Podemos ainda destacar pesquisadores como: Stål, Burmeister, entre outros, de maneira que em 1907 o número de espécies conhecidas de barbeiros era de 52, dessas, 32 são ainda válidas (GALVÃO et al., 2003).

Nesse período os trabalhos relativos a esses hemípteros eram ainda executados de modo meramente descritivo tendo a morfologia externa como principal ferramenta taxonômica. Somente com a indicação de um inseto da subfamília como vetor da doença descrita por CARLOS CHAGAS (1909), a necessidade do desenvolvimento de estudos morfológicos e sistemáticos desses hemípteros foi enfatizada.

Nesta fase, são também importantes os trabalhos de NEIVA (1911, 1914), NEIVA e PINTO (1923 a,b,c), NEIVA e LENT (1936, 1941) descrevendo várias espécies discorrendo sobre seus hábitos e distribuição geográfica. Esses autores formulam também

uma chave de identificação das espécies ocorrentes no Brasil. PINTO (1925, 1926, 1931) apresentou uma lista dos barbeiros descritos até então, propondo a utilização dos tubérculos anteníferos para a distinção dos gêneros de maior relevância epidemiológica quanto à doença de Chagas: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*.

Na Argentina, DEL PONTE (1929, 1930) descreve várias espécies do gênero *Triatoma* e também formulou um catálogo descritivo para espécies deste gênero e de *Rhodnius* e *Eratyrus* Stål, 1859. Posteriormente, ABALOS e WYGODZINSKY (1951) fizeram uma revisão das espécies ocorrentes naquele país com dados interessantes sobre aspectos folclóricos, uma lista de nomes que popularmente são conhecidos em vários países do continente latino americano além de dados a respeito da biologia e comportamento desses insetos, tais como a hematolinfagia das ninfas de *T. rubrovaria* em larvas de *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (bicho-da-seda).

USINGER (1944), RYCKMAN (1962) e USINGER et al., (1966) publicam os primeiros estudos biossistemático dos triatomíneos utilizando pela primeira vez o conceito de complexos específicos, mais recentemente revisto por Dujardin et al., (2000).

Certamente, o mais completo trabalho já publicado sobre Triatominae pertence a LENT e WYGODZINSKY (1979) que realizaram uma revisão sistematizada das 112 espécies conhecidas até então, incluindo aspectos cromáticos e da distribuição geográfica das espécies, como parâmetros valiosos para sistemática da subfamília de triatomíneos.

Mais recentemente, CARCAVALLO et al., (1997, 1998, 1999), em três volumes do “Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas”, sumarizaram o que se tem produzido em praticamente todas as áreas de estudos relativos a esses insetos e aos aspectos

epidemiológicos da endemia chagásica, em artigos escritos pelos principais pesquisadores, em atividade, desse grupo taxonômico.

Até aqui, os trabalhos de reconhecimento e descrição de espécies de triatomíneos, assim como ocorre em outros grupos, foram baseados em características meramente morfológicas (GALÍNDEZ-GÍRON e TORRES, 1999). Em 2003 Jurberg traçou um breve histórico sobre as principais ferramentas taxonômicas utilizada durante o período pré-cladista (JURBERG, 2003) referido por GALVÃO (2003). Entre essas, podemos destacar além da implantação das antenas e os aspectos do rosto, citados acima (PINTO, 1931), os trabalhos de Lent e Jurberg iniciados na década de 1960 estabelecendo o significado das estruturas fálicas de machos, sem dúvida os caracteres morfológicos mais consistentes para a determinação e distinção de espécies da subfamília (LENT e JURBERG, 1965, 1967, 1968, 1969a, 1969b, 1970, 1971, 1975, 1978, 1980, 1982, 1983, 1984, 1985, 1987).

Nas duas últimas décadas, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) começa a ser utilizada como uma nova abordagem do estudo taxonômico de triatomíneos. Com base nessa técnica muitos aspectos a respeito do *status* de espécies críticas e dos complexos começam a ser revelados CARCAVALLO et al., (1997).

BARATA et al. (1979, 1980, 1981, 1993, 1994a, 1995) sistematizam a utilização dos caracteres macroscópicos e exocoriais dos ovos de triatomíneos como estruturas auxiliares na identificação de espécies primeiramente para espécies do gênero *Rhodnius* e posteriormente para espécies dos demais gêneros (COSTA et al., 1991; JURBERG et al., 1993, 2002; JURBERG e CAMPOS, 1995; ROSA et al., 2000a; OBARA, 2003; OBARA et al., 2003, 2007a, 2007c; SANTOS et al., 2008, no prelo).

Além dos ovos, são demonstrados os valores sistemáticos dos túbulos testiculares (GONÇALVES et al., 1987); das estruturas cuticulares (CARCAVALLO et al., 1994); da estrutura do Processo do I Urotergito (BARATA et al., 1994b, 1996a, 1996b, 1996c, 1998a, 1998b, 1998c, 1999; OSÓRIO-QUINTERO, 2002; OSÓRIO-QUINTERO, no prelo) e do ápice do processo do escutelo (CARCAVALLO e GIRÓN, 1995; OBARA et al., 2007b).

A morfologia das cerdas e a distribuição das sensilas, nas antenas e nos segmentos abdominais, têm sido estudadas por ROSA et al., (1989, 1995, 2000b), GORLA et al. (1993), CATALÁ e SCHOFIELD (1994), CATALÁ (1996, 1997), CARBAJAL DE LA FUENTE e CATALÁ (2002), CATALÁ e DUJARDIN (2001), CATALÁ et al. (2005) E MORENO e CATALÁ (2006). Bem como a morfologia do nono segmento abdominal ventral em ninfas machos e fêmeas de 5^o estágio por ROSA (1989) e ROSA et al. (1992).

Em associação à Microscopia Eletrônica de Varredura, estes e outros autores introduziram o uso da morfometria isto é: a análise comparativa de distâncias entre pontos fixos relativos ao tamanho do corpo ou segmentos deste, como cabeça, asas, entre outros (DUJARDIN 1999; DUJARDIN et al., 1997a, 1997b; CAHET et al., 1999; MATIAS et al., 2001, PATTERSON et al., 2001; SANTOS et al., 2003, ROCHA et al., 2005).

Nos anos de 1990, intensificam-se as pesquisas filogenéticas dos triatomíneos e, a subfamília tradicionalmente aceita como monofilética por USINGER (1944) e LENT e WYGDZINSKY (1979) com base: no hematofagismo; na membrana presente entre o 2^o e 3^o segmentos do rostro e perda das glândulas de cheiro abdominais dorsais em ninfas; tem esse paradigma questionado (SCHOFIELD, 1988, 2000a 2000b; SCHOFIELD et al., 1999; CARCAVALLO et al., 2000).

Os argumentos para essa proposta são relatados a seguir:

1: Distribuição geográfica descontínua:

Esses hemípteros têm distribuição geográfica descontínua, ou seja: como vimos há uma total ausência de populações autóctones de barbeiros na África, apenas registros de *T. rubrofasciata* que são atribuídos à dispersão passiva por meio de rotas comerciais. Seis espécies do complexo *T. rubrofasciata* ocorrem apenas na Ásia e Austrália sendo ausentes na América; *Linschosteus*, único gênero de ocorrência extra-americana sendo exclusivo do subcontinente indiano (Tabela 1). Esse gênero tem a sua inclusão em Triatominae (tribo Triatomini) considerada duvidosa por SCHOFIELD (1988, 2000a, 2000b), GORLA et al. (1997) e SCHAEFER (1998) principalmente pelo rostró curto e ausência do sulco estridulatório condição aberrante em relação Triatomini (SCHOFIELD 2000) o que levou CARCAVALLO et al. (2000) a criarem a tribo Lischosteini para incluir os representantes do gênero. SCHAEFER e COSCARÓN (2001) com base na análise de 21 caracteres morfológicos compararam *Linschosteus* a 13 outros gêneros da subfamília e concluíram que este era menos similar aos outros do que cada um deles é entre si, o que daria sustentabilidade à tribo, não fossem os resultados das análises moleculares de HYPŠA et al. (2002) e PAULA et al. (2005) em que *Linschosteus* demonstra relacionamento filogenético muito próximo a *T. rubrofasciata* formando clado monofilético com o mesmo.

Provavelmente, a ausência desses insetos na África, seja o resultado da extinção dos triatomíneos daquele continente devido à competição por abrigo e alimento entre estes e os cimicídeos locais. Os cimicídeos apresentam significativa diversidade na África em que estão representados, por 11 Gêneros e 76 espécies reconhecidas. Esses insetos ocupam

nichos muito semelhantes ao que os triatomíneos ocupam nas Américas (SCHOFIELD, 2000b).

2: Hematofagismo

A hematofagia estrita, como comentado anteriormente, é considerada uma sinapomorfia recente de Triatominae. Entretanto, não é um caráter exclusivo dessa subfamília, sendo observadas exceções em alguns membros, como no caso do hemolinfagismo de várias espécies (CARCAVALLO et al., 2000; SCHOFIELD et al., 1999; SCHOFIELD, 2000b; RUAS NETO, 2001).

A evolução desse hábito alimentar exigiu uma série de adaptações na morfologia, como a simplificação do corpo exemplificada pela ausência das asas em *Mepraia spinolai* Porter, 1934 e pela estrutura do aparelho bucal, como afinamento e capacidade de distendê-lo para a frente; fisiológicas em relação à diminuição da toxicidade da saliva e nos processos digestivos para permitir a digestão da hemoglobina; ecológicas, de predadores de vida livre **r-estrategistas**, passando por estágios intermediários de hematofagismo facultativo, até ao estágio atual, **K-estrategistas** e dependente de hospedeiros vertebrados, sobre tudo, mamíferos construtores de ninhos e aves para dispersão. Esses processo implicou em simplificações e especializações, isto é, mutações que são refletidas pelo fenótipo (RABINOVICH, 1972; SCHOFIELD, 1988, 1994, 2000a, b; CARCAVALLO et al.; 1999; SCHOFIELD et al., 1999; CERETTI JUNIOR, 2003).

Há ainda a ocorrência de picadas dolorosas referidas para *Panstrongylus geniculatus*, que causam lesões semelhantes à leishmaniose tegumentar em porcos e de *T. rubrofasciata*, que podem causar choques anafiláticos em ratos. Esses são considerados

características primitivas relacionadas aos reduviídeos predadores (SCHOFIELD et al., 1999).

3: Parafilia ou Polifilia de Rhodnini e Triatomini

As tribos Rhodnini e Triatomini, teriam origem parafilética ou polifilética a partir de diferentes linhagens de reduviídeos não-triatomíneos demonstrada anteriormente por dados fisiológicos, e comportamentais implicando em uma origem independente para o caráter que até então definia a subfamília.

Não podemos nos esquecer que até mesmo a aplicação do conceito biológico de espécie (DOBZHANSKY, 1951; MAYR, LINSLEY e USINGER, 1953, MAYR, 1977) pelo menos, para alguns triatomíneos, já havia sido questionada por USINGER et al., (1966) com base na ocorrência de híbridos naturais por espécies interférteis como: *T. infestans* e *Triatoma platensis* Neiva, 1913, e *T. infestans* e *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), por exemplo, e também, diversas hibridizações obtidas experimentalmente (USINGER, 1944; RYCKMAN, 1962, USINGER et al., 1966, ESPINOLA, 1971, GALLINDEZ GIRON, 1994; CARCAVALLO et al., 1998).

USINGER et al. (1966) admitem que os complexos específicos sejam compostos por espécies politípicas com semelhanças morfológicas e diferentes graus de interfertilidade. Porém, concluem: “à medida que os diversos graus de interfertilidade não comprometam as populações naturais, podemos atribuir o conceito de espécies em Triatominae conforme a definição de MAYR et al., (1953, 1977)”.

No entanto, atualmente há pelo menos duas dúzias de conceitos diferentes para definir o que é uma espécie. Essa quantidade de definições é determinada por dois motivos conflitantes: a busca de se planejar e desdobrar as categorias taxonômicas, segundo uma lógica aristotélica herdada de Linnaeus e o desejo mais moderno de reconhecer e compreender os grupos evolucionários propostos pelo neodarwinismo (HEY, 2001).

Visando esclarecer o caminho evolutivo traçado pelos triatomíneos e assim responder à questão sobre se esses hemípteros têm origem monofilética ou polifilética, retomaram-se os estudos do comportamento e da distribuição geográfica desses insetos (LOROSA, 2000; NOIREAU et al., 2000, SANDOVAL, 2000 SCHOFIELD, 2000; BARBOSA et al., 2001; RUAS-NETO, 2001).

1.8. Estudos Moleculares

As análises moleculares revolucionaram as ciências biológicas entre as muitas aplicações, a definição de marcadores moleculares para a distinção de espécies, a avaliação do posicionamento sistemático dessas, assim como os seus relacionamentos evolucionários são particularmente difundidos (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

O exame do cariótipo pelo uso da análise Citogenética têm sido há décadas utilizado como mostram os trabalhos de PANZERA et al. (1996, 2004). Os resultados dessas pesquisas revelaram que os cromossomos dos triatomíneos são do tipo holocêntrico isto é não há um centríolo (construção primária) e seu número, nas células diplóides, varia muito pouco, entre $2n = 21$ e $2n = 25$, nos machos. Essa variação deve-se à ocorrência de quatro distintos sistemas sexuais: o gênero *Triatoma* apresenta os sistemas XY, X1X2Y e X1X2X3Y, em *Rhodnius* ocorre apenas o sistema XY, para *Mepraia* Mazza, Gajardo e Jorg,

1940 (Lent, Jurberg e Galvão, 1994) foi sugerido o sistema X1X2Y1Y2 já em *Panstrongylus* e *Eratyrus*, o sistema X1X2Y. Das 54 espécies estudadas 20 delas apresentam 20 autossomos, apenas três exceções foram observadas em *T. rubrofasciata* (22 autossomos), *P. megistus* e *Triatoma nitida* Usinger, 1939, ambas com 18 (UESHIMA, 1966; PANZERA et al., 1996; CROSSA et al., 2002; PÉREZ et al., 2003).

Segundo USHEMIA (1979), citado em PÉREZ et al. (2003), o número primitivo diplóide de cromosomos da subfamília é $2n = 22 (20A + XX/XY)$.

A Tribo Rhodniini que inclui (*Rhodnius* e *Psammolestes* Bergroth, 1911) é bem homogênea apresentando poucas variações cromossômicas em seus membros. Em Triatomini, *Panstrongylus* apresenta maior variabilidade que a observada em *Rhodniini*, principalmente *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) com três citotipos. Porém, as espécies do gênero *Triatoma* variam muito. Esses dados apontam para monofilia de *Rhodnius* e polifilia de *Triatoma* (CROSSA et al., 2002; PÉREZ et al., 2003).

Por meio de bandeamento C foram analisadas as diferenças cariológicas que ocorreram durante a dispersão do *T. infestans*, conseguiu-se isolar dois distintos grupos alopátricos que foram chamados de Andina e não-andinos, esses, apresentaram diferenças de até 30% no conteúdo do DNA. Tais resultados sugeriram que o *T. infestans* foi originalmente uma espécie silvestre, com grandes quantidades de DNA e heterocromatina, habitando a região andina da Bolívia. No entanto, durante a dispersão e adaptação ao ambiente doméstico houve redução, tanto em conteúdo de DNA quanto, nas quantidades de heterocromatina, e assim as variações na heterocromatina e DNA genômico devem refletir as mudanças que contribuam para a capacidade adaptativa de *T. infestans* em sobreviver, reproduzir e dispersar por diferentes ambientes (PANZERA et al., 2004).

Também, com o uso de bandejamento C porém, em híbridos de *T. platensis* com *infestans*, *T. platensis* com *Triatoma delpontei* (Romaña y Avalos, 1947) e *T. infestans* com *rubrovaria* mostrou-se que os dois primeiros híbridos têm comportamento meiótico normal, enquanto o terceiro apresentou falhas no emparelhamento dos homólogos, determinado formação de espermátides anormais e conseqüente esterilidade dos híbridos. Esses resultados levam à hipótese de que a repadronização do cariótipo nesses insetos envolveu pelo menos duas rotas distintas: Entre as espécies proximamente relacionadas, as mudanças cromossômicas envolveram, em maior grau, a adição ou a subtração de regiões heterocromáticas. Em espécies mais distantes, rearranjos cromossômicos (isto é inversões e translocações) também ocorreram. Os dados dessa hibridização conduzem para hipótese sobre a origem e a divergência desse grupo taxonômico, como os mecanismos que mantêm o isolamento da espécie (PÉREZ et al., 2005).

PANZERA et al., (2006) demonstraram haver três citotipos restritos a diferentes áreas geográficas em *T. dimidiata*.

As técnicas de observação indireta do acervo genômico, pela análise enzimática, são utilizadas há muito em estudos de triatomíneos. A análise das propriedades eletroforéticas das isoenzimas que apresentam distintos padrões nos testes de eletroforese, tem por décadas, representado a primeira escolha para examinar a taxonomia molecular e os relacionamentos evolucionários de muitos organismos diferentes, incluindo insetos (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

Em nível intra-específico essas análises permitem medir a variabilidade genética de espécies ou populações, a detecção de quebras no equilíbrio de Hardy-Weinberg, estimar a estrutura genética de populações e determinar as taxas de deriva genética em populações

migratórias (FRÍAS e DUJARDIN, 1996; LOXDALE e LUSHAI, 1998; ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

DURJADIN et al., (1998b) demonstraram que as populações de *T. infestans* nas vilas da Bolívia andina são panmíticas e estão estruturadas conforme um modelo de isolamento geográfico que é determinado pela distância entre as localidades e estimaram a provável área de origem dessa espécie, sendo que, cada domicílio, apresentou uma população distinta *per se*.

Por meio das diferenças enzimáticas, foi possível demonstrar também considerável capacidade de dispersão para as populações de *T. sordida* bolivianas, com quebras do equilíbrio de Hardy-Wainberg somente entre populações distantes mais de 20 km entre si (NOIREAU et al., 1999; ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

Muitos autores atribuíram vulnerabilidade ao tratamento com inseticidas das populações triatomínicas à baixa diversidade isoenzimática desses insetos. Nesse caso, a resistência ao tratamento químico se manifesta devido à descontinuidade das aplicações dos inseticidas (SCHOFIELD et al., 1995; GUHL e SCHOFIELD, 1996; SCHOFIELD e DUJARDIN, 1997; DUJARDIN et al., 1998a; 2002; MONTEIRO et al., 2001).

O uso das isoenzimas em taxonomia tem sido útil para se fazer a distinção entre espécies crípticas e também para determinar o status correto de populações simpátricas (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

Essa técnica permitiu a distinção entre *R. colombinesis* Moreno Mejía, Galvão e Jurberg, 1999 e *R. prolixus*, de espécies crípticas de *T. sordida*, a caracterização fenotípica de *T. brasiliensis*, demonstrou não haver distinção isoenzimática entre *R. prolixus* e *R. robustus* sugerindo que sejam linhagens distintas do mesmo táxon, também revelou que

entre as espécies relacionadas aos complexos *M. phyllosomus* de *Meccus*¹ (Stål, 1835) - que na época era denominado *T. phyllosoma* - e *T. oliveirai* de *Triatoma* ocorrem insignificantes diferenciações e confirmou-se a validade da distinção entre os táxons: *T. sordida*, *T. garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prosen & Ronderos, 1967, *T. guasayana* Wygodzinsky & Abalos, 1949 e *T. patagonica* Del Ponte, 1929 e *T. petrochii* Pinto & Barreto, 1925. Ainda em Triatomini, permitiu a inclusão de *M. bassoosea* Aguilar, Nogueta Torres, Cortes Jiménez, Jurberg, Galvão e Carcavallo, 1999 ao complexo *M. phyllosomus* e a distinção desse último, em relação aos complexos *T. lecticularia*, *T. rubrofasciata* e *T. infestans*. (DUJARDIN et al., 1991; HARRY et al., 1992; HARRY, 1993; SOLANO et al., 1996; GARCÍA et al., 1995; COSTA et al., 1997; PANZERA et al. 1997; JURBERG et al., 1998; NOIREAU et al., 1998; MONTERIO et al., 1998, 2001; MORENO et al., 1999; FLORES et al., 2001; NOIREAU, 2002, MARTINEZ et al., 2005).

Noireau e colaboradores fizeram estudos completos sobre os ecótopos, o comportamento e importância epidemiológica de vários triatomíneos bolivianos revelando ser o foco natural de *T. infestans* mais extenso do que se imaginava, abrangendo as terras altas dos Andes até a região do Chaco (NOIREAU et al., 1999, 2000a, b, 2005; NOIREAU e DUJARDIN, 2001; ABAD-FRANCH E MONTEIRO, 2005).

Também para interpretação do caminho evolutivo desses hemípteros o uso de isoenzimas tem sido importante (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005), pois, permitiu avaliar as distâncias genéticas de espécies proximalmente relacionadas (GARCÍA et al., 1995a, 1995b, PEREIRA et al., 1996b, SOLANO et al., 1996, PANZERA et al., 1997, FLORES et al., 2001) e com maiores detalhes ao Gênero *Rhodnius* vários autores

¹ Recentemente este Gênero foi revalidado por Caravallo et al. (2000).

apontaram para a ocorrência de três clados: um deles formado por (*R. pallescens* Barber, 1932 (*R. ecuadoriensis* Lent e Leon, 1958 - *R. colombiensis*)); dois grupos irmãos (*R. prolixus* (*R. nasutus* Stål, 1859 - *R. neglectus* Lent, 1954)) e (*R. stali* Lent, Jurbeg e Galvão, 1993 (*R. pictipes* Stål, 1872 – *R. brethesi* Matta, 1919)) e a parafilia deste grupo com *Psammolestes* sendo este último, considerado grupo irmão do complexo *R. prolixus* em clusters: (*R. domesticus* Neiva e Pinto, 1923 (*Ps. Tertius* Lent e Jurberg, 1965 (*R. nasutus*-*R. neglectus*) (*R. prolixus*-*R. robustus*))) e (*R. pictipes* (*R. brethesi* (*R. pallescens*-*R. ecuadoriensis*))) (CHÁVEZ et al., 1999; DUJARDIN et al., 1999a; MONTEIRO et al., 2002; ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

Diversas técnicas baseadas na observação direta do DNA foram aplicadas aos triatomíneos, tanto nos níveis supra-específicos, de gêneros ou tribos, quanto nos intra-específicos e forneceram novas interpretações sistemáticas e inferências para hipóteses evolucionárias do grupo, dando início a era cladística na análise filogenética desses insetos (GARCÍA e POWELL, 1998, STOTHARD et al., 1998, LYMAN et al., 1999; MONTEIRO et al., 2001; HYPŠA et al., 2002, GALVÃO 2003; ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005; PAULA et al., 2005).

Os arranjos em seqüência de fragmentos genômicos selecionados são úteis para a avaliação direta de polimorfismos do DNA, fornecendo aos investigadores informações para a inferência e a avaliação filogenética das similaridades entre organismos e populações. Muitos dos resultados foram usados para refinar e melhorar estratégias do controle da doença em toda a América Latina e serão, provavelmente, cruciais para os estudos dos vetores secundários também (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005).

Segmentos diferentes dos genomas mitocondriais (mtDNA) e nucleares (ncDNA) evoluem em taxas diferentes. As regiões com taxas mais altas de evolução, isto é, de mutação são apropriadas para o estudo de organismos proximamente relacionados, enquanto as seções mais conservadas são apropriadas para comparações entre táxons mais distantemente relacionados (ABAD-FRANCH e MONTEIRO, 2005; WINK, 2006).

Esses estudos incluem técnicas como RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) que consiste na amplificação aleatória de seqüências do DNA usando-se seqüências curtas (10 a 20 pares de bases) de marcadores (ou primers) não específicas (CARLIER et al., 1996, DUJARDIN et al., 1998a, GARCÍA et al., 1998, NOIREAU et al., 2000a, BORGES et al., 2000, 2005, JARAMILLO et al., 2001, BRENIÈRE et al. 2002, PACHECO et al., 2003; RAMÍREZ et al., 2005), SSPC, do inglês: *Single Strand Conformational Polymorphism*, ou análise única, ou simples, de polimorfismo conformacional (STOTHARD et al., 1998), caracterização de marcadores polimórficos de microssatélites (HARRY et al., 1998, ANDERSON et al., 2002, GARCÍA et al., 2004; MARCET et al., 2006; PFEILER et al., 2006), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (JUSTINO 2004; TARTAROTTI et al., 2005; NAEGELE et al. 2006) e mais recentemente, Multiplex-PCR (PAVAN e MONTEIRO, 2007).

Até o momento foram testadas as variações espécie-específicas no comprimento de fragmentos amplificados de RNA ribossômico (JARAMILLO et al., 2001), arranjos de seqüências selecionadas do ncDNA (MONTEIRO et al., 2000, BARGUES et al., 2000, 2002, 2006; MARCILLA et al., 2000, 2001, 2002; TARTAROTTI et al., 2005) e fragmentos de genes do DNA mitocondrial (GARCÍA e POWELL, 1998, STOTHARD et al., 1998, LYMAN et al., 1999, MONTEIRO et al., 1999, 2000, 2003, 2004, GARCÍA et

al., 2001, 2003, GAUNT e MILES, 2002, HYPŠA et al., 2002, SAINZ et al., 2004; PAULA et al., 2005, MARTINEZ et al., 2006).

Os genes nucleares são bastante conservados e a análise do polimorfismo desses pode ser utilizada para inferências relativas às relações supra-específicas, isto é: categorias taxonômicas mais abrangentes do que a Espécie, tais como: Gêneros, Famílias, Ordens, etc. No entanto, os espaçadores internos transcritos do RNA ribossômico (ITSs) possuem informações que podem ser usadas para estudos de populações (ABAD-FRANCH e MONTEIRO 2005).

Esses espaçadores são usados para solucionar problemas em arranjos de seqüências ou alinhamentos e de variabilidades intragenômicas. Além dos fragmentos de genes mitocondrias, que veremos a seguir, o segundo espaçador interno transcrito (ITS-2) do rDNA nuclear foi testado como um marcador molecular para comparações entre populações, espécies, e relacionamentos filogenéticos envolvendo espécies do complexo *M. phyllosomus*, do gênero *Panstrongylus*, várias populações de *T. infestans* e alguns Rhodniini (BARGUES et al., 2002; MARCILLA et al. 2000,2001, 2002; ABAD-FRANCH e MONTEIRO 2005).

Nesses estudos ficou demonstrado que Triatomini possui dois clados principais, um deles compreende as espécies da América do Norte e Central e o outro, as espécies Sul americanas. Confirmou-se a parafilia de Rhodniini com *Ps. tertius* mais próximos a *R. prolixus* do que esse a *R. stali* (MARCILLA et al. 2001).

Mais tarde MARCILLA et al. (2002) apresentaram dados que revelaram que o gênero *Panstrongylus* possui relacionamento mais estreito com os Triatomini da América Central do que com os ocorrentes na América do Sul. Estes estudos também, forneceram

evidências para a necessidade futura de alguns rearranjos taxonômicos para o complexo do *M. phyllosoma* e para o gênero *Panstrongylus* (ABAD-FRANCH e MONTEIRO 2005). Por exemplo, *Meccus picturatus* Usinger, 1939 e o *Meccus longipennis* Usinger, 1939 tiveram seqüências idênticas, e o grau de variabilidade encontrada em *T. dimidiata* foi maior do que o registrado para as espécies de *M. phyllosomus*. As espécies *Panstrongylus lignarius* (Walker, 1873) e *Panstrongylus herreri* Wigodzensky, 1948 são idênticas quanto ao ITS-2, sendo posteriormente sinonimizadas por GALVÃO et al. (2003). ABAD-FRANCH e MONTEIRO (2005) relatam que este procedimento talvez deva ser adotado também com relação a *Panstrongylus chinai* (Del Ponte, 1929) e *Panstrongylus howardi* (Neiva, 1911) que parecem tratar-se de variações cromáticas da mesma espécie.

Outros dados evidenciados nesse artigo são relativos ao posicionamento de *Panstrongylus rufotuberculatus* (Champion, 1899) como táxon-irmão ao clado *T. dimidiata*-*M. phyllosomus*, tendo o ramo formado por *Triatoma barberi* Usinger, 1939 e *D. maxima* basal a esse agrupamento, o que foi interpretado como uma indicação de forte “não-monofilia” de *Panstrongylus*. Havendo prováveis influências antrópicas na dispersão passiva das populações de *T. dimidiata* da Mesoamérica para a região equatoriana e, também, das populações geográficas e sinantrópicas de *T. infestans* (MARCILLA et al. 2002).

Com o uso da subunidade 18S do rDNA nuclear que exhibe taxas de divergência (1,8% por 100 milhões de anos) até 55 vezes mais lenta do que o ITS-2, ou mesmo para os genes que codificam proteínas do DNA mitocondrial, pode-se inferir que a divergência entre o ancestral comum e os antepassados dos Triatomíneos (Rhodniini e Triatomini) ocorreu a cerca 48.9-64.4 milhões de anos (Paleoceno-Eoceno). Estima-se que a separação

entre as espécies centro e sul americanas de Triatomini foi entre 22.8 e 31.9 milhões de anos, pelo 18S e 19.5 a 34.1 milhões de anos, usando o ITS-2 antes que o Istmo do Panamá unificasse o continente americano há cerca de 3 milhões de anos (meados do Plioceno). Isso sugere origens evolucionárias independentes para Rhodniini e Triatomini, cujos antepassados comuns divergiram durante o Oligoceno-Mioceno (BARGUES et al., 2000; ABAD-FRANCH e MONTEIRO 2005).

O ITS-2 foi também testado em conjunto ao gene citocromo B do DNA mitocondrial (mtCitB) para os triatomíneos mexicanos. Pela análise das seqüências ITS-2 as espécies do complexo *M. phyllosomus* não puderam ser separadas filogeneticamente, *M. bassolsae* e *Meccus pallidipennis* Stål, 1872, bem como *M. phyllosomus* e *Meccus mazzottii* Usinger, 1941 foram indistinguíveis (MARTINEZ et al. 2006). Em contraste, o mtCitB separou cada espécie testada excluindo apenas *T. dimidiata* (MARTINEZ et al. 2006).

A amplificação de primers aleatórios de DNA (RAPD) foram também, utilizadas em Triatomiane. Pelos padrões das bandas separaram claramente *T. sordida* de *T. infestans* e discriminaram populações silvestres das domiciliadas dessas espécies como mostram os estudos de CARLIER et al. (1996) e mais recentemente de NOIREAU et al. (2000a) que conseguiram separar, no cladograma, dois ramos principais de populações de *T. infestans* da Bolívia (Chaco e Andes) e ainda, em cada ramo as populações silvestres das populações domiciliadas desse vetor.

Um estudo de RAPD analisado conjuntamente a seqüências de ITS-1 e ITS-2 e ao gene 5.8S mostrou haver divergência entre populações de *T. rubrovaria* distantes 220 km no Estado do Rio Grande do Sul (PACHECO et al., 2003).

GARCÍA et al. (1998) encontrou perfis diagnósticos de RAPD para os pares *R. prolixus-robustus* e *R. neglectus-nasutus* de Honduras e populações colombianas de *R. prolixus* obtendo padrões para diagnose de populações por RAPD, com reduzida variabilidade entre as populações da América Central sugerindo dispersão passiva recente a partir da América do Sul, o que possibilite talvez, a erradicação local de *R. prolixus* na América Central (DUJARDIN et al., 1998a).

BRENIÈRE et al. (2003) conseguiram separar *M. pallidipennis* de *M. longipennis* e *M. picturatus*. No entanto, encontrou grande similaridade entre as duas últimas.

Recentemente RAMÍREZ et al. (2005) estudaram populações silvestres, peridomiciliadas e domésticas de *T. dimidiata* na região endêmica de Bocaya, Colômbia, e verificaram haver um fluxo genético elevado entre as três populações, maior até, do que os encontrados por JAMARILLO et al. (2001) e para as populações de *Rhodnius* no mesmo país e GARCIA et al (2003) para *T. infestans* na Argentina. Esses resultados impediam a distinção das populações de *T. dimidiata* estudadas, sugerindo risco de reinfestação dos domicílios tratados a partir dos indivíduos silvestres e peridomiciliados.

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas dos eucariotas envolvidas em processos fisiológicos e patológicos. Nos metazoários cada mitocôndria tem uma única molécula do DNA, 15-20 Kb (quilobases) de comprimento e contem 37 genes que codificam 2 rRNAs, 22 tRNAs e 13 mRNAs que são responsáveis pela síntese de proteínas da respiração celular. O DNA mitocondrial tem diversas propriedades que o tornam uma ferramenta valiosa para estudar, genética de populações, evolução molecular e os relacionamentos filogenéticos. Estas, incluem a sua estrutura genética relativamente simples que apresenta seqüências transmitidas diretamente, sem nenhuma recombinação,

das mães aos filhos e taxa de mutação rápida, até dez vezes maior do que as dos DNAs nucleares (DOTSON e BEARD 2001; ABAD-FRANCH e MONTEIRO 2005).

O primeiro DNA mitocondrial de triatomíneos totalmente seqüenciado foi de *T. dimidiata*. Esses autores obtiveram uma seqüência de 17079 pb mais longa comparavelmente aos demais insetos testados até então (DOTSON e BEARD 2001).

Nos triatomíneos, o primeiro trabalho publicado com o uso de genes mitocondriais foi publicado em 1999 por Fernando Monteiro e colaboradores com base no polimorfismo de seqüências do gene mtDNA citocromo b (CitB) de populações *T. infestans* (MONTEIRO et al.1999). Os resultados revelaram *T. melanosoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo, 1987 e *T. infestans* Dark morphs Noireau, Flores, Gutierrez e Dujardin, 1997, silvestres, são variantes fenotípicas da espécie *T. infestans*. Encontraram também, pequenas diferenças entre populações da Bolívia e as procedentes da Argentina e do Brasil. Dentro da Bolívia, todos aqueles dos Andes apresentaram haplotipos idênticos, visto que os “dark morphs” das planícies do Chaco tiveram seqüências ligeiramente divergentes. Essas formas escuras, diferiram dos *T. infestans* andinos apenas em seus fenótipos e nos aspectos ecológicos.

Em um estudo mais recente das seqüências de CitB envolvendo todas as variantes cromáticas de *T. brasiliensis* mostrou-se que as formas conhecidas como juazeiro e melânica mereciam provável status de espécie (MONTEIRO et al., 2004). Posteriormente as duas variantes foram elevadas para o nível de espécies por COSTA, ARGOLO e FELIX (2006) – *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status e COSTA e FELIX (2007) – *Triatoma juazeirensis* sp. nov.

A análise do mtDNA revelou forte divergência nas populações mexicanas de *T. dimidiata* provenientes de Yucatan, daquelas distribuídas mais ao Sul ao longo da América Central até a Colômbia (ABAD-FRANCH e MONTEIRO 2005).

Em Rhodniini, foram estudadas diversas populações de *R. prolixus* (Venezuela, Colômbia, Honduras, Guatemala, e Brasil) revelando ocorrência de haplotipos virtualmente idênticos do CitB, o que sugere, que as linhagens sinantrópicas sofreram dispersão artificial recentemente (MONTEIRO et al. 2000, 2003). Em contra partida, *R. robustus* apresentou divergência significativa em relação ao mesmo gene, sugerindo tratar-se de um complexo com pelo menos quatro populações estreitamente relacionadas (MONTEIRO et al 2003).

O estudo de populações de *R. ecuadoriensis* de ABAD-FRANCH et al. (2004) citado por ABAD-FRANCH e MONTEIRO (2005) revelou grande divergência haplotípica naquelas procedentes do Peru enquanto, entre quatro populações do Equador havia grande similaridade, podendo tratar-se de duas espécies discretamente distintas.

GARCIA et al. (2003) usando fragmentos combinados (12S e 16S) do rDNA mitocondrial verificou a ocorrência de heteroplasmia em 15% dos espécimes analisados de populações geográficas de *T. infestans* da Argentina.

Cruzando-se dados dos fragmentos 12S e 16S do mtDNA com o gene citocromo oxidase I (COI) foi estabelecido o relacionamento filogenético das 11 espécies do complexo *T. infestans* com *Triatoma circummaculata* Stål, 1859, *T. protracta*, *T. dimidiata* e *T. mazzotti*. O estreito relacionamento de *T. infestans* e *T. platensis* foi confirmado, o que sugere uma introgressão do mtDNA entre essas espécies; *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* apareceram dentro do complexo Infestans; *P. megistus* alinhou as espécies norte americanas e *T. sordida* apareceu mais próximo a *Triatoma matogrossensis* Lent e Barbosa,

1953 e muito diferente do *T. guasayana* (GARCÍA e POWELL 1998, GARCÍA et al., 2001).

Os genes CitB e 16S foram usado por LYMAN et al. (1999). Rhodniini separou-se de Triatomini indicando divergência profunda entre as duas tribos. Em Triatomini as espécies formaram dois “clusters” separando as espécies Centro e Norte americanas da América do Sul. Embora tenham posicionamento incerto, *P. megistus* e *D. maxima* estavam bem alinhados a *Triatoma* uma indicação da natureza parafilética de *Panstrongylus*.

MONTEIRO et al. (2000) avaliaram os relacionamentos entre diversas espécies de Rhodniini confirmando a parafilia de *Rhodnius*, *Psammolestes* apareceu mais perto do clado “*prolixus*” do que este estava do clado de “*pictipes*”. Essa análise rendeu dois cladogramas principais ((*brethesi-pictipes*) (*ecuadoriensis-pallescens*)) e (*Ps. tertius* (*Rhodnius neivai* Lent, 1953 (*R. domesticus* (*R. nasutus* (*R. neglectus* - *R. prolixus*) (*R. robustus* - *R. prolixus*))))).

HYPŠA et al. (2002) DNA usando fragmentos de DNA dos genes 12S e 16S do DNA mitocondrial, construíram uma filogenia com 57 espécies de nove gêneros de Triatominae, incluindo também, *Linshcosteus*, gênero que ocorre exclusivamente no subcontinente indiano. Mais uma vez confirmou-se que as subdivisões genéricas atuais não constituem cladogramas monofiléticos. *Panstrongylus*, *Dipetalogaster*, *Mepraia*, e *Linshcosteus* apareceram como taxa irmãs de espécies diferentes de “*Triatoma*”. Foi confirmada a parafilia de *Rhodnius* com respeito a *Psammolestes*. Novos arranjos taxonômicos, como a revalidação de *Meccus* Stål, 1872 (Carcavallo et al., 2000) e *Nesotriatoma* Usinger, 1944, foram propostos. Mas, a notória não-monofilia de *Panstrongylus* não foi considerada (ABAD-FRANCH e MONTEIRO 2005).

Para STEVENS e SCHOFIELD (2003) o achado mais importante deste trabalho, se bem que pouco sustentado, era a indicação de que Triatominae é monofilético. A observação de *Linshcosteus* relacionado a *T. rubrofasciata* como seu táxon-irmão dentro de Triatomini, deixava claro não haver possibilidade de uma origem independente para *Linshcosteus*.

Dados moleculares (COI) recentemente indicaram que diversificação de Triatomini a partir de outros insetos não-Triatomini teve início a cerca de 93 milhões de anos, durante o Cretáceo quando ocorreu a separação das terras da América do Sul e África (GAUNT e MILES 2002).

Pelo uso combinado dos marcadores 16S e COI, SAINZ et al. (2004) propuseram a inclusão de *T. circummaculata* no complexo Infestans do gênero *Triatoma*. Um outro dado interessante nessa análise foi a formação de um “cluster” composto por *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa e Espínola (1964) contrariando os resultados de HYPŠA et al. (2002) em que ambas mostraram-se bastante divergentes.

Posteriormente, em três estudos que envolveram também as espécies *Triatoma arthurneivai* Lent e Martins, 1940 e *T. wigodizinskyi* Lent, 1951, demonstrou-se pelo uso das técnicas de citogenéticas, isoenzima e pela morfometria da cabeça, tórax e do abdomen além, do fenótipo antenal que os resultados para *T. maculata* de SAINZ et al. (2004) são errôneos pois, os exemplares dessa espécie utilizados, travam-se de *T. pseudomaculata* procedente do Estado de Sergipe, rotulados equivocadamente como a primeira espécie. (CARBAJAL DE LA FUENTE, 2007; SANTOS et al., 2007; CARBAJAL DE LA FUENTE e CATALÁ, 2008, no prelo)

PFIELDER et al. (2006) estudaram as populações de *T. recurva* e *T. rubida* do deserto de Sonora (México) usando mtCitB e mtCOI sugerindo a divergência de 500.000 a 900.000 anos para as populações simpátricas de *T. rubida uhleri* do sul do Arizona.

1.9. Os desafios da sistemática molecular de triatomíneos:

Como exposto anteriormente em 1988 a origem monofilética da subfamília é questionada pelas evidências da distribuição geográfica, fisiológicas e comportamentais (SCHOFIELD, 1988,2000, GORLA e SCHOFIELD, 1997). No entanto, a abordagem cladística para esses insetos foi primeiramente usada por GARCIA e POWELL (1998) e STHORTARD (1998) com a utilização de técnicas biomoleculares.

Para SCHEAFER (2003) a utilização da análise cladística é essencial no momento, pois permitirá solucionar todos os impasses quanto ao real status dos membros da subfamília Triatominae. Uma vez que, se sua origem for de fato polifilética (dois ou mais ancestrais não-triatomíneos) - e as evidências reforçam - as inferências feitas a uma espécie, ou grupo, não poderão ser estendidas para as demais, afetando não apenas as questões acadêmicas mas, em especial, todas aquelas relativas à vigilância entomológica e ao controle desses insetos (JURBEG, 2003; SCHAEFER, 2003, 2005).

II. JUSTIFICATIVA

Os conhecimentos a respeito da morfologia dos triatomíneos encontram-se bastante desenvolvidos. A utilização de ferramentas taxonômicas cada vez mais sofisticadas, como microscopia eletrônica de varredura (MEV), a morfometria e também, aquelas relacionadas à biologia molecular e citogenética, têm sido bastante esclarecedoras, tanto para determinação de espécies novas, quanto para a compreensão e resolução de problemas relacionados ao grau de similaridade entre as espécies crípticas ou mesmo, relativo ao status específico dos insetos incluídos neste táxon.

Entretanto, as lacunas relativas a origem polifilética (ou difilética) ou monofilética desses insetos precisam ser preenchidas. Esse fim só será alcançado por meio da análise cladística na totalidade dos elementos do grupo. Isso se concretizará apenas mediante a concentração dos esforços dos vários pesquisadores desse táxon em disponibilizar o maior número de dados possíveis e utilizando às várias técnicas e ferramentas taxonômicas disponíveis no momento.

O uso dos marcadores moleculares revolucionou as pesquisas em Biologia e tudo indica que fará, ainda, muito mais. À disposição no insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SESA, que pertence ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brasil, existe um grande acervo biológico que conta atualmente, com 31 espécies de triatomíneos dos Gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, distribuídos em 140 colônias de diversas procedências nacionais e internacionais e que são utilizadas por pesquisadores locais e de instituições de outros estados e nações para estudos que vão da taxonomia à ecologia desses hemípteros. No entanto, somente umas poucas colônias foram pauta de estudos moleculares.

A análise do perfil genético desse acervo em muito, pode contribuir para a solução das questões sistemáticas expostas acima, imprescindíveis para as ações de vigilância e controle dos vetores da doença de Chagas, no Brasil.

III. OBJETIVOS:

- Obter fragmentos de seqüências dos genes mitocondriais 16S e Citocromo B com o intuito de traçar o perfil genético de triatomíneos obtidos de colônias mantidas pelo insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara, pertencente ao Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
- Reconhecer possíveis erros de identificação e/ou rotulagem dos barbeiros mantidos nessas colônias;
- Oferecer novos dados moleculares (fragmentos de seqüências gênicas) desses insetos e depositá-los no GenBank;
- Fazer análises filogenéticas moleculares desses triatomíneos comparando-os às seqüências depositadas no GenBank, possibilitando inferências relativas às relações evolutivas dos membros desse taxon;
- Possibilitar análises filogenéticas mais precisas no futuro.

IV MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedência dos Triatomíneos

Foram testados três indivíduos de espécies dos Gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, adultos (machos e/ou fêmeas) e ninfas de V estadio, procedentes de colônias mantidas pelo insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), conforme **Tabela 3**, além de indivíduos de *T. baratai* (3 ninfas), procedentes de Nioaque – MS, de *T. matogrossensis* (3 ninfas), de Rio Verde – MS, que foram gentilmente cedidos pelo Sr. Paluo Silva de Almeida, Núcleo Regional de Entomologia de Campo Grande - MS e ninfas de *T. wygodzinskyi* (3 ninfas), de Santa Rita de Caldas-MG, obtidos em coleta de campo pelo Dr. José Maria Soares Barata.

No insetário, esses insetos são acondicionados em cristalizadores de vidro comum, com cerca de 10 cm de altura e 25 a 30 cm de diâmetro, com o fundo revestido por papel filtro. No centro do cristalizador coloca-se um separador de papelão, em forma de “torre”, confeccionado de tal modo que permite movimentação vertical, horizontal, bem com entre as distintas celas, dos indivíduos. Os barbeiros são alimentados, em patos, a cada 15 dias.

De algumas espécies testamos mais de uma procedência caso, de *R. prolixus*, *R. robustus*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. pseudomaculata*, *T. rubrovaria* e *T. sordida* buscando distinguir populações biogeográficas.

Nessa análise utilizou-se seqüências de DNA mitocondrial de fragmentos do gene Citocromo B (CitB) e da subunidade ribossômica RNA gene mitocondrial (mtlsur RNA ou 16S).

Os experimentos foram executados no Laboratório Entomologia em Saúde Pública (LESP) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Os exemplares enviados semanalmente pelo insetário do SESA foram condicionados em Tubos tipo Falcon de 50 ml, devidamente identificados e conservados em *freezer* a -70° C até o momento da extração do DNA total.

Tabela 3: Triatomíneos mantidos em colônias pelo SESA-USP, de Araraquara – SP, utilizados para extração e amplificação de fragmentos de DNA mitocondrial dos genes 16S e CitB.

CTA	Espécie	Procedência
001	<i>R. neglectus</i>	Guaira – SP
003	<i>R. prolixus</i>	Colômbia
004	<i>R. prolixus</i>	Colômbia (linhagem com olhos vermelhos)
005	<i>T. brasiliensis</i>	Umari – CE
006	<i>T. vitticeps</i>	Guaraparí – ES
007	<i>T. infestans</i>	Mambaí – GO
008	<i>P. megistus</i>	Almino Alfonso – RN
009	<i>T. sordida</i>	Cordeiro e outros – BA
011	<i>R. robustus</i>	Madre de Dios – Perú
012	<i>R. robustus</i>	Lima – Perú
013	<i>R. neglectus</i>	Frutal – MG
016	<i>R. neglectus</i>	Pitangueiras – SP
018	<i>T. pseudomaculata</i>	Pocinhos – PB
020	<i>T. sordida</i>	Guaira – SP
021	<i>T. lecticularia</i>	Walrika-Oklahoma – EUA
022	<i>T. infestans</i>	Frutal – MG
026	<i>T. sordida</i>	Tanhaçu – BA
028	<i>T. sordida</i>	Brasilândia – MS
029	<i>R. prolixus</i>	Fac. Medicina – USP
030	<i>T. infestans</i>	Tucuman – Argentina
042	<i>T. pseudomaculata</i>	Vicência – PE
043	<i>T. infestans</i>	Cochabamba – Bolívia
045	<i>T. protracta</i>	Monte Diablo – Claifórnia – EUA
046	<i>R. prolixus</i>	Costa Rica
048	<i>R. prolixus</i>	Venezuela
057	<i>R. pictipes</i>	Jacundá – PA
060	<i>R. nasutus</i>	Patú e outros – RN
061	<i>R. neglectus</i>	Jucurutu – RN
067	<i>T. infestans</i>	Tanhaçu – BA
072	<i>T. infestans</i>	Sta. Cruz – Bolívia
073	<i>T. infestans</i>	Glória de Dourados e outros – MS
076	<i>T. brasiliensis</i>	S. João do Piauí/Conc. Canindé – PI
080	<i>T. brasiliensis</i>	Patú e outros – RN
082	<i>P. megistus</i>	Araraquara – SP
088	<i>T. platensis</i>	Córdoba – Argentina
091	<i>T. pseudomaculata</i>	Ceará
094	<i>T. pseudomaculata</i>	Teofilândia – BA
108	<i>T. rubrovaria</i>	Caçapava do Sul – RS
111	<i>T. pseudomaculata</i>	Messias Targino e outros – RN
117	<i>T. rubrovaria</i>	Pelotas – RS
118	<i>P. herreri</i>	Bagua – R. Utoubamba – Perú
120	<i>T. maculata</i>	C. Galaú – Venezuela
124	<i>R. pallescens</i>	Barro Colorado – Panamá
133	<i>T. platensis</i>	La Pampa – Argentina
137	<i>P. megistus</i>	São Felipe – BA
139	<i>P. megistus</i>	Sta. Maria do Cambucá – PE
144	<i>P. megistus</i>	Carmo Paraíba/Lagoa Formosa – MG
146	<i>P. megistus</i>	Boca da Mata – AL
148	<i>P. megistus</i>	Ortigueira – PR

151	<i>P. megistus</i>	Curitiba – PR
157	<i>T. tibiamaculata</i>	Mogi Guaçu – SP
176	<i>T. matogrossensis</i>	Sem informação (única colônia disponível no SESA)
184	<i>T. williami</i>	Barra do Garça/Serra Azul – MT
191	<i>T. costalimai</i>	Mambai – GO
192	<i>T. guazu</i>	Belém do Pará – PA
194	<i>R. domesticus</i>	Belém do Pará – PA
196	<i>T. maculata</i>	Belém do Pará – PA
197	<i>T. pseudomaculata</i>	Rio de Janeiro – RJ
212	<i>R. colombiensis</i>	Colômbia
224	<i>T. sp</i> (não identificado)	Umofalda – RS
227	<i>T. klugi</i>	Nova Petrópolis – RS
228	<i>P. megistus</i>	Florianópolis – SC
231	<i>T. vandae</i>	Itiquira- MS
232	<i>T. guazu</i>	Barra do Garça – MT
233	<i>T. melanosoma</i>	Misiones – Argentina
238	<i>T. brailiensis</i>	Lucrecia – RN
241	<i>R. sp.</i> (não identificado)	Monte Negro – RO
242	<i>R. sp.</i> (não identificado)	Monte Negro – RO
243	<i>R. sp.</i> (não identificado)	Monte Negro – RO
244	<i>R. sp.</i> (não identificado)	Monte Negro – RO
245	<i>T. sherlocki</i>	Santo Inácio – BA

4.2. Extração do DNA total.

Os exemplares obtidos foram mortos por congelamento a -70°C . O DNA genômico foi extraído individualmente utilizando o método de extração fenol-clorofórmio (ZÄHLER et al. 1995) adaptado para triatomíneos por LYMAN et al. (1999). De cada exemplar adulto retirou-se as pernas (os três pares) e a cabeça. As ninfas foram processadas integralmente.

O DNA foi obtido por meio da maceração individual, com pistilo, das peças anatômicas acima, em micro-tubos de 1,5 ml nos quais adicionou-se 150 μl tampão de lise (Tris-HCl 10mM, SDS 20%, EDTA 50 mM) + 0,8 μl de proteinase K 20 ng/ μl + 1,0 μl de RNase 10 mg/ μl . Dessa forma obteve-se um homogenado ao qual submeteu-se a quatro ciclos de congelamento-descongelamento em N_2 líquido e incubados por 1 hora em “banho seco” a 60°C . Após a incubação o DNA foi extraído com 100 μl de fenol, 100 μl de FCI (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico 25:24:1) e 100 μl de

clorofórmio: álcool isoamílico (24: 1). O DNA foi então precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto (*overnight* a 4°C). Após centrifugação (12,000 x g por 5 min), o pelete foi ressuspensionado com 50µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM).

4.3. Amplificação do gene 16S e CitB do DNA mitocondrial e sequenciamento.

Cada DNA individualmente obtido foi utilizado para amplificação dos genes 16S e CitB.

Foram utilizados os iniciadores (*primers*) dos fragmentos do gene 16S de acordo com LYMAN et al. (1999), e denominados aqui como:

16SF 5' CAT CTG TTT A(A/T)C AAA (A/G)AC AT 3', e

16SR 5' AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA 3'.

Para o gene CitB, os *primers* foram os seguintes:

CitBFor: 5' GGA CAA ATA TCA TGA GGA GCA ACA G 3', e

CitBRev: 5' ATT ACT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G 3'

As reações de amplificação dos dois genes foram conduzidas por 35 ciclos (95°C por 45 seg., 55°C por 1 seg., e 72°C por 1 seg.) e seus produtos (ao redor de 500 pares de bases) foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Os fragmentos obtidos foram então seqüenciados diretamente em ambas direções com os mesmos *primers* usando o sistema "ABI Prism dGTP BigDye

Terminator Ready Reaction Kit” (Perkin Elmer, Foster City, CA). O sequenciamento foi realizado no Instituto de Química da USP, Departamento de Bioquímica.

4.4. Análise das seqüências.

Foram feitos dois alinhamentos com as seqüências dos fragmentos dos genes 16S e CitB utilizando o programa CLUSTAL W (1.60) (THOMPSON et al. 1994), incluindo seqüências de vários outros triatomíneos depositadas no GenBank (**Tabela 4** e **Tabela 5**)

Os alinhamentos foram examinados com o programa MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 3.01) (KUMAR et al. 2003) e uma matriz de divergência foi gerada para cada gene.

As relações entre as espécies foram avaliadas por três métodos: *Neighbor Joining* (NJ) com distância Kimura dois parâmetros, 1000 replicações no teste de “*bootstrap*” (MEGA); Máxima Parcimônia (MP) com 1000 replicas de “*bootstrap*” e opção de busca “*branch-and-bound*”; e Máxima Verossimilhança (ML), utilizando o programa PHYLIP: (*Phylogeny Inference Package, version 3.6*) (FELSENSTEIN 2004).

Para o gene 16S, as três árvores foram enraizadas com seqüências deste gene de *Oncerothelus sp* e *Arilus cristatus*, como grupo externo (número de acesso no GenBank/EMBL na **Tabela 4**).

No caso do gene CitB, o mesmo procedimento foi realizado, e as três árvores foram enraizadas com seqüência desse gene de *Arilus cristatus*, como grupo externo (número de acesso no GenBank/EMBL na **Tabela 5**).

Tabela 4. Número de acesso de seqüências do gene 16S do DNA mitocondrial de espécies de insetos da Família: Reduviidae, obtidas no GenBank, para comparação com as seqüências geradas nesse estudo.

Espécie	Número de acesso
<i>Oncerothelus sp</i>	AY252739
<i>Arilus cristatus</i>	AF045712
<i>Rhodnius domesticus</i>	AY035440
<i>Rhodnius stali</i>	AY035437
<i>Rhodnius brethesi</i>	AF045710
<i>Rhodnius colombiensis</i>	AY035438
<i>Psammolestes tertius</i>	AY035439
<i>Psammolestes coreodes</i>	AF045708
<i>Triatoma maculata</i>	AY035465
<i>Triatoma pseudomaculata</i>	AY035461
<i>Triatoma dimidiata</i>	AF045695
<i>Triatoma circummaculata</i>	AF021188
<i>Triatoma arthurneivai</i>	AY035460
<i>Triatoma rubrofasciata</i>	AY035468
<i>Panstrongylus lutzi</i>	AY035449
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	AF394593
<i>Panstrongylus herreri</i>	AY185833
<i>Dipetalogaster maximus</i>	AF045699
<i>Eratyrus mucronatus</i>	AY185832
<i>Mepraia spinolai</i>	AF324518
<i>Linshcosteus sp.</i>	AF394595

Tabela 5. Número de acesso de seqüências do gene CitB do DNA mitocondrial de espécies de insetos da Família: Reduvidae, obtidas no GenBank, para comparação com as seqüências geradas nesse estudo.

Espécie	Número de acesso
<i>Arilus cristatus</i>	AF045729
<i>Rhodnius neglectus</i>	AF045716
<i>Rhodnius brethesi</i>	AF045714
<i>Psammolestes coreodes</i>	AF045719
<i>Triatoma dimidiata</i>	AF045726
<i>Panstrongylus megistus</i>	AF045722
<i>Dipetalogaster maximus</i>	AF045728

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados os genes 16S e citocromo B do DNA mitocondrial para discutir questões taxonômicas e sistemáticas de triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* mantidos em colônias no SESA, sendo incluídos também, exemplares de *T. baratai*, *T. matogrossensis* e *T. wygodzinskyi*, conforme citado no capítulo: Material e Métodos. Foram testados cerca de 222 espécimes; 213 correspondentes a 71 colônias (3 exemplares de cada colônia) e os 9 restantes das espécies do gênero *Triatoma* supra-citadas. No entanto, com o protocolo que foi utilizado não foram obtidos “amplicons” para a totalidade desses insetos.

Os resultados positivos para cada gene são apresentados separadamente nos itens a seguir:

5.1. Análise do gene 16S: (ARTIGO I, Ceretti et al. Anexo 1)

O gene 16S foi amplificado para 15 espécies dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* aos quais pertencem reconhecidos vetores da doença de Chagas na América Latina. Os produtos de PCR apresentaram fragmentos com tamanho aproximado de 450 pares de base (pb) quando visualizados em gel de agarose a 1,5% (**Anexo 3**). Resultados que estão dentro do esperado para esse gen (LYMAN et al., 1999). Esses produtos de PCR foram utilizados para sequenciamento direto desse gene conforme descrito em Material e Métodos (item 4.3).

De algumas espécies foi possível gerar seqüências de diferentes procedências, isto ocorreu com: *Triatoma infestans* (8); *Panstrongylus megistus* (4), *Triatoma*

pseudomaculata (3); *Rhodnius prolixus* (3) e *T. rubrovaria* (2), *R. robustus* (2) e *T. sordida* (2) ver **Tabela 6**.

O tamanho médio das seqüências geradas foi de 313 pb variando entre 311 pb, para *R. pictipes*, a 317 pb em *T. sordida* (CTA 20C e 26C) um tanto menores do que os obtidos por LYMAN et al., (1999) para o mesmo gene. Esses *amplicons* apresentaram 42% de timina (T), 32% de adenina (A), 20% de citosina (C) e 6% de guanina (G), portanto, com alta concentração de pares A-T que é compatível com o esperado para o DNA mitocondrial de insetos (DeSALLE et al., 1987; GALTIER e GOUY, 1995).

No entanto, observamos ter havido confronto entre os resultados desta tese e os apresentados por LYMAN et al., (1999) quanto às porcentagens de A e T os valores foram próximos, porém inversos, aos desses pesquisadore (43% A; 30% T). Quanto às porcentagens de C (18%) da pesquisa anterior foi 2% inferior ao desta tese enquanto que o conteúdo de G (9%), 3% superior deste trabalho. Este viés pode ser atribuído a alguma falha na amplificação ou no seqüenciamento dos fragmentos obtidos.

As seqüências foram alinhadas com seqüências do mesmo gene para outros triatomíneos e também de *Arilus cristatus* e *Oncerothachelus* sp (usados como grupos externos) disponíveis no GenBank (**Tabela 4**). O alinhamento das seqüências do fragmento gerado para o gene 16S de todas as espécies analisadas é mostrado na **Figura 1**. A **Tabela 7**, apresenta a matriz de distância construída a partir desse alinhamento e na **Figura 2** está representada a árvore de similaridade gerada com os dados da matriz de distância.

Tabela 6 Lista de espécies de triatomíneos, mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara - USP que efetivamente foram positivas pelo exame do gene 16S do DNA mitocondrial, segundo sexo, estágio, procedência e código da colônia (CTA). **A-ninfa, B-fêmea, C-macho.**

Gênero	Espécie	Sexo Estádio	Procedência	CTA – Colônia
<i>Rhodnius</i>	<i>R. neglectus</i>	B	Guáira – SP - Brasil	001
	<i>R. pictipes</i>	A	Jacundá – PA - Brasil	057
		B		
		C		
	<i>R. prolixus</i>	A	Colômbia	003
		B		
	<i>R. prolixus*</i>	C	Colômbia	004
	<i>R. robustus</i>	A	Madere de Dios - Perú	011
	C	Lima – Perú	012	
<i>Panstrongylus</i>	<i>P. megistus</i>	C	Almino Alfonso – RN - Brasil	008
	<i>P. megistus</i>	B	Araraquara – SP - Brasil	082
	<i>P. megistus</i>	A	São Felipe - BA- Brasil	137
	<i>P. megistus</i>	A	Sta. Maria do Cambuçá – PE- Brasil	139
	<i>P. megistus</i>	A	Boca da Mata - AL- Brasil	146
<i>Triatoma</i>	<i>T. brasiliensis</i>	B	São João do Piauí - PI- Brasil	076
		C		
	<i>T. infestans</i>	A	Mambaí – GO- Brasil	007
	<i>T. infestans</i>	A	Frutal – MG- Brasil	022
		C		
	<i>T. infestans</i>	C	Tucuman - Argentina	030
	<i>T. infestans</i>	C	Cochabamba - Bolívia	044
	<i>T. infestans</i>	B	Santa Cruz - Bolívia	072
	<i>T. infestans</i>	B	Tanhaçu - BA- Brasil	067
	<i>T. infestans</i>	B	Gloria de Dourados - MS- Brasil	073
		C		
	<i>T. maculata</i>	B	C. Galaú - Venezuela	120
		C		
	<i>T. pseudomaculata</i>	A	Pocinhos - PB- Brasil	018
	<i>T. pseudomaculata</i>	A	Ceará- Brasil	091
	<i>T. pseudomaculata</i>	A	Teofelândia - BA- Brasil	094
	<i>T. platensis</i>	A	La Pampa - Argentina	133
	<i>T. protracta</i>	A	Monte Del Diablo – California – EUA	045
		B		
	<i>T. rubrovaria</i>	A	Caçapava do Sul - RS- Brasil	108
	<i>T. rubrovaria</i>	A	Pelotas – RS- Brasil	117
		C		
	<i>T. sordida</i>	A	Guáira – SP- Brasil	020
	C			
<i>T. sordida</i>	C	Tanhaçu - BA- Brasil	026	
<i>T. sherlocki</i>		Santo Inácio – BA - Brasil	245	
<i>T. vitticeps</i>	A	Guarapari - ES- Brasil	006	
	C			

* Linhagem: olhos vermelhos

	*	20	*	40	*	60	*
<i>Oncerotrachelus sp</i>	T.-AT.A.A	AG	TTTT	----	G...A. : 64
<i>A.cristatus</i>	-T.....	T.-AT.-G.A	A	TT.T	----	G...A. : 67
<i>T.infestans</i> 73B	-	-	-	----	: 63
<i>T.platensis</i> 133A	-	-	-	----	: 63
<i>T.infestans</i> 73C	-	-	-	----	: 63
<i>T.infestans</i> 72B	-	-	-	----	: 63
<i>T.infestans</i> 67B	-	-	-	----	: 63
<i>T.infestans</i> 7A	-	-	-	----	: 63
<i>T.infestans</i> 22C	-	-	-	----	: 63
<i>T.infestans</i> 44C	-	-	-	----	: 63
<i>T.infestans</i> 30C	-	-	-	----	: 63
<i>T.pseudomaculata</i> 18A	A	T.A	----	C	: 63
<i>T.pseudomaculata</i> (GB)	A	T.A	----	C	: 63
<i>T.maculata</i> 20B	A	T.A	----	C	: 63
<i>T.maculata</i> 20C	A	T.A	----	C	: 63
<i>T.pseudomaculata</i> 94A	A	T.A	----	C	: 63
<i>T.pseudomaculata</i> 91A	A	T.A	----	C	: 63
<i>T.arthurneivai</i>	A	T.G	----	C	: 63
<i>T.rubrovaria</i> 108A	G	G	----	G	: 63
<i>T.rubrovaria</i> 117A	G	G	----	G	: 63
<i>T.rubrovaria</i> 117C	G	G	----	G	: 63
<i>T.circummaculata</i>	G	G	----	G	: 63
<i>T.sordida</i> 20C	A	AG	----	A	: 63
<i>T.sordida</i> 26C	A	AG	----	A	: 63
<i>T.brasiliensis</i> 76B	G	----	----	C	: 63
<i>T.sherlocki</i> 245	G	----	----	C	: 63
<i>T.brasiliensis</i> 76C	G	----	----	C	: 63
<i>T.maculata</i> (GB)	.T.....	A	T	----	----	: 63
<i>E.mucronatus</i>	G	T.A	----	----	: 63
<i>T.dimidiata</i>	----	----	----	C	: 63
<i>T.vitticeps</i> 6A	----	A	----	----	: 62
<i>T.vitticeps</i> 6C	----	A	----	----	: 62
<i>T.protracta</i> 45A	C	----	----	----	: 63
<i>T.protracta</i> 45B	C	----	----	A	: 63
<i>D.maximus</i>	-T...GT	----	----	----	----	C : 62
<i>M.spinolai</i>	-C	----	----	----	: 63
<i>P.megistus</i> 8C	T	----	----	----	: 62
<i>P.megistus</i> 139A	T	----	----	----	: 62
<i>P.megistus</i> 82B	T	----	----	----	: 62
<i>P.megistus</i> 146A	T	----	----	----	: 62
<i>P.megistus</i> 137A	T	----	----	----	: 62
<i>P.herrerri</i>	G	T	----	----	: 63
<i>P.lutzi</i>	G	AG	----	----	: 62
<i>P.geniculatus</i>	AGT	----	----	A	: 62
<i>T.rubrofasciata</i>	G	TT	----	CC	: 63
<i>Linshcosteus sp.</i>	A-G	AG	----	CC	: 64
<i>P.tertius</i>	AA	A	----	T.G	CC	: 62
<i>P.coreodes</i>	AAG	A	----	T.G	C	: 61
<i>R.prolixus</i> 3B	AG.A	A	G	TG	----	T.G : 65
<i>R.robustus</i> 11A	AG.A	A	G	TG	----	T.G : 65
<i>R.prolixus</i> 4D	AG.A	A	G	TG	----	T.G : 65
<i>R.prolixus</i> 29B	AG.A	A	G	TG	----	T.G : 65
<i>R.prolixus</i> 29C	AG.A	A	G	TG	----	T.G : 65
<i>R.prolixus</i> 3A	AG.A	A	G	TG	----	T.G : 65
<i>R.neglectus</i> 1B	AG.A	A	G	GG	----	T.G : 64
<i>R.domesticus</i>	A.A	A	G	C	----	T.G : 63
<i>R.stali</i>	T	AT	----	A	----	T.G : 62
<i>R.brethesi</i>	TT	A	----	A	----	T.G : 62
<i>R.pictipes</i> 57A	T	AA	----	A	----	T.G : 62
<i>R.pictipes</i> 57C	T	AA	----	A	----	T.G : 62
<i>R.pictipes</i> 57B	T	AA	----	A	----	T.G : 62
<i>R.colombiensis</i>	A.A	A	G	----	T.G	: 63

TCCTTTGTGTATATTTATTTAAGGCTGACCTGCCCAATGAGAAAATTATTGAATGGCCGCGATTTT

Figura 1. Alinhamento das seqüências do gene 16S obtidas de triatomíneos de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara- SP (SESA), comparadas com seqüências depositadas no GenBank

	80	*	100	*	120	*	140	
<i>Oncerotrachelus</i> sp								
<i>A.cristatus</i>			C	A	A	T	C	A
<i>T.infestans</i> 73B			C	A		T		A
<i>T.platensis</i> 133A								
<i>T.infestans</i> 73C								
<i>T.infestans</i> 72B								
<i>T.infestans</i> 67B								
<i>T.infestans</i> 7A								
<i>T.infestans</i> 22C								
<i>T.infestans</i> 44C								
<i>T.infestans</i> 30C								
<i>T.pseudomaculata</i> 18A								
<i>T.pseudomaculata</i> (GB)								
<i>T.maculata</i> 20B								
<i>T.maculata</i> 20C								
<i>T.pseudomaculata</i> 94A								
<i>T.pseudomaculata</i> 91A								
<i>T.arthurneivai</i>				A				
<i>T.rubrovaria</i> 108A								
<i>T.rubrovaria</i> 117A								
<i>T.rubrovaria</i> 117C								
<i>T.circummaculata</i>								
<i>T.sordida</i> 20C								
<i>T.sordida</i> 26C			G					
<i>T.brasiliensis</i> 76B			G					
<i>T.sherlocki</i> 245								
<i>T.brasiliensis</i> 76C								
<i>T.maculata</i> (GB)								
<i>E.mucronatus</i>					A			
<i>T.dimidiata</i>								
<i>T.vitticeps</i> 6A						A		
<i>T.vitticeps</i> 6C								
<i>T.protracta</i> 45A								
<i>T.protracta</i> 45B								
<i>D.maximus</i>								
<i>M.spinolai</i>								
<i>P.megistus</i> 8C								
<i>P.megistus</i> 139A								
<i>P.megistus</i> 82B								
<i>P.megistus</i> 146A								
<i>P.megistus</i> 137A								
<i>P.herrerri</i>								
<i>P.lutzi</i>								
<i>P.geniculatus</i>								
<i>T.rubrofasciata</i>								
<i>Linshcosteus</i> sp.								
<i>P.tertius</i>								
<i>P.coreodes</i>								
<i>R.prolixus</i> 3B								
<i>R.robustus</i> 11A								
<i>R.prolixus</i> 4D								
<i>R.prolixus</i> 29B								
<i>R.prolixus</i> 29C								
<i>R.prolixus</i> 3A								
<i>R.neglectus</i> 1B								
<i>R.domesticus</i>								
<i>R.stali</i>								
<i>R.brethesi</i>								
<i>R.pictipes</i> 57A								
<i>R.pictipes</i> 57C								
<i>R.pictipes</i> 57B								
<i>R.colombiensis</i>								
TAACTGTGCTAAGGTAGCATAATCAATTTGTCTTTTAATTGAGGGCTGGAATGAAGGGTTGGACGAGGTAC								

Figura 1. continuação

	*	160	*	180	*	200	*							
<i>Oncerotrachelus sp</i>	.AC	T.A	TTTA	..G.G	GA	: 201					
<i>A.cristatus</i>	CATG	..T	-C	TTTA	..T	GA	: 203				
<i>T.infestans</i> 73BGGA	: 200				
<i>T.platensis</i> 133AGGA	: 200				
<i>T.infestans</i> 73CGGA	: 200				
<i>T.infestans</i> 72BGGA	: 200				
<i>T.infestans</i> 67BGGA	: 200				
<i>T.infestans</i> 7AGGA	: 200				
<i>T.infestans</i> 22CGGA	: 200				
<i>T.infestans</i> 44CGGA	: 200				
<i>T.infestans</i> 30CGGA	: 200				
<i>T.pseudomaculata</i> 18AGG	: 199				
<i>T.pseudomaculata</i> (GB)GG	: 199				
<i>T.maculata</i> 20BGG	: 199				
<i>T.maculata</i> 20CGG	: 199				
<i>T.pseudomaculata</i> 94AGG	: 199				
<i>T.pseudomaculata</i> 91AGG	: 199				
<i>T.arthurneivai</i>GG	: 199				
<i>T.rubrovaria</i> 108AGG	A	: 200				
<i>T.rubrovaria</i> 117AGG	A	: 200				
<i>T.rubrovaria</i> 117CGG	A	: 200				
<i>T.circummaculata</i>GG	A	A	: 200				
<i>T.sordida</i> 20C	..GGT	..C	GAT	: 200				
<i>T.sordida</i> 26C	..GGT	..C	GA	: 202				
<i>T.brasiliensis</i> 76B	..GTA	: 200				
<i>T.sherlocki</i> 245	..GTA	: 200				
<i>T.brasiliensis</i> 76C	..GTA	: 200				
<i>T.maculata</i> (GB)	..GGG	AC	: 200				
<i>E.mucronatus</i>	..G-A	A	ATT	: 199				
<i>T.dimidiata</i>TAG	T	: 200			
<i>T.vitticeps</i> 6A	..TGGTAGT	: 199				
<i>T.vitticeps</i> 6C	..TGGTAGT	: 199				
<i>T.protracta</i> 45AGATA	T	CAG	T	: 200			
<i>T.protracta</i> 45BGATA	T	GCTAACG	T	: 200			
<i>D.maximus</i>GTAT	C	ACA	: 199			
<i>M.spinolai</i>	..TG	A	T	CT	: 200				
<i>P.megistus</i> 8CGGTCAC	A	TCG	T	: 200		
<i>P.megistus</i> 139AGGTCAC	A	TCG	T	: 199		
<i>P.megistus</i> 82BGGTCAC	A	TCG	T	: 199		
<i>P.megistus</i> 146AGGTCAC	A	TCG	T	: 199		
<i>P.megistus</i> 137AGGTCAC	A	TCG	T	: 199		
<i>P.herrerii</i>GGT	AG	T	: 199		
<i>P.lutzi</i>GAGGC-ATAGG	TA	: 198		
<i>P.geniculatus</i>GG	ATACG	T	: 199		
<i>T.rubrofasciata</i>GTACATG	T	: 200		
<i>Linshcosteus sp.</i>GTTG	T	: 200		
<i>P.tertius</i>	AT	AG	A	G	TA	: 198			
<i>P.coreodes</i>	A	GT	AG	A	G	TA	: 197		
<i>R.prolixus</i> 3B	AT	AG	A	G	TA	: 201			
<i>R.robustus</i> 11A	AT	AG	A	G	TA	: 201			
<i>R.prolixus</i> 4D	AT	AG	A	G	TA	: 201			
<i>R.prolixus</i> 29B	AT	AG	A	G	TA	: 201			
<i>R.prolixus</i> 29C	AT	AG	A	G	TA	: 201			
<i>R.prolixus</i> 3A	AT	AG	A	G	TA	: 201			
<i>R.neglectus</i> 1B	AT	AG	A	G	TA	: 200			
<i>R.domesticus</i>	ACTCA	G	G	TG	A	: 199
<i>R.stali</i>	AT	T	C	A	A	TT	: 198		
<i>R.brethesi</i>	AT	T	C	G	A	TT	: 198		
<i>R.pictipes</i> 57A	ATAT	C	A	A	TT	: 198		
<i>R.pictipes</i> 57C	ATAT	C	A	A	TT	: 198		
<i>R.pictipes</i> 57B	ATAT	C	A	A	TT	: 198		
<i>R.colombiensis</i>	ATT	T	AT	: 199			

TTAACTTTCTTTAATTTAATTTTRGAGAATTTAATTTTGGAGTTAACAAAGCTTAAAATTTATTTATGGGA

Figura 1. continuação

	220	*	240	*	260	*	280	
<i>Oncerotrachelus</i> sp			A...TGTA	...	A...T...T.T--A.T	...	C..T	: 265
<i>A.cristatus</i>			T.T.-A.T	...	A...T...T.T.A.TT	: 268
<i>T.infestans</i> 73B					G.TG	: 263
<i>T.platensis</i> 133A					G.TG	: 263
<i>T.infestans</i> 73C					G.TG	: 263
<i>T.infestans</i> 72B					G.TG	: 263
<i>T.infestans</i> 67B					G.TG	: 263
<i>T.infestans</i> 7A					G.TG	: 263
<i>T.infestans</i> 22C					G.TG	: 263
<i>T.infestans</i> 44C					G.TG	: 263
<i>T.infestans</i> 30C					G.TG	: 263
<i>T.pseudomaculata</i> 18A			G--	...	G	...	-A	: 262
<i>T.pseudomaculata</i> (GB)			G--	...	G	...	-A	: 262
<i>T.maculata</i> 20B			G--	...	G	...	-A	: 262
<i>T.maculata</i> 20C			G--	...	G	...	-A	: 262
<i>T.pseudomaculata</i> 94A			G--	...	G	...	-A	: 262
<i>T.pseudomaculata</i> 91A			G--	...	G	...	-A	: 262
<i>T.arthurneivai</i>			-A	...	GC	...	-A.G	: 262
<i>T.rubrovaria</i> 108A			-A	...	A	...	G	: 263
<i>T.rubrovaria</i> 117A			-A	...	A	...	G	: 263
<i>T.rubrovaria</i> 117C			-A	...	A	...	G	: 263
<i>T.circummaculata</i>			-A	...	A	...	G	: 263
<i>T.sordida</i> 20C			CGT.C	...	A	...	-A	: 266
<i>T.sordida</i> 26C			-GT.C	...	A	...	-A	: 266
<i>T.brasiliensis</i> 76B				...	GGC	: 263
<i>T.sherlocki</i> 245				...	GGC	: 263
<i>T.brasiliensis</i> 76C				...	GG	...	C	: 263
<i>T.maculata</i> (GB)			-A	...	A	...	GG	: 263
<i>E.mucronatus</i>			-A	...	A	...	C	: 263
<i>T.dimidiata</i>			-A	...	A	...	C	: 263
<i>T.vitticeps</i> 6A			-A	...	A	...	GG	: 262
<i>T.vitticeps</i> 6C			-AC	...	A	...	GG	: 263
<i>T.protracta</i> 45A			-A	...	A	...	C	: 264
<i>T.protracta</i> 45B			-A	...	A	...	C	: 264
<i>D.maximus</i>			-A	...	A	...	GG	: 262
<i>M.spinolai</i>			G	...	A	...	C	: 263
<i>P.megistus</i> 8C			-A	...	A	...	GG	: 263
<i>P.megistus</i> 139A			-A	...	A	...	GG	: 262
<i>P.megistus</i> 82B			-A	...	A	...	GG	: 262
<i>P.megistus</i> 146A			-A	...	A	...	GG	: 262
<i>P.megistus</i> 137A			-A	...	A	...	GG	: 262
<i>P.herrerri</i>			-A	...	A	...	GG	: 262
<i>P.lutzi</i>			-A	...	A	...	GG	: 261
<i>P.geniculatus</i>			-A	...	A	...	GG	: 264
<i>T.rubrofasciata</i>			-A	...	A	...	GG	: 263
<i>Linshcosteus</i> sp.			-A	...	A	...	GG	: 263
<i>P.tertius</i>			-G	...	A	...	GG	: 263
<i>P.coreodes</i>			-C	...	A	...	GG	: 261
<i>R.prolixus</i> 3B			-C	...	A	...	GG	: 265
<i>R.robustus</i> 11A			-C	...	A	...	GG	: 265
<i>R.prolixus</i> 4D			-C	...	A	...	GG	: 265
<i>R.prolixus</i> 29B			-C	...	A	...	GG	: 265
<i>R.prolixus</i> 29C			-C	...	A	...	GG	: 265
<i>R.prolixus</i> 3A			-C	...	A	...	GG	: 265
<i>R.neglectus</i> 1B			-C	...	A	...	GG	: 264
<i>R.domesticus</i>			-C	...	A	...	GG	: 264
<i>R.stali</i>			-C	...	A	...	GG	: 262
<i>R.brethesi</i>			-C	...	A	...	GG	: 263
<i>R.pictipes</i> 57A			-C	...	A	...	GG	: 262
<i>R.pictipes</i> 57C			-C	...	A	...	GG	: 262
<i>R.pictipes</i> 57B			-C	...	A	...	GG	: 261
<i>R.colombiensis</i>			-C	...	A	...	GG	: 263

CGAGAGAGACCCTATAGATCTTTCATAGTGTATTATTATTTAATAATTTAGGGATTTTATATTATTTT

Figura 1. continuação

	*	300	*	320	*	
<i>Oncerotrachelus sp</i>	.A	.AT	.T	.T	.TAG.....C...A.....AAT..... : 316
<i>A.cristatus</i>	.A	.A	.TAA	.TG.....T..... : 319	
<i>T.infestans</i> 73BC..... : 313	
<i>T.platensis</i> 133AC..... : 313	
<i>T.infestans</i> 73CC..... : 313	
<i>T.infestans</i> 72BC..... : 313	
<i>T.infestans</i> 67BC..... : 313	
<i>T.infestans</i> 7AC..... : 313	
<i>T.infestans</i> 22CC..... : 313	
<i>T.infestans</i> 44CC..... : 313	
<i>T.infestans</i> 30CC..... : 313	
<i>T.pseudomaculata</i> 18AC..... : 312	
<i>T.pseudomaculata</i> (GB)C..... : 312	
<i>T.maculata</i> 20BC..... : 312	
<i>T.maculata</i> 20CC..... : 312	
<i>T.pseudomaculata</i> 94AC..... : 312	
<i>T.pseudomaculata</i> 91AC..... : 312	
<i>T.arthurneivai</i>C..... : 312	
<i>T.rubrovaria</i> 108AA...C.....G..... : 313	
<i>T.rubrovaria</i> 117AA...C.....G..... : 313	
<i>T.rubrovaria</i> 117CA...C.....G..... : 313	
<i>T.circummaculata</i>A...C.....G..... : 313	
<i>T.sordida</i> 20C	GC.....G.G..... : 317	
<i>T.sordida</i> 26C	GC.....G.G..... : 317	
<i>T.brasiliensis</i> 76BT..C.....G..... : 313	
<i>T.sherlocki</i> 245G.T..C.....G..... : 313	
<i>T.brasiliensis</i> 76CT..C.....G..... : 313	
<i>T.maculata</i> (GB)	.AT.....A..... : 313	
<i>E.mucronatus</i>	.T	..GAA..... : 313	
<i>T.dimidiata</i>A.....T.T..... : 314	
<i>T.vitticeps</i> 6AG.....G..... : 312	
<i>T.vitticeps</i> 6CG.....G..... : 313	
<i>T.protracta</i> 45AT.....T.....C : 314	
<i>T.protracta</i> 45BT.....TT.....C : 314	
<i>D.maximus</i>A.....CA..... : 312	
<i>M.spinolai</i>T..AT.....GA.....T..... : 313	
<i>P.megistus</i> 8CC..GT.....A..... : 313	
<i>P.megistus</i> 139AC..GT.....A.....A..... : 312	
<i>P.megistus</i> 82BC..GT.....A.....A..... : 312	
<i>P.megistus</i> 146AC..GT.....A.....A..... : 312	
<i>P.megistus</i> 137AC..GT.....A.....A..... : 312	
<i>P.herrerii</i>G.CA.....G.....G...C..... : 312	
<i>P.lutzi</i>T..GAT.....AT..... : 311	
<i>P.geniculatus</i>T..G.....T.....G..G..... : 314	
<i>T.rubrofasciata</i>G..AA.....T.TG..... : 313	
<i>Linshcosteus sp.</i>	.A	..G..AAG...A.T.T..... : 313	
<i>P.tertius</i>	.T	...TAA-T..G..GAT...TTT.....C : 313	
<i>P.coreodes</i>	.T	...TA-...G..GT...G...TTT..... : 311	
<i>R.prolixus</i> 3B	.T	.C..TGATT..G..GAT...G...CTTT.....C : 316	
<i>R.robustus</i> 11A	.T	.C..TGATT..G..GAT...G...CTTT.....C : 316	
<i>R.prolixus</i> 4D	.T	.C..TGATT..G..GAT...G...CTTT.....C : 316	
<i>R.prolixus</i> 29B	.T	.C..TGATT..G..GAT...G...CTTT.....C : 316	
<i>R.prolixus</i> 29C	.T	.C..TGATT..G..GAT...G...CTTT.....C : 316	
<i>R.prolixus</i> 3A	.T	.C..TGATT..G..GAT...G...CTTT.....C : 316	
<i>R.neglectus</i> 1B	.T	.C..TGACT..G..GAT...G...CTTT.....C : 315	
<i>R.domesticus</i>	.T	...TAA-T..G..GAC..T.A.G...CTTT.....C : 314	
<i>R.stali</i>	.T	...-AATC..G..GAT...T.TA..... : 312	
<i>R.brethesi</i>	.T	...-AATC..G..GAT...T.TG..... : 313	
<i>R.pictipes</i> 57A	.A	...-TTC..G..GT...T.TG..... : 312	
<i>R.pictipes</i> 57C	.A	...-TTC..G..GT...T.TG..... : 312	
<i>R.pictipes</i> 57B	.A	...-TTC..G..GT...T.TG..... : 311	
<i>R.colombiensis</i>	.T	...TG.....GAT...T..... : 314	

AGTTARATGAATTATTTTGTGGGGTGACTGTAGAATTTAAATAACTTCTA

Figura 1. continuação

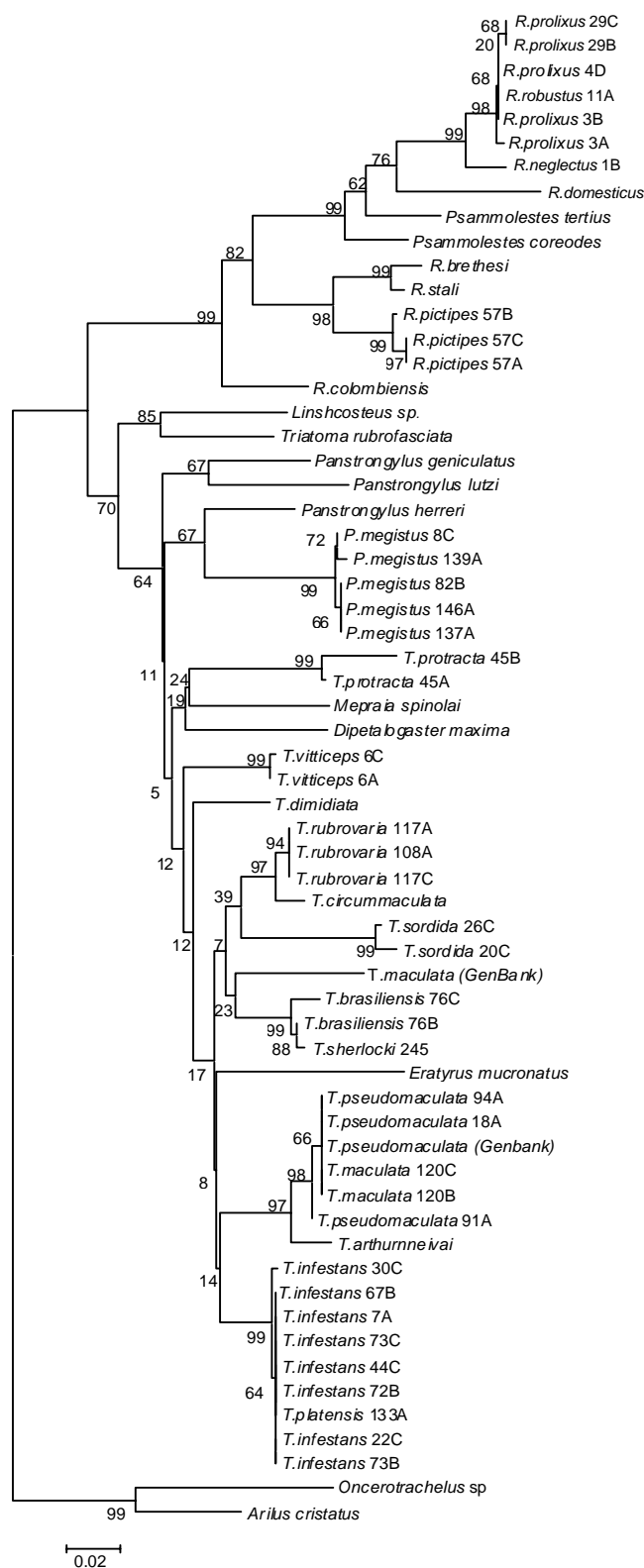


Figura 2. Árvore de distância (NJ) obtida com base no gene 16 S para triatomíneos mantidos em colônias no Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SP (SESA) e disponíveis no GenBank. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de “bootstraps” para 1000 replicações.

A árvore de distância (**Fig. 2**) demonstra a clara parafilia das tribos Rhodniini e Triatominini, corroborando com dados apresentado por MONTEIRO et al. (2000), (HYPŠA et al. (2002) e PAULA et al. (2005).

Pelo método das distâncias (NJ), obteve-se em Rhodniini dois clados distintos, confirmando a parafilia encontrada em pesquisas anteriores (LYMAN et la., 1999; HYPŠA et al., 2002; PAULA et al., 2005) (**Fig. 2**).

A menor similaridade genética pertenceu a *R. pictipes* em relação *R. neglectus* com 11,7% de divergência (**Tab. 7**).

Um clado ficou composto pelo relacionamento (domesticus (neglectus1B (prolixus3A (prolixus3B-prolixus4D-robustus11A (prolixus 29B,C)))) (**Fig. 2**). A distância entre *R. prolixus-robustus* foi de 0%. *R. prolixus* 29B e C (Faculdade de Medicina) foram os mais divergentes do grupo, variando de 0,3% a 0,6% e posicionando-se em ramo separado (**Tab 7; Fig 2**). Tal topografia corrobora a hipótese de *R. prolixus* e *R. robustus* tratarem-se de linhagens distintas de espécie única adaptadas a ecótopos diferentes (HARRY et al., 1992; HARRY, 1993, 1994; SOLANO et al. 1996). Por outro lado, pode indicar possível erro de identificação das colônias de *R. robustus* (CTA-004), ou *R. prolixus* (CTA-011), ou *R. prolixus* (CTA-029) e tal sugestão só será confirmada pela inclusão de material devidamente identificado em análises futuras, uma vez que, MONTEIRO et al. (2000, 2002, 2003) confirmaram a validade dos dois táxons.

Em estudos recentes mostrou-se ainda, que o ramo acima está mais próximo relacionado a *Psammolestes tertius* e *P. coreodes* do que ao relacionamento constituído por (*R. pictipes (stali-brethesi)*) (HYPŠA et al., 2002; PAULA et al.,2005). Nossos resultados são coincidentes com estes.

Ainda sobre *R. robustus* como já exposto, há evidências de tratar-se de um subcomplexo específico composto por pelo menos quatro linhagens distintas (MONTEIRO et al., 2003). Tal evidência foi confirmada no trabalho recente de PAVAN e MONTEIRO (2007) com o emprego de Multiplex PCR. Em que esses autores conseguiram diagnosticar com exatidão essas quatro linhagens de *R. robustus* distinguindo-as perfeitamente de *R. prolixus*.

R. colombiensis (GenBank), situou-se em ramo mais basal em relação aos outros Rhodiniini (**Figura 2**) e, em filogenias anteriormente publicadas, esta espécie aparece relacionada a *R. pallescens-ecuadoriensis* (MONTEIRO et al. 2000; HYPŠA et al. 2002; PAULA et al. 2005). Essa espécie foi descrita com base na anatomia comparada das genitálias externas masculinas de suposta população silvestre de *R. prolixus* da região de Tolima, Colômbia (MORENO et al., 1999).

Quanto ao ramo formado por *R. pictipes* (CTA-057) que formou cluster com *R. stali* e *R. brethesi*, ambos do GenBank (**Fig. 2**), são semelhantes aos obtidos por HYPŠA et al. (2002) e PAULA et al. (2005).

Em Triatomini, ficou demonstrada a parafilia de *Panstrongylus* formando clados distintos *P. geniculatus-lutzi* basal ao ramo *P. herreri-megistus* e este, mais próximo a *Dipetalogaster maxima* e aos “*Triatomas*” Norte-americanos do que aos da América do Sul. *D. maxima* aparece basal em relação ao ramo *P. herreri-megistus* (**Fig. 2**) confirmando derivação distinta para esse gênero observada também por MARCILLA et al. (2002) com o uso de ITS-2 como marcador.

A similaridade genética dentro do gênero *Panstrongylus* ficou ao redor de 90%, sendo a maior distância obtida entre *P. geniculatus* (GenBank) e *P. megistus* (CTA-139) com 9,4%. As distâncias entre as populações de *P. megistus* variaram entre 0,3% e 0,6%

que é atribuída para populações geográficas, podem ser observados na **Tabela 7** (DUJARDIN et al., 2002).

Em *Triatoma* a maior distância genética foi encontrada entre *T. protracta* e *T. sordida* (12,3%) (**Tabela 7**) sugerindo que *T. sordida*, que se posicionou em clado apical (**Figura 2**), tenha sofrido diversificação mais recente que *T. protracta* reforçando a hipótese de as populações da América do Sul e Central tenham ancestrais neárticos (PATTERSON et al. 2001, GAUNT e MILES, 2002; SCHAEFER 2003).

O ramo formado por *T. pseudomaculata-maculata* apresentou divergência nula e corrobora os resultados obtidos por SAINZ et al. (2004) que obtiveram diferença que variou de 0,2-0,8%. Mas, que sustentam nossos resultados para *T.pseudomaculata* 91 (Ceará) que se mostrou 0,3% divergente dos demais e formou ramo consistente com *T. arthurneivai* (GenBank) que no entanto, não foi testado pelos autores op.cit (**Fig. 2**).

Porém, quando incluímos em nossa análise seqüências de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* obtidas do GenBank verificamos que *T. maculata* (120B;C) do SESA mantiveram-se associados aos *T. pseudomaculata* (091A, 094A e 018A) do SESA e aquele disponível no GenBank, enquanto, o *T. maculata* do GenBanK relacionou-se ao *T. brasiliensis* 76B;C e *T. sherlocki* 245 do SESA (**Fig. 2**) e divergiu 6,3% do *T. maculata* (120B,C) (**Tab. 7**). Esse resultado coincide com HYPSEA et al. (2002).

Trabalhos recentes, todavia, demonstraram haver erro de identificação dos *T. maculata* utilizados por SAINZ et al. (2004). O fato é que esses autores utilizaram indivíduos procedentes do Estado de Sergipe, área reconhecida como de ocorrência de *T. pseudomaculata* (SANTOS et al. 2007; CARBAJAL DE AL FUENTE et al. 2008; no prelo). E ainda, o *T. macualta* (GenBank) apareceu próximo ao ramo formado por *T. sordida* (20C) e *T. sordida* (26C) (**Fig. 2**), confirmando que um *T. maculata* verdadeiro, no

caso o utilizado por HYPŠA et al. (2002) e PAULA et al. (2005) segundo comentário pessoal da Dra. Ana Laura Carbajal de la Fuente, não é relacionado com os *T. pseudomaculata* presentes neta Tese.

Desta forma, atribuímos a coincidência de nossos resultados aos obtidos por SAINZ et al. (2004) por motivo semelhante, isto é: troca de rótulos ou erro de identificação devido à similaridades morfológica. Tais erros segundo CARBAJAL DE LA FUENTE (2007) podem ser atribuídos ao grande peso dos caracteres cromáticos nas chaves dicotômicas de LENT e WIGODZINSKY (1979) e de CARCAVALLO et al. (1997) que são inconsistentes com a grande variedade fenotípica que esses caracteres apresentam na maioria das espécies.

Um outro motivo também, seria a ocorrência de híbridos produzidos pelo cruzamentos entre indivíduos de colônias de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* (BELISÁRIO et al., 2007), principalmente porquê *T. pseudomaculata*, foi erroneamente identificada por mais de um século, antes de ser descrita por CORRÊA e ESPÍNOLA (1964), a partir de insetos procedentes do Estado do Ceará, Brasil e continuaram sendo confundidas, principalmente pelas secretarias de Saúde, mesmo após os trabalhos de LENT e JURBERG (1978), LENT E WIGODIZINSKY (1979) e de GONÇALVES et al. (1985) que confirmam as diferenças encontradas, na genitália externa, nos ovos e entre as ninfas das duas espécies.

T. maculata é um triatomíneo que ocorre na Venezuela, Colômbia, no estado de Roraima-Brasil, Suriname, Guiana, Guiana Francesa e também nas Ilhas de Aruba, Bonaire e Curaçao no Caribe (Carcavallo et al., 1999) e *T. pseudomaculata* é encontrado em todo o Nordeste do Brasil. Ambas são de difícil separação, por partilharem caracteres morfológicos e cromáticos, principalmente, entre os adultos. E são encontradas nos ambientes domésticos e peridomésticos em geral, associadas a aves (SCHFIELD, 1988;

SANTOS et al., 2007; CARBAJAL DE LAFUENTE, 2007; CARBAJAL DE LA FUENTE et al., 2008; no prelo).

Segundo, SCHOFIELD (1988) a provável origem dessas espécies é o resultado da evolução de um ancestral comum que por, dispersão passiva e dependente de aves, originou duas populações alopátricas.

Por esses motivos, essas espécies foram incluídas no grupo maculata (CARCAVALLO et al., 2000; DUJARDIN et al., 2000) que para CARCAVALLO et al. (1997) seriam proximamente relacionadas a duas outras espécies, *Triatoma arthurneivai* Lent e Martins, 1940 e *Triatoma wygodzinskyi* Quaresma, 1951 (SANTOS et al., 2007).

No entanto, em análises isoenzimática, citogenéticas e morfométricas da cabeça, do tórax e do abdome (SANTOS et al., 2007) ficou demonstrado que é possível distinção completa de *T. maculata*, *T. pseudomaculata* e *T. arthurneivai*.

Citogeneticamente separou-se duas populações geográficas de *T. arthurneivai*: uma que ocorre em São Paulo e outra, procedente de Minas Gerais. A população ocorrente em São Paulo agrupou-se com *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*, enquanto a população procedente de Minas Gerais permaneceu isolada.

As seqüências de rDNA mostrou que *T. arthurneivai* de São Paulo forma agrupamento monofilético com *T. pseudomaculata* mas, não com *T. arthurneivai* de Minas Gerais. Esse resultado levantou ainda a suspeita sobre a pertinência das populações paulistas de *arthurneivai* ao qual chamamaram apenas de *Triatoma* sp. e definitivamente, descartou a hipótese de SCHOFIELD (1988) a respeito de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* formarem grupo monofilético.

Os estudos morfométricos apontaram para a possibilidade de *T. wygodzinskyi* e a referida *Triatoma sp.* Poderem ser a mesma espécie. E as análises isoenzimáticas demonstraram que ambas pertencem à uma mesma linhagem evolutiva.

CARBAJAL DE LA FUENTE (2007) com base em dados moleculares e morfométricos comprovou os resultados dos trabalhos acima e também, demonstrou que as referências antigas, para o Estado de São Paulo, quanto a *T. arthurneivai* estavam erradas pois, tratavam realmente de *T. wygodzinskyi*. Desta forma, estabeleceu que *T. arthurneivai* deva ser endêmica da Serra do Cipó ou da Cordilheira do Espinhaço enquanto, *T. wygodzinskyi*, ocorre ao Sul do Estado de Minas Gerais e Norte do Estado de São Paulo.

Em estudo recente, por meio da análise morfométrica do fenótipo antenal conseguiu-se separar nitidamente *T. maculata*, que ficou distante, de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*. *T. pseudomaculata* foi segregada em dois ramos: um ramo composto por exemplares provindos dos Estados de Bahia e Minas Gerais e o outro ramo, por exemplares do Ceará, proximamente relacionados a *T. wygodzinskyi*, formando um grupo irmão (CARBAJAL DE LA FUENTE et al., 2008; no prelo).

As espécies de *T. infestans* procedentes de Cochabamba (044C) e Santa Cruz - Bolívia (072B) formaram ramo com as procedentes de Glória de Dourados (073B) e Mambaí –GO, Brasil (007A), Frutal - MG, Brasil (022A) e Tanhaçu – BA, Brasil (067B) com inclusão de *T. platensis* e divergência de 0% entre essas. No entanto, *T. infestans* procedente de Tucumán - Argentina (030C) divergiu 0,3% das demais, formando ramo basal a este clado (**Tab. 7; Fig. 2**).

A similaridade genética entre *T. infestans* e *T. platensis* já foi demonstrada anteriormente tanto, por apresentarem híbridos naturais viáveis (PEREZ et al. 2005) quanto por dados moleculares: GARCIA et al. (2001) pelo uso de COI, 12S e 16S e também, por

BARGUES *et al.* (2006) usando o primeiro espaçador interno transcrito (ITS-1). Esses resultados indicam que estas espécies estão mais relacionadas entre si do que com *T. delpontei*, apesar de os resultados obtidos por HYPŠA *et al.* (2002), com análise de Máxima Parsimônia por meio de seqüências dos genes 16S e 12S rDNAs, não mostrarem tal distinção.

Essas três espécies juntamente a *T. melanosoma*, *T. rubrovaria*, *T. carcavallo* Jurberg, Rocha e Lent, 1998 e *T. infestans* Darck Morphs, pertencem ao complexo *T. infestans* CARCAVALLO *et al.* (2000). No entanto, MONTEIRO *et al.* (1999) com base na análise de fragmentos de citocromo b (CitB), evidenciou que tanto *T. melanosoma* quanto *T. infestans* Darck Morphs Andinos referem-se a variações fenotípicas de *T. infestans* l.s.

Neste trabalho, *T. circummaculata* (GenBank)-*T. rubrovaria* (117A,C; 108A) formaram clado independente mais derivado de *T. infestans-platensis* o que pode evidenciar separação mais recente (**Fig. 2**). Tal topografia tem amparo nos resultados de (GARCIA *et al.* 2001). A distância de 0% (**Tab. 7**) observada para *T. rubrovaria*(108)-*rubrovaria*(117) mostra não haver variação genética entre as populações geográficas de Caçapava do Sul e Pelotas, pelo menos quanto ao gene testado.

Resultados inesperados com distância acima de 1% foram obtidos para os ramos de *T.sordida*(020C)-*sordida*(026C) (1%) que podem ser atribuídas a populações geográficas mas. que estão dentro do esperado para a admissão de espécie única (DUJARDIN *et al.*, 2002) e ainda, para *T. brasiliensis*(076B)-*brasiliensis*(076C) (1,3%) que precisa ser revista. Neste segundo ramo houve também, a inclusão de *T. sherlocki* (245) com distância de 0,2% deste para com *T. brasiliensis-brasiliensis* (**Tab. 7; Fig. 2**).

Quanto a *T. brasiliensis*, considerado o principal vetor do *Trypanossoma cruzi* para os estados do nordeste brasileiro é uma espécie que possui, ao longo de sua distribuição, quatro variantes cromáticas nos padrões do pronoto, nas pernas e nas asas: *T. brasiliensis brasiliensis* Neiva 1911, encontrado na região de Caiacó, Rio Grande do Norte; *T. brasileinsis melanica* Neiva & Lent 1941, da região de Espinosa, Minas Gerais; *T. brasiliensis macromelanosoma* Galvão, 1956, prodedente de Petrolina, Pernambuco e *T. brasiliensis juazeirensis*, de Juazeiro, Bahia (COSTA *et al.* 1998). Recentemente foi demonstrado que os fenótipos conhecidos como juazeiro e melanica mereciam provável *status* de espécies, pois pareciam representar linhagens evolucionárias distintas (MONTEIRO *et al.* 2004; ABAD-FRANCH & MONTEIRO 2005), o que, de fato, ocorreu: em 2006 quando *T. brasiliensis melanica* recebeu o *status* de espécie passando a se chamar *Triatoma melanica* Neiva & Lent 1941 *stat nov.* (COSTA *et al.* 2006) e em 2007, aqueles coletados em Juazeiro receberam o mesmo *status* com o nome de: *T. juazeirensis* Costa & Felix 2007 n.sp. (COSTA & FELIX 2007).

T. sherlocki foi descrita a partir de espécimes coletados no Município de Gentio do Ouro, distrito de Santo Inácio, Bahia, Brasil por ocasião de um inquérito sorológico sobre doença de Chagas nessa região no ano de 1976 (CERQUEIRA 1982) no qual alguns de seus exemplares estavam naturalmente infectados com *T. cruzi*.

Segundo o autor, o local onde esse triatomíneo foi coletado era rochoso, desprovido de vegetação e habitado por lacertídeos e roedores silvestres (CERQUIERA 1982, PAPA *et al.*, 2002).

A região de ocorrência dessa espécie é simpátrica a de *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 a quem PAPA *et al.* (2002) atribuem afinidade morfológica, com variações cromáticas do corpo, pelas asas curtas e diferenças do pronoto, escutelo e cabeça. No

entanto, CERQUEIRA (1982) em estudo envolvendo cruzamentos interespecíficos de *T. sherlocki* com *T. infestans*, *T. lenti* e *T. brasiliensis*, obteve híbridos viáveis apenas com relação à última. Tal resultado fez esse autor considerar *T. sherlocki* como uma subespécie de *T. brasiliensis* denominando-a *T. brasiliensis santinacensis*. Nossos resultados, portanto, comprovam o relacionamento próximo dessas duas espécies. Mas, a ausência de *T. lenti* em nossas análises impede uma conclusão satisfatória com relação a *T. sherlocki* relacionar-se mais a *T. brasiliensis* ou a *T. lenti*.

Triatoma sordida é considerado vetor secundário do mal de Chagas principalmente devido ao seu comportamento peridomiciliar, colonizando, em especial, galinheiros. No entanto, após a eliminação das populações domésticas de *R. prolixus* e *T. infestans* aumentaram os relatos de sua ocorrência intradomiciliar (SCHOFIELD, 1994). É a espécie nominotípica do complexo específico que inclui ainda: *T. guasayana* Wygodzinsky e Abalos, 1949, *T. patagonica* Del Ponte 1929 e *T. garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínéz, Prosen e Ronderos, 1967 que foi considerada como sinônimo de *T. sordida* por quase duas décadas (CARCAVALLO et al., 2000).

A posição basal no clado correspondente aos Triatomas sul-americanos e próxima aos Triatomíneos neárticos de *T. vitticeps* (Stal 1859) (6A,C), mostrada na **Figura 2**, necessita ser melhor avaliada em análises futuras porém, concorda com os resultados de GARCIA e POWELL (1998). Esse triatomíneo ocorrente nos estados de Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, é frequentemente coletado pelos moradores de áreas rurais do Espírito Santo e incriminado com a transmissão do *T. cruzi* no Estado do Rio de Janeiro. Essa espécie apresentou elevada taxa de infecção natural por tripanosomatídeos semelhantes ao *T. cruzi* e índices elevados de domiciliação para o Estado do Espírito Santo (SANTOS et al. 2006).

T. protracta (45 A, B) apareceu em um “cluster” com *Mepraia spnolai* relacionado a *D. máxima* (**Fig. 2**). Esse clado separou nitidamente os ramos (*Linshcosteus-T. rubrofasciata*) e o ramo que incluiu os representantes do Gênero *Panstrongylus* daqueles onde se inserem os demais Triatomini (**Fig. 2**). Essa topologia já havia sido observada por HYPŠA et al. (2002).

As árvores de Máxima Parsimonia (MP) e Versossimilhança (ML) (**Figs. 3; 4**) apresentaram “clusters” muito semelhantes aos que obtivemos pela análise de distâncias com exceção da posição de *T. protracta* (complexo *T. lecticularia*) basal ao clado “Triatomini”, como clado irmão de *Linshcosteus-T. rubrofasciata*, ambos do GenBank, na árvore de verossimilhança, que suporta a idéia de origem independente a partir de pelo menos dois ancestrais não-triatomíneos para os clados Norte-Centro Americanos e Sulamericanos evidenciada nos trabalhos de LYMANN et al. (1999), PATTERSON et al (2001), HYPŠA et al. (2002), SAINZ et al. (2004), PAULA et al. (2005).

Segundo SCHOFIELD (1988, 2000) e GORLA et al., (1997) o gênero *Linshcosteus* e as espécies de *Triatoma* do “Velho Mundo” teriam origem por alopatria a partir de derivações ocorridas em populações de *T. rubrofasciata* dispersadas passivamente pelas rotas comerciais da América do Sul para o Oriente durante os últimos 350 anos. As análises moleculares feitas por HYPŠA (2002), PAULA et al. (2005) e os resultados deste estudo demonstram a proximidade genética entre esses Hemiptera.

No entanto, PATTERSON et al (2001) por meio de estudo morfométrico apontam para uma segunda hipótese de que a derivação dos triatomíneos do “Velho Mundo” poderia ter ocorrido a partir de *T. lecticularia*, ou outra espécie do complexo ao qual esta é nominotípica.

Tal evento evolutivo implica também, em uma possível origem de *T. rubrofasciata* a partir de derivação ocorrida em uma das espécies do complexo supra citado, provavelmente *T. rubida*, com a qual guarda muita proximidade morfométrica. Em trabalho recente, PFEILER et al. (2006) usando como marcadores os genes CitB e COI obtiveram *T. rubida* em posição basal ao clado dos “*Triatomas* Neárticos”, reforçando a hipótese de divergência anterior aos demais.

Dessa forma, *T. rubrofasciata*, assim como os triatomíneos extramericanos e, talvez até mesmo, alguns dos triatomíneos da América do Sul, podem ser oriundos a partir da diversificação dos ancestrais dos triatomíneos norte americanos do complexo *T. lecticularia* ocorrida a cerca de 99,8-93,5 milhões de anos, coincidindo com a formação do continente Sul Americano durante a separação da Gondwana (> 95 MA) (PATTERSON et al. 2001, GAUNT e MILES, 2002; SCHAEFER 2003). E a posição basal de *T. protracta* neste estudo pode sugerir isso.

Pela Máxima Verossimilhança (**Fig. 4**), o Gênero *Panstrongylus* apresentou parafilia e relação próxima de *P. megistus* a *D. maxima*, ao complexo *T. dimidiata* e aos *Triatoma* norte-americanos obtidas também em trabalhos anteriores (HYPŠA et al., 2002; PAULA et al., 2005) o que também sustenta os comentários dos três parágrafos anteriores.

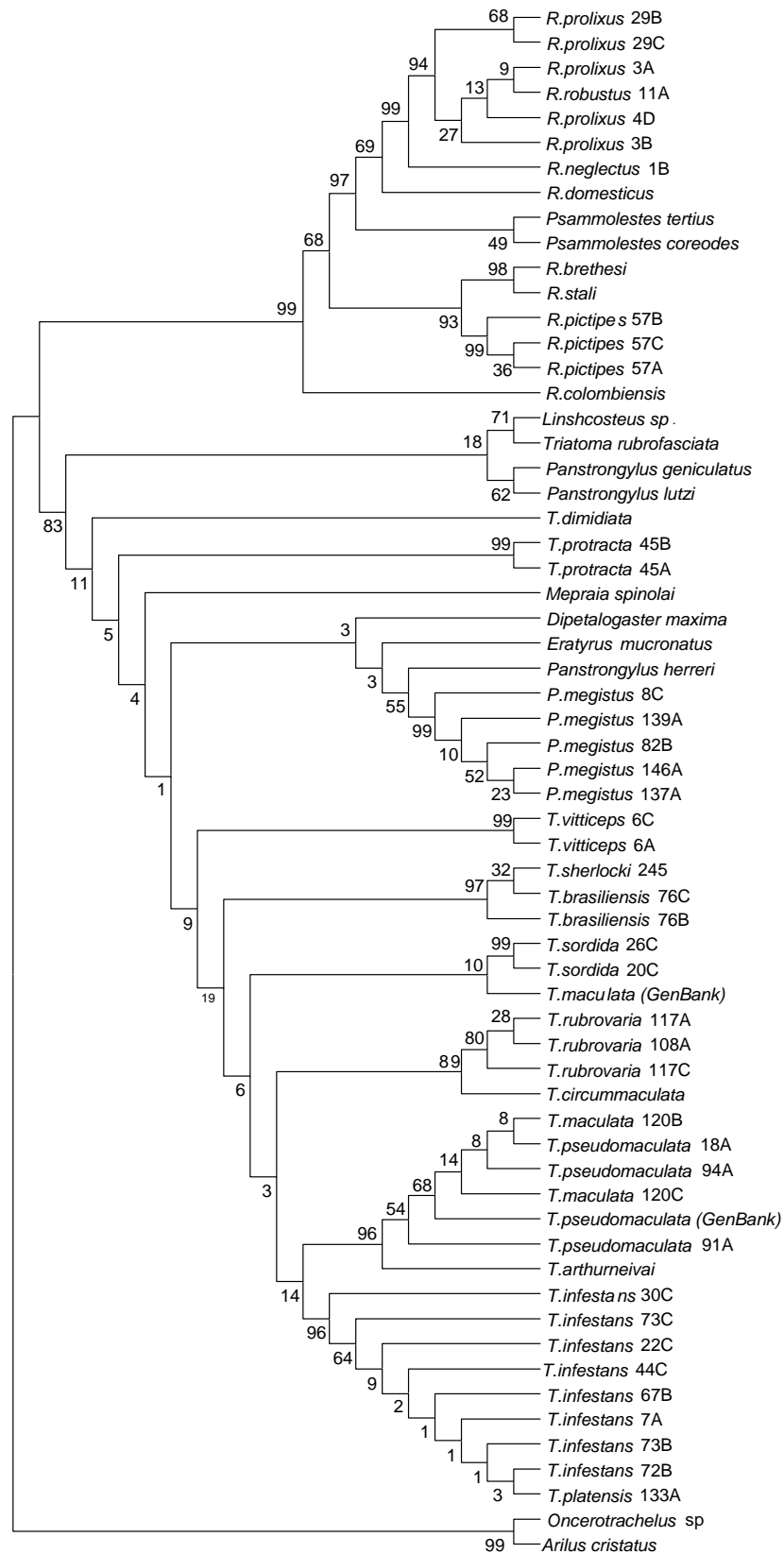


Figura 3. Árvore de Máxima Parcimonia obtida com base no gene 16S para Triatomíneos mantidos em colônias no Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SP (SESA) e disponíveis no GenBank. . Os números associados aos ramos referem-se aos valores de “bootstraps” para 1000 replicações.

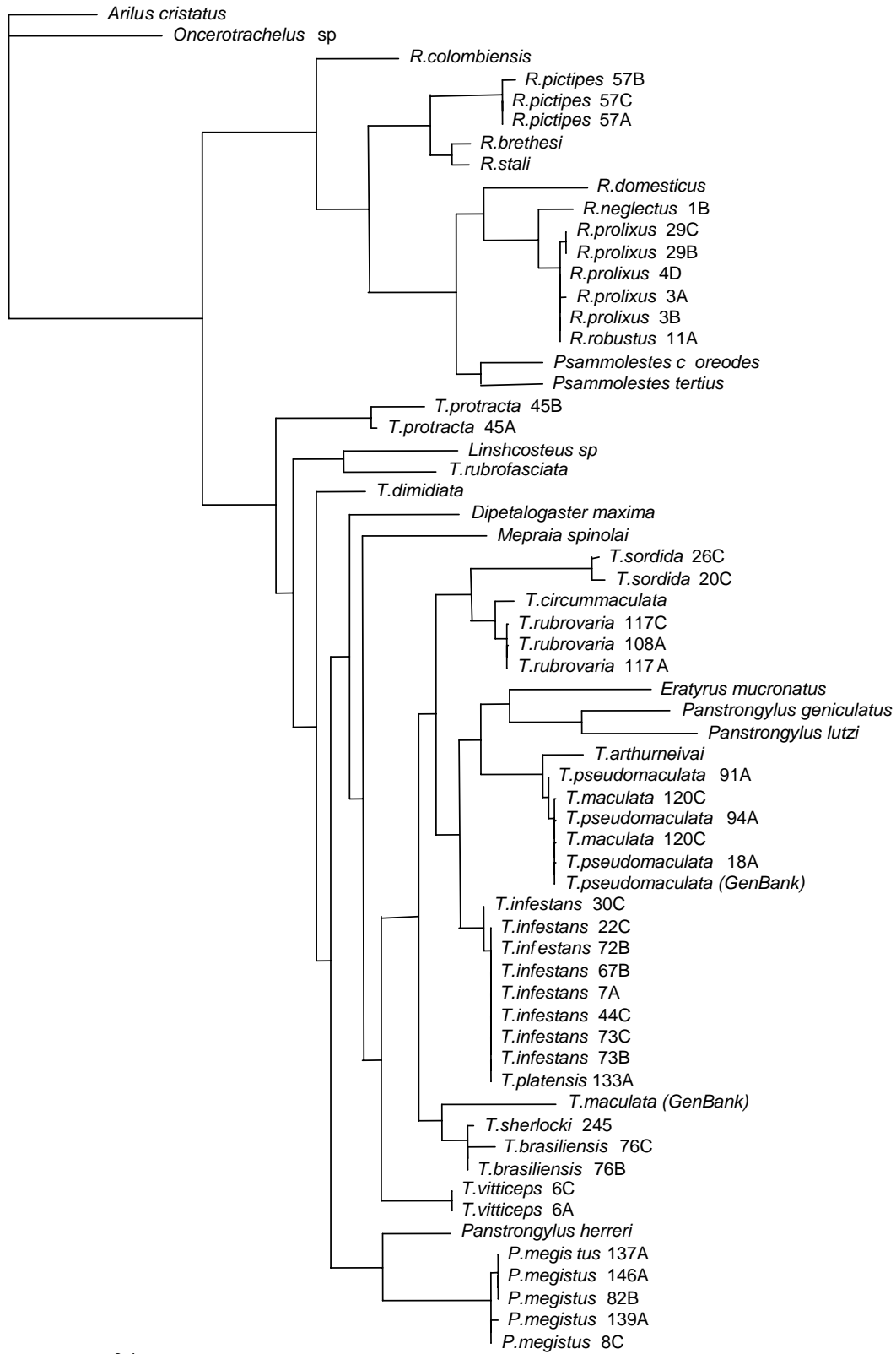


Figura 4. Árvore de Máxima Verossimelhança obtida com base no gene 16S para Triatomíneos mantidos em colônias no Serviço especial de Saúde de Araraquara – SP (SESA) e disponíveis no GenBank.

5.2. Análise do gene citocromo oxidase b (CitB):

Com o gene CitB obtivemos efetivamente amplificação apenas para 8 espécies de Triatominae (*Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*) (**Tab. 8**) apesar de ter-se testado com as mesmas espécies usadas com o gene 16S. Os produtos de amplificação desse gene foram de aproximadamente 500 pb (**Anexo 4**). Da mesma forma referida anteriormente, os fragmentos obtidos foram seqüenciados. As seqüências geradas possuem 393 pb, com 34,4% de A, 33,8% de T, 20,9% de C e 10,9% de G, muito próximos aos valores obtidos por LYMAN et al., (1999). O alinhamento com seqüências do mesmo gene para outros triatomíneos e também de *Arilus cristatus* (grupo externo) disponíveis no GenBank (**Tab. 8**) é mostrado na **Figura 5**.

Tabela 8. Lista de espécies de triatomíneos, mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara - USP que efetivamente foram positivas pelo exame do gene CitB do DNA mitocondrial, segundo sexo, estágio, procedência e código da colônia (CTA). **A-ninfa, B-fêmea, C-macho.**

Gênero	Espécie	Sexo Estádio	Procedência	CTA - Colônia
<i>Rhodnius</i>				
	<i>R. prolixus</i>	B	Colômbia	003
	<i>R. prolixus</i> *	D	Colômbia	004
	<i>R. prolixus</i>	B	Fac. de Medicina Rib. Preto- SP - Brasil	029
		C		
	<i>R. pictipes</i>	A	Jacundá – PA - Brasil	057
<i>Panstrongylus</i>				
	<i>P. megistus</i>	C	Almino Alfonso – RN - Brasil	008
	<i>P. megistus</i>	B	Araraquara – SP - Brasil	082
	<i>P. megistus</i>	A	São Felipe - BA- Brasil	137
	<i>P. megistus</i>		Campus Gerais – MG - Brasil	199
<i>Triatoma</i>				
	<i>T. brasiliensis</i>	B	São João do Piauí - PI- Brasil	076
	<i>T. infestans</i>	A	Mambaí – GO- Brasil	007
	<i>T. infestans</i>	A	Frutal – MG- Brasil	022
		C		
	<i>T. infestans</i>	C	Cochabamba - Bolívia	044
	<i>T. infestans</i>	B	Santa Cruz - Bolívia	072
	<i>T. infestans</i>	B	Tanhaçu - BA- Brasil	067
	<i>T. infestans</i>	B	Gloria de Dourados - MS- Brasil	073
		C		
	<i>T. protracta</i>	A	Monte Del Diablo – California – EUA	045
		B		
	<i>T. vitticeps</i>	A	Guarapari - ES- Brasil	006
		C		

* Linhagem: olhos vermelhos

```

*           20           *           40           *           60           *
T.vitticeps 6A .C.C.....T.....C.....T.....T.....C.T..... : 70
T.vitticeps 6C .C.C.....T.....C.....T.....T.....C.T..... : 70
P.megistus 8C .....C.....A.....C.....T.G..T. : 70
P.megistus 199 .....C.....A.....C.....T.G..T. : 70
P.megistus 137A .....C.....A.....C.....T.....T..... : 70
P.megistus GB .....A.....C.....TG.....T.....T. : 70
P.megistus 82B .....T.....A.....C.....T.....T..... : 70
T.protracta 45A .....C.GG...T.TC...C.....T.....T. : 70
T.protracta 45B .....C.GG...T.TC...C.....T.....T. : 70
D.maximus GB .....C.....T.A.....T.T.G.....T.....C.....T. : 70
T.dimidiata GB .....T.A.....C.....C.T.....G.....TC...C.....G.G... : 70
T.infestans 73C .....C.....T.....C.....C.C.....G..... : 70
T.infestans 67B .....C.....T.....C.....C.C.....G..... : 70
T.infestans 72C .....C.....T.....C.....C.C.....G..... : 70
T.infestans 44B .....C.....T.....C.....C.C.....G..... : 70
T.infestans 22C .....C.....T.....C.....C.C.....G.G... : 70
T.infestans 7A .....C.....T.....C.....C.C.....G..... : 70
T.brasiliensis 76B .....TT...T.C.C.C.C...T.C.GC.C.....GC..... : 70
R.prolixus 3B .....T.....C.....CG.C.....T.....C..... : 70
R.prolixus 29B .....T.....C.....CG.C.....T.....C..... : 70
R.prolixus 29C .....T.....C.....CG.C.....T.....C..... : 70
R.neglectus GB .....TT...C.....C.C.....T.....T.....C..... : 70
R.prolixus 4D .....C.....T.T.....C.C.G.C.....C.....T.....C.G.....C..... : 70
P.coreodes GB .ACTA.TT.G.....C.....C.G.....T.....G.T..... : 70
R.pictipes 57^ .....A..T.T..T.G...T.C.T.T.....T.....T..... : 70
R.brethesi GB .....C.A.....T.....A.....T.....C.....C.....C..... : 70
A.cristatus GB .....C.C...T.....C.....TC...G..ACT.....G..G : 70
ATTACTAACCTACTATCAGCTATTCCATACTTAGGAAATGAATTAGTAAATGATTATGAGGAGGATTC

```

```

80           *           100           *           120           *           140
T.vitticeps 6A .A.....C.....CC...A.....T.A...T..T.....C.....C..... : 140
T.vitticeps 6C .A.....C.....CC...A.....T.A...T..T.....C.....C..... : 140
P.megistus 8C .A.....T.....T.....T.....TT..T.....C..... : 140
P.megistus 199 .A.....T.....T.....T.....TT..T.....C..... : 140
P.megistus 137A .A.....T.....T.....T.....TT..T.....C..... : 140
P.megistus GB .A.....T.....T.....T.....TT..T.....C..... : 140
P.megistus 82B .A.....T.....T.....T.....TT..T.....C..... : 140
T.protracta 45A .C.....C.....C.....T.A...T..AT..T.....CC. : 140
T.protracta 45B .C.....C.....C.....T.A...T..AT..T.....CC. : 140
D.maximus GB .C.T.....A.TC...T.....A.....TT..T.....T. : 140
T.dimidiata GB .....C.....T.....C.....T.....C.....G.....TA. : 140
T.infestans 73C .....C.....A.....C.....C.....C..... : 140
T.infestans 67B .....C.....A.....C.....C.....C..... : 140
T.infestans 72C .....C.....A.....C.....C.....C..... : 140
T.infestans 44B .....C.....A.....C.....C.....C..... : 140
T.infestans 22C .....C.....A.....C.....C.....C..... : 140
T.infestans 7A .....C.....A.....C.....C.....C..... : 140
T.brasiliensis 76B .C.T.C...T..T...AA.....C.....T..CC. : 140
R.prolixus 3B .C.T...C..A...C.....T..T.....C.C.C...CA.T... : 140
R.prolixus 29B .C.T...C..A...C.....T..T.....C.C.C...CA.T... : 140
R.prolixus 29C .C.T...C..A...C.....T..T.....C.C.C...CA.T... : 140
R.neglectus GB .C.C...A...C.....T..T.....C.C.C...C.C... : 140
R.prolixus 4D .C.T.C...A...C.....T.....T.....T.C.T.C.....T... : 140
P.coreodes GB .....C.A...C.....T..T.....T.G.....T... : 140
R.pictipes 57A .....C.....C.....T.....T.....TT...C.....T... : 140
R.brethesi GB .....C.....C.....T.....T.....TT...C.....T... : 140
A.cristatus GB .A.....C.C.....A.AT.A..T..T.....TT...C.....G.....A. : 140
CTGTAGATAAATGCCACATTAACCTCGATTCTTTGCCCTCCACTTCCTCCTACCATTATTATTGCAGCATT

```

Figura 5. Alinhamentos das seqüências de fragmentos do gene citocromo oxidase B (CitB) para triatomíneos mantidos em colônias no Serviço Especial de Saúde de Araraquara- SP (SESA) e disponíveis no GenBank.

	*	160	*	180	*	200	*	
<i>T.vitticeps</i> 6AC..C.....C...C.....C.....GC.T.....-C.....							: 209
<i>T.vitticeps</i> 6CC..C.....C...C.....C.....GC.T.....-C.....							: 209
<i>P.megistus</i> 8C	.GT.....C.....C.....T.....T...C.....C.....-C.....							: 209
<i>P.megistus</i> 199	.GT.....C.....C.....T.....T...C.....C.....-C.....							: 209
<i>P.megistus</i> 137A	.GT...G..C.....C.....T.....T...C.....C.....-C.....							: 209
<i>P.megistus</i> GB	.GT...G..C.....C.....T.....T...C.....C.....-C.....							: 209
<i>P.megistus</i> 82B	.GT...G..C.....C.....T.....T...C.....C.....-C.....							: 209
<i>T.protracta</i> 45A	.GTT..G....C..C.....C.C.....T.....T..G..C..CA-G.....							: 209
<i>T.protracta</i> 45B	.GTT..G....C..C.....C.C.....T.....T..G..C..CA-G.....							: 209
<i>D.maximus</i> GB	.GT.....CC.T..CC.T.....T.....G.....A-T.....							: 209
<i>T.dimidiata</i> GB	.GT...G.....TC.....A.....A.....A-T.....							: 209
<i>T.infestans</i> 73CA..T..T.....-							: 209
<i>T.infestans</i> 67BA..T..T.....-							: 209
<i>T.infestans</i> 72CA..T.....-							: 209
<i>T.infestans</i> 44BA..T.....-							: 209
<i>T.infestans</i> 22CA..T.....-							: 209
<i>T.infestans</i> 7AA..T.....-							: 209
<i>T.brasiliensis</i> 76BA..T..T.....-							: 209
<i>R.prolixus</i> 3B	C.....C..C..TC...CC...C.....AT..T..A.....-							: 209
<i>R.prolixus</i> 29B	...T.....C..C.....C.....C.....C.....A.....TC..							: 209
<i>R.prolixus</i> 29C	...T.....C..C.....C.....C.....C.....A.....TC..							: 209
<i>R.neglectus</i> GB	...T.....C..C.....G.....C.....C.....GC.....A.....TC..							: 209
<i>R.prolixus</i> 4D	...T..G..C..C.....C.....C..C.....C...GC..A.....T..							: 209
<i>P.coreodes</i> GB	...T.....C..T.....C.....C.....C.....T..G..GC..A.....							: 209
<i>R.pictipes</i> 57A	...T.....C..T.....CC.G.....GC...G-G...G....							: 209
<i>R.brethesi</i> GB	...T.....T.....G..C.....AT..T.....CGGGG...G.TC..							: 210
<i>A.cristatus</i> GB	...T.....T.....C.....AT...G.....A.....G.T..							: 209
CT..C.T..CC.....A.AT..T..A.....GC..A.....T..							: 209
AACAAATAATTCATCTATTATTTTTACATCAAACAGGATCTAGAAACCCCTTAGGATTAACGAAGAAACTT								
	220	*	240	*	260	*	280	
<i>T.vitticeps</i> 6AC.....T.....C.....C.T...GA.....CC.....C.A							: 279
<i>T.vitticeps</i> 6CC.....T.....C.....C.T...GA.....CC.....C.A							: 279
<i>P.megistus</i> 8C	...T.....T..T.....C.....TC.T.....C.A							: 279
<i>P.megistus</i> 199	...T.....T..T.....C.....TC.T.....C.A							: 279
<i>P.megistus</i> 137A	...T.....T..T.....C.G..TC.T.....C.A							: 279
<i>P.megistus</i> GB	...T.....T..T.....C.G..TC.T.....C.A							: 279
<i>P.megistus</i> 82B	...T.....T..T.....C.G..TC.T.....C.A							: 279
<i>T.protracta</i> 45A	...T..G.....T.....TC..T.....A..CC.T.....							: 279
<i>T.protracta</i> 45B	...T..G.....T.....TC..T.....A..CC.T.....							: 279
<i>D.maximus</i> GB	...T..G..C.....T.....T.....ATT.A..CC.T.....							: 279
<i>T.dimidiata</i> GB	...T.....T.....C..T..C.....T.....G..CC.A..C.....C							: 279
<i>T.infestans</i> 73C	C.....C..T.A.....C.....							: 279
<i>T.infestans</i> 67B	C.....C..T.A.....C.....							: 279
<i>T.infestans</i> 72C	C.....C..T.A.....							: 279
<i>T.infestans</i> 44B	C.....C..T.A.....							: 279
<i>T.infestans</i> 22C	C.....C..T.A.....							: 279
<i>T.infestans</i> 7A	C.....C..T.A.....C.....							: 279
<i>T.brasiliensis</i> 76B	C.....C.....T..C..T..C.....G..TC.....G..A							: 279
<i>R.prolixus</i> 3B	A.....C.....G..T.....ATT.....TA.....C..							: 279
<i>R.prolixus</i> 29B	A.....C.....G..T.....ATT.....TA.....C..							: 279
<i>R.prolixus</i> 29C	A.....C.....G..T.....ATT.....TA.....C..							: 279
<i>R.neglectus</i> GB	A..T.....C.....G.....G..ATT.....TA.....C..							: 279
<i>R.prolixus</i> 4D	A..T...C.....C.....ATT.....TA.....C..							: 279
<i>P.coreodes</i> GB	A.....AGT.....TA.....GC..							: 279
<i>R.pictipes</i> 57A	A.....C.....T.....TATT...CA.....							: 280
<i>R.brethesi</i> GB	A..T...C.....T.....T.....A.TATT..C..TA.....							: 279
<i>A.cristatus</i> GB	A..T...C.....C.....C..T..C.....C.....A..A.....A..A							: 279
TGACAAAATTCCATTCCACCATACTTTTCAATTAAGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATTT								

Figura 5. continuação

	*	300	*	320	*	340	*	
<i>T.vitticeps</i> 6A	..C..C..C.....	A..C..C.....	G.-.....	T..T..C.....	C	: 348		
<i>T.vitticeps</i> 6C	..C..C..C.....	A..C..C.....	G.-.....	T..T..C.....	C	: 348		
<i>P.megistus</i> 8C	..C..A.....	T..A..C..T..T..T..	-.....	T.....	C.....	T : 348		
<i>P.megistus</i> 199	..C..A..C.....	T.....	C..T..T..G.....	-.....	T.....	C.....	T : 348	
<i>P.megistus</i> 137A	A.....	T.....	C..T..T.....	-.....	C.....	T : 348	
<i>P.megistus</i> GB	A.....	T.....	C..T..T.....	-.....	C.....	T : 348	
<i>P.megistus</i> 82B	A.....	T.....	C..T..T.....	-.....	C.....	T : 348	
<i>T.protracta</i> 45A	A.....	C..G.....	A.....	C..G.....	-C.....	T..T.....	: 348
<i>T.protracta</i> 45B	A.....	C..G.....	A.....	C..G.....	-C.....	T..T.....	: 348
<i>D.maximus</i> GB	..C.....	C..C..C.....	A..T.....	-.....	T.....	T..T..T..C..T	: 348	
<i>T.dimidiata</i> GB	CC.T.G.....	AG.C.C..CT..AT..	-.....	C.....	C.....	C... : 348	
<i>T.infestans</i> 73C	C..C..CT.....	T.....	-.....			: 348	
<i>T.infestans</i> 67B	C..C..CT.....	T.....	-.....			: 348	
<i>T.infestans</i> 72C	C..CC..CT.....	T.....	-.....			: 348	
<i>T.infestans</i> 44B	C..CC..CT.....	T.....	-.....			: 348	
<i>T.infestans</i> 22C	C..CC..CT.....	A.....	T.....	-.....		: 348	
<i>T.infestans</i> 7A	C..C..CT.....	A.....	T.....	-.....		: 348	
<i>T.brasiliensis</i> 76B	A..C..T..CT..G.G..A.....	C.....	-.....	T.....		: 348	
<i>R.prolixus</i> 3B	T.....	C.....	-C..C.....	C..G	: 348		
<i>R.prolixus</i> 29B	T.....	C.....	-C..C.....	C..G	: 348		
<i>R.prolixus</i> 29C	T.....	C.....	-C..C.....	C..G	: 348		
<i>R.neglectus</i> GB	T.....	C.....	-C..C.....	C..G	: 348		
<i>R.prolixus</i> 4D	T.....	C.....	-C..C.....	C..G	: 348		
<i>P.coreodes</i> GB	T.....	T.....	A..G..C.....	-.....	T.....	: 348	
<i>R.pictipes</i> 57A	..C..T.....	T.....	A..A..C.....	C..T.....	T.....	G..G.....	: 350	
<i>R.brethesi</i> GB	..CT.....	T.....	A.....	CT.G.....	-C.....	T.....	T.....	C..G : 348
<i>A.cristatus</i> GB	A.....	CAT..T..A.....	C..AT.....	-.....	T.....	T..T..T..T..GC... : 348	
TTTATTCTATTAAATCTATGAGAGCCACGAATTCTAGGAGATTCCAGAAAACCTTATCCAGCAAATCCA								
		360	*	380	*			
<i>T.vitticeps</i> 6A	A.....				: 393		
<i>T.vitticeps</i> 6C	A.....				: 393		
<i>P.megistus</i> 8C	T.....	T.....	G.....	C..T.....		: 393		
<i>P.megistus</i> 199	T.....	T.....	G.....	C..T.....		: 393		
<i>P.megistus</i> 137A	T.....	T.....	G.....	C..T.....		: 393		
<i>P.megistus</i> GB	T.....	T.....	G.....	C..T.....		: 393		
<i>P.megistus</i> 82B	T.....	G..C.....	C..TT.....		: 393		
<i>T.protracta</i> 45A	A.....	A..C.....	C.....	T	: 393		
<i>T.protracta</i> 45B	A.....	A..C.....	C.....	T	: 393		
<i>D.maximus</i> GB	A..G.....	A..C.....	A.....	C.....	T	: 393	
<i>T.dimidiata</i> GB	A.....	A.....	G.....	C.....		: 393	
<i>T.infestans</i> 73C	..G.....	C.....				: 393		
<i>T.infestans</i> 67B	..G.....	C.....				: 393		
<i>T.infestans</i> 72C	..G.....	C.....				: 393		
<i>T.infestans</i> 44B	..G.....	C.....				: 393		
<i>T.infestans</i> 22C	C.....				: 393		
<i>T.infestans</i> 7A	C.....				: 393		
<i>T.brasiliensis</i> 76B	T.....	A..T.....	C.....	C.....	T.....	: 393		
<i>R.prolixus</i> 3B	..C..A.....	C..A.....	C..G..A.....	T.....		: 393		
<i>R.prolixus</i> 29B	..C..A.....	C..A.....	C..G..A.....	T.....		: 393		
<i>R.prolixus</i> 29C	..C..A.....	C..A.....	C..G..A.....	T.....		: 393		
<i>R.neglectus</i> GB	..C..A.....	T..G.....	C.....	A.....	T.....	: 393		
<i>R.prolixus</i> 4D	..T..A.....	C..G.....	G..A.....	T.....		: 393		
<i>P.coreodes</i> GB	..T..G.....	T.....	C.....	A.....	T.....	T : 393		
<i>R.pictipes</i> 57A	..T..A..A.....		A.....	TT.....	T	: 395		
<i>R.brethesi</i> GB	..C..A..A.....		A.....	C..T.G...		: 393		
<i>A.cristatus</i> GB	T.....	A.....	A.....	G.....	T.....	: 393		
CTAGTTACCCAGTTCATATTCAACCTGAATGATATTTCTATTC								

Figura 5. continuação

Com o uso do programa MEGA construímos uma matriz de distância como mostra a **Tabela 9**. Onde as distâncias gerais variaram de 0% a 31,5 % entre todos os Triatominae estando corroboradas pelos estabelecidos por DUJARDIN et al., (2002).

A árvore de distância para o gene CitB (**Fig. 6**), apesar de possuir menor número de espécies, mostrou de modo geral as mesmas topografias observadas para o gene 16S. Principalmente em relação à parafilia de Rhodnini e a proximidade gênica de *P. megistus* com o clado dos triatomíneos Centro-Norte Americanos coincidindo com os trabalhos de LYMAN et al. 1999). Mais uma vez evidenciando a origem polifilética de Triatomini observada em trabalhos anteriores (BARGUES et al. 2000; HYPŠA et al., 2002; PAULA et al. 2005)

Apesar do número reduzido de espécies para as quais obtivemos fragmentos do gene CitB e de constatarmos haver também, poucas seqüências do mesmo no GenBank. Observou-se que o mesmo é mais polimórfico do que o 16 S sendo útil para distinção de variações genéticas em populações geográficas de uma mesma espécie. Isto foi observado em *T. infestans*, *P. megistus* e *R. prolixus* como mostra a árvore de distância (**Fig. 6**).

Em *T. infestans*, o polimorfismo variou de 0% a 1,5% (**Tab. 9**), característicos de diferentes populações geográficas. Foram distinguidos quatro haplotipos dentre as amostras testadas com clusters coerentes, principalmente quanto às populações procedentes da Bolívia (44B-72C) e Minas Gerais-Bahia, Brasil (67B-73C) embora, sejam necessárias a inclusão de amostras de outras procedências para uma análise mais precisa. A amostra procedente de Mambaí (7A) mostrou-se mais diversificada do que as demais tomando posição basal ao clado (**Fig. 6**).

Tabela 9. Matriz de distâncias obtidas para fragmentos do gene CitB (mtDNA) para espécies de triatomíneos mantidas em colônias pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara- SP e disponíveis no GenBank.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
<i>T.vitticeps</i> 6A	1																											
<i>T.vitticeps</i> 6C	2	0.000																										
<i>P.megistus</i> 8C	3	0.208	0.208																									
<i>P.megistus</i> 199	4	0.208	0.208	0.008																								
<i>P.megistus</i> 137A	5	0.214	0.214	0.026	0.026																							
<i>P.megistus</i> GB	6	0.222	0.222	0.031	0.031	0.005																						
<i>P.megistus</i> 82B	7	0.218	0.218	0.039	0.039	0.013	0.018																					
<i>T.protracta</i> 45A	8	0.227	0.227	0.217	0.213	0.207	0.211	0.213																				
<i>T.protracta</i> 45B	9	0.227	0.227	0.217	0.213	0.207	0.211	0.213	0.000																			
<i>D.maximus</i> GB	10	0.242	0.242	0.233	0.232	0.239	0.248	0.246	0.178	0.178																		
<i>T.dimidiata</i> GB	11	0.272	0.272	0.229	0.229	0.222	0.230	0.225	0.245	0.245	0.223																	
<i>T.infestans</i> 73C	12	0.188	0.188	0.198	0.198	0.191	0.196	0.198	0.230	0.230	0.254	0.229																
<i>T.infestans</i> 67B	13	0.188	0.188	0.198	0.198	0.191	0.196	0.198	0.230	0.230	0.254	0.229	0.000															
<i>T.infestans</i> 72C	14	0.178	0.178	0.209	0.209	0.202	0.206	0.209	0.227	0.227	0.252	0.225	0.008	0.008														
<i>T.infestans</i> 44B	15	0.178	0.178	0.209	0.209	0.202	0.206	0.209	0.227	0.227	0.252	0.225	0.008	0.008	0.000													
<i>T.infestans</i> 22C	16	0.175	0.175	0.209	0.209	0.202	0.206	0.209	0.220	0.220	0.248	0.214	0.015	0.015	0.008	0.008												
<i>T.infestans</i> 7A	17	0.185	0.185	0.195	0.195	0.188	0.192	0.195	0.219	0.219	0.243	0.218	0.008	0.008	0.015	0.015	0.013											
<i>T.brasiliensis</i> 76B	18	0.263	0.263	0.257	0.256	0.242	0.247	0.249	0.259	0.259	0.289	0.294	0.176	0.176	0.179	0.179	0.176	0.166										
<i>R.prolixus</i> 3B	19	0.261	0.261	0.259	0.259	0.240	0.249	0.230	0.283	0.283	0.270	0.312	0.215	0.215	0.213	0.213	0.220	0.222	0.287									
<i>R.prolixus</i> 29B	20	0.261	0.261	0.259	0.259	0.240	0.249	0.230	0.283	0.283	0.270	0.312	0.215	0.215	0.213	0.213	0.220	0.222	0.287	0.000								
<i>R.prolixus</i> 29C	21	0.261	0.261	0.268	0.267	0.248	0.257	0.237	0.287	0.287	0.274	0.315	0.223	0.223	0.220	0.220	0.227	0.230	0.290	0.005	0.005							
<i>R.neglectus</i> GB	22	0.253	0.253	0.266	0.265	0.247	0.256	0.236	0.286	0.286	0.267	0.303	0.215	0.215	0.212	0.212	0.219	0.222	0.302	0.058	0.058	0.064						
<i>R.prolixus</i> 4D	23	0.267	0.267	0.265	0.260	0.264	0.269	0.260	0.265	0.265	0.237	0.305	0.242	0.242	0.239	0.239	0.246	0.249	0.270	0.124	0.124	0.127	0.124					
<i>P.coreodes</i> GB	24	0.259	0.259	0.272	0.271	0.271	0.281	0.260	0.294	0.294	0.267	0.311	0.212	0.212	0.209	0.209	0.202	0.212	0.302	0.172	0.172	0.179	0.165	0.164				
<i>R.pictipes</i> 57A	25	0.288	0.288	0.277	0.277	0.280	0.290	0.277	0.247	0.247	0.256	0.287	0.226	0.226	0.230	0.230	0.230	0.226	0.286	0.219	0.219	0.227	0.218	0.212	0.180			
<i>R.brethesi</i> GB	26	0.237	0.237	0.256	0.252	0.259	0.268	0.256	0.261	0.261	0.235	0.264	0.210	0.210	0.208	0.208	0.208	0.204	0.270	0.189	0.189	0.189	0.182	0.162	0.197	0.150		
<i>A.cristatus</i> GB	27	0.265	0.265	0.294	0.293	0.309	0.319	0.313	0.312	0.312	0.310	0.312	0.287	0.287	0.300	0.300	0.296	0.283	0.303	0.330	0.330	0.329	0.291	0.282	0.269	0.294	0.245	

Tabela 9. Matriz de distâncias obtidas para fragmentos do gene *CitB* (mtDNA) para espécies de triatomíneos mantidas em colônias pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara- SP e disponíveis no GenBank.

	000	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
<i>T.vitticeps</i> 6A	1																													
<i>T.vitticeps</i> 6C	2	0.000																												
<i>P.megistus</i> 8C	3	0.208	0.208																											
<i>P.megistus</i> 199	4	0.208	0.208	0.008																										
<i>P.megistus</i> 137A	5	0.214	0.214	0.026	0.026																									
<i>P.megistus</i> GB	6	0.222	0.222	0.031	0.031	0.005																								
<i>P.megistus</i> 82B	7	0.218	0.218	0.039	0.039	0.013	0.018																							
<i>T.protracta</i> 45A	8	0.227	0.227	0.217	0.213	0.207	0.211	0.213																						
<i>T.protracta</i> 45B	9	0.227	0.227	0.217	0.213	0.207	0.211	0.213	0.000																					
<i>D.maximus</i> GB	10	0.242	0.242	0.233	0.232	0.239	0.248	0.246	0.178	0.178																				
<i>T.dimidiata</i> GB	11	0.272	0.272	0.229	0.229	0.222	0.230	0.225	0.245	0.245	0.223																			
<i>T.infestans</i> 73C	12	0.188	0.188	0.198	0.198	0.191	0.196	0.198	0.230	0.230	0.254	0.229																		
<i>T.infestans</i> 67B	13	0.188	0.188	0.198	0.198	0.191	0.196	0.198	0.230	0.230	0.254	0.229	0.000																	
<i>T.infestans</i> 72C	14	0.178	0.178	0.209	0.209	0.202	0.206	0.209	0.227	0.227	0.252	0.225	0.008	0.008																
<i>T.infestans</i> 44B	15	0.178	0.178	0.209	0.209	0.202	0.206	0.209	0.227	0.227	0.252	0.225	0.008	0.008	0.000															
<i>T.infestans</i> 22C	16	0.175	0.175	0.209	0.209	0.202	0.206	0.209	0.220	0.220	0.248	0.214	0.015	0.015	0.008	0.008														
<i>T.infestans</i> 7A	17	0.185	0.185	0.195	0.195	0.188	0.192	0.195	0.219	0.219	0.243	0.218	0.008	0.008	0.015	0.015	0.013													
<i>T.brasiliensis</i> 76B18	18	0.263	0.263	0.257	0.256	0.242	0.247	0.249	0.259	0.259	0.289	0.294	0.176	0.176	0.179	0.179	0.176	0.166												
<i>R.prolixus</i> 3B	19	0.261	0.261	0.259	0.259	0.240	0.249	0.230	0.283	0.283	0.270	0.312	0.215	0.215	0.213	0.213	0.220	0.222	0.287											
<i>R.prolixus</i> 29B	20	0.261	0.261	0.259	0.259	0.240	0.249	0.230	0.283	0.283	0.270	0.312	0.215	0.215	0.213	0.213	0.220	0.222	0.287	0.000										
<i>R.prolixus</i> 29C	21	0.261	0.261	0.268	0.267	0.248	0.257	0.237	0.287	0.287	0.274	0.315	0.223	0.223	0.220	0.220	0.227	0.230	0.290	0.005	0.005									
<i>R.neglectus</i> GB	22	0.253	0.253	0.266	0.265	0.247	0.256	0.236	0.286	0.286	0.267	0.303	0.215	0.215	0.212	0.212	0.219	0.222	0.302	0.058	0.058	0.064								
<i>R.prolixus</i> 4D	23	0.267	0.267	0.265	0.260	0.264	0.269	0.260	0.265	0.265	0.237	0.305	0.242	0.242	0.239	0.239	0.246	0.249	0.270	0.124	0.124	0.127	0.124							
<i>P.coreodes</i> GB	24	0.259	0.259	0.272	0.271	0.271	0.281	0.260	0.294	0.294	0.267	0.311	0.212	0.212	0.209	0.209	0.202	0.212	0.302	0.172	0.172	0.179	0.165	0.164						
<i>R.pictipes</i> 57A	25	0.288	0.288	0.277	0.277	0.280	0.290	0.277	0.247	0.247	0.256	0.287	0.226	0.226	0.230	0.230	0.230	0.226	0.286	0.219	0.219	0.227	0.218	0.212	0.180					
<i>R.brethesi</i> GB	26	0.237	0.237	0.256	0.252	0.259	0.268	0.256	0.261	0.261	0.235	0.264	0.210	0.210	0.208	0.208	0.208	0.204	0.270	0.189	0.189	0.189	0.182	0.162	0.197	0.150				
<i>A.cristatus</i> GB	27	0.265	0.265	0.294	0.293	0.309	0.319	0.313	0.312	0.312	0.310	0.312	0.287	0.287	0.300	0.300	0.296	0.283	0.303	0.330	0.330	0.329	0.291	0.282	0.269	0.294	0.245			

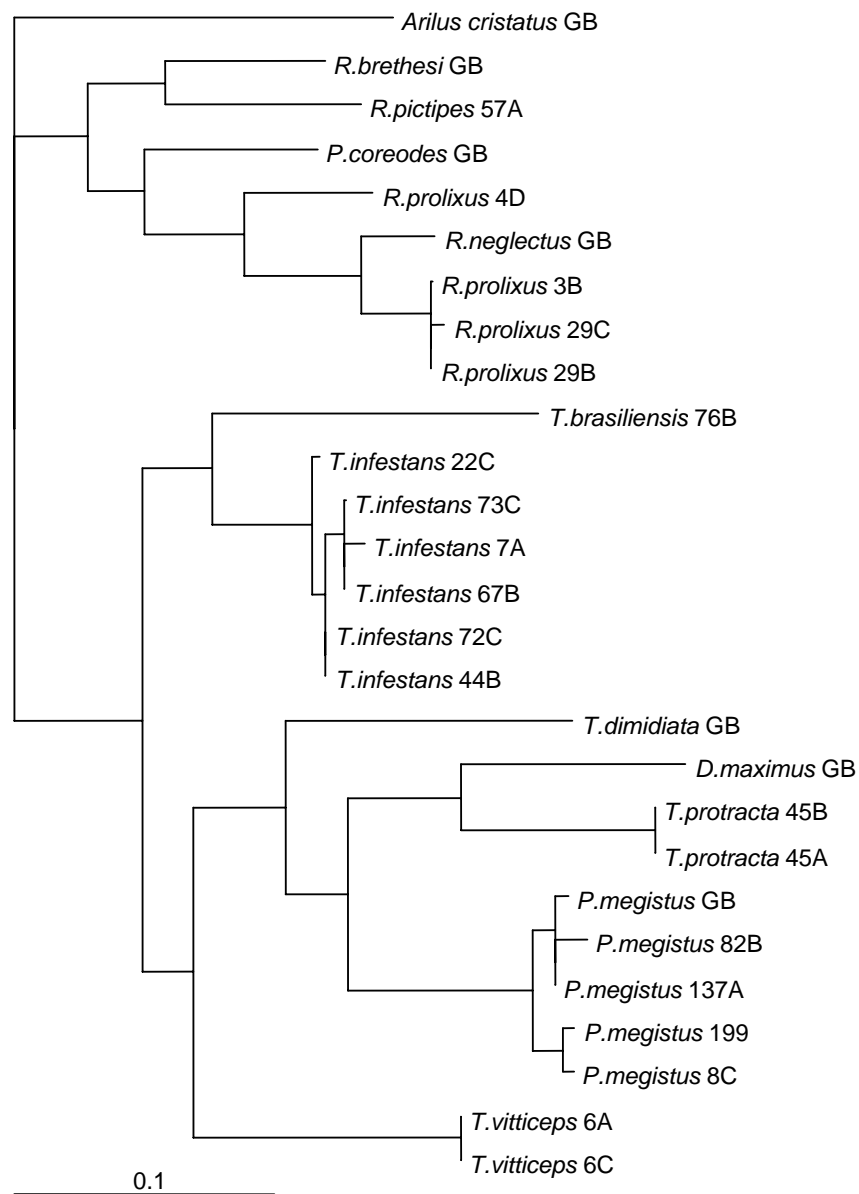


Figura 6. Árvore de distâncias obtidas para fragmentos do gene CitB (mtDNA) para triatomíneos mantidos em colônias pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara –SP (SESA) e disponíveis no GenBank.

T. infestans foi, até período recente, a espécie vetora mais importante no contexto da doença de Chagas. Muitos autores admitem a origem e centro de dispersão dessa espécie a partir das áreas mesotérmicas da região de Cochabamba, Bolívia (FORATTINI 1980; SCHOFIELD, 1988, 2000; DUJARDIN et al., 1997a,b, 1998b, 2000; CARCAVALLO et al., 2000; NOIREAU et al., 2000a,b, 2005). As evidências moleculares apontam em haver dois haplótipos básicos dessa espécie, um Andino e um não-Andino, estabelecendo a sua origem das terras altas dos Andes até a região do Chaco (NOIREAU et al., 1999, 2000a,b, 2005; PANZERA et al., 2004; BARGUES et al. 2006).

As populações domiciliadas de *T. infestans* estão sob os esforços conjuntos dos países do Pacto Andino e Cone Sul para a sua erradicação, com significativo sucesso (WHO 2002). Porém, algumas localidades têm apresentado reinfestação dos domicílios tratados com inseticidas com base em piretroídes que é atribuída a resistência das populações locais ao tratamento (MONTERIO et al. 2001; MARCET et al. 2006). Para solução desse problema é necessário o uso de marcadores com grande poder de resolução, por exemplo microssatélites, uma vez que as técnicas de aloenzimas não foram suficientemente polimórficas para explicar a dispersão ou fluxo gênico. E as morfométricas, apesar de mostrar padrões na estrutura espacial das populações geográficas não possibilitaram explicar a origem das mesmas (MARCET et al. 2006).

Nesse sentido a utilização de seqüências do gene *CitB* parece ser promissora, posto que conseguiu-se identificar quatro haplótipos distintos mesmo em um número reduzido de populações testadas.

T. infestans apresenta grande afinidade genética com *T. platensis* evidenciada por hibridização completa, com descendentes viáveis e, citogeneticamente por emparelhamento

nos dos cromossomos durante a divisão celular (PÉREZ et al., 2005). Neste trabalho, essa condição foi mostrada pela análise de distâncias com o gene 16S (**Fig. 2**), no entanto, não se conseguiu amplificar o fragmentos para o CitB.

A posição basal de *T. brasiliensis* ao clado acima é explicada pela ausência nesta análise das espécies com quem apareceu alinhado pelo gene 16S. O mesmo pode ser dito a respeito do “cluster” (*T. dimidiata* (*T. protracta*, *D. maxima*)), ver **Figura 6**, explicado pela não participação de *Linshcosteus* e *T. rubrofascita* na análise com o gene CitB. Porém, *T. dimidata* tem relacionamento mais próximo ao complexo *M. phyllosoma* de *Meccus* (Stål 1859), gênero revalidado por CARCAVALLO et al., (2000) e confirmado pelas análises moleculares de HYPŠA et al. (2002).

T. vitticeps apareceu basal ao clado *T. brasiliensis-infestans*, porém, sustentado por um bootstrap de 34 %, considerado muito baixo, indicando novamente a necessidade de inclusão de novas amostras para uma análise mais conclusiva (**Fig. 6**).

Em *Panstrongylus megistus* identificou-se cinco populações distintas com distâncias que variaram até 3,9% (**Tab. 9**) resultados corroborados por resultados anteriores obtidos por diversas técnicas que envolveram estudos morfológicos, morfométricos, moleculares e biométricos (BARBOSA et al., 1999, 2001, 2003, 2004, 2006; SANTOS et al. 2003).

Esses estudos estabeleceram a ocorrência de, pelo menos três, haplotipos distintos para as populações de *P. megistus* ocorrentes no Brasil, sendo que aquelas procedentes dos Estados de Santa Catarina e Ceará mostraram-se mais diversificadas entre si do que aquelas dos demais Estados e formaram clado interno no fenograma. A origem dessas populações, determinada por meio de C₁₄, foi estabelecida entre 18.000 e 8.000 anos. Tendo como eventos de relevância para o isolamento geográfico entre as mesmas: o surgimento das

Serras do Mar e Mantiqueira e posteriormente a formação de “ilhas” de Mata Atlântica no interior da caatinga (BARBOSA et al. 2006).

Essa espécie é considerada atualmente um dos mais importantes vetores do mal de Chagas no território brasileiro (SCHOFIELD, 1994, CARCAVALLO et al. 1998; DIAS et al., 2002; DIAS, 2006).

O domínio morfoclimático original dessa espécie consiste nas florestas tropicais Atlânticas e sua domiciliação é o resultado da ação humana sobre os seus habitats naturais. Essa espécie tem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada do Nordeste ao Sul do território brasileiro abrangendo 17 estados desta região, ocorrendo nos domínios fitogeográficos dos cerrados, das Matas Atlânticas remanescentes e das caatingas (seca, floresta aberta) onde as ilhas de mata original cercadas por pastagens permitem que as populações de *P. megistus* sobrevivam em isolamento geográfico. Fora do Brasil é registrado na Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia (FORATTINI 1980, SCHOFIELD 1994, CARCAVALLO et al. 1998, BARBOSA et al. 2003, 2004).

A parafilia do Gênero *Panstrongylus*, como também sua estreita relação genética com os triatomíneos Centro-Norte Americanos pertencentes ao Gênero *Meccus*, *D. maxima* e ao complexo *T. lecticularia* de *Triatoma* foi demonstrada por meio da análise de ITS-2, 16S e 12S, corroborando com a hipótese de origem do clado neotropical de Triatomini a partir de ancestrais das linhagens neárticas, ou ainda, por derivação direta de um dos membros já constituídos, *T. rubida*, por exemplo, semelhantemente ao que supostamente tenha ocorrido aos Triatominae do Velho Mundo (PATTERSON et al., 2001; HYPŠA et al. 2002; MARCILA et al., 2002; SAINZ et al. 2004).

No trabalho de MARCILA et al., (2002) foi verificado não haver diferenças genéticas entre *P. lignarius* e *P. herreri*, levando estes autores a proporem a sinonímia

destas espécies. Também, foi verificada a divergência maior de *P. rufotuberculatus* em relação às demais espécies de *Panstrongylus* o que poderá determinar a revalidação de *Mestor* gênero proposto por Kirkhaldy (1904) para a inclusão deste taxon são corroboradas por SANTOS et al. (2003).

Os resultados para a Tribo Rhodniini foram semelhantes aos registrados para o gene 16S e confirmaram a parafilia deste grupo com formação de dois clados distintos nos quais ocorrem relacionamento de *R. pictipes-brethesi* e de *P. coreodes-R. prolixus-R. neglectus* já observados em estudos anteriores (HYPŠA et al. 2002; PAULA et al. 2005).

As distâncias foram: 15 % entre *R. brethesi* e *R. pictipes*, e variaram de 0,5 % a 12,7% no ramo correspondente a (*P. coreodes* (*R. prolixus* 4D (*R. neglectus* (*R. prolixus* 3C/*R. prolixus* 29C (*R. prolixus* 29 B)))) sendo que entre os *R. prolixus* 4D apresentou-se mais diversificado do que os demais (12,4 %). A inclusão neste ramo de *R. neglectus* (GenBank) distinguindo dois grupos de *R. prolixus* pode ter várias interpretações uma vez, que não nos foi possível extrair maiores informações sobre a procedência da colônia de CTA-029 doada para o SESA pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil ainda durante a década de 1970. Pode inclusive, ser um caso de erro de identificação pois, a distância dessa para *R. neglectus* foi de 0,64 % (**Tab. 9; Fig. 6**).

R. brethesi e *R. pictipes* são consideradas silvestres e ocorrem na região amazônica. Ambas estão associadas a palmeiras sendo a primeira, a piassava (*Leopoldina piassaba*) e a segunda, a mucujá (*Acrocomia sclerocarpa*). As duas porém, têm sido registradas no peridomicílio, relacionadas a casos agudos de doença de Chagas na Amazônia (CARCAVALLO et al. 1999, GALVÃO et al. 2003, MINISTÉRIO DA SAÚDE 2007) e em estudos filogenéticos recentemente publicados apareceram relacionadas a *R. pallescens* (CHAVES et al. 1999, HYPŠA et al. 2002).

Em relação a *R. neglectus*, está amplamente distribuída por 11 estados brasileiros, normalmente associada a palmeiras dos gêneros *Attalea*, *Mauritia* e *Acrocomia*, a ninhos de pássaros *funeridae* e de mamíferos *Didelphis* (CARCAVALLO et al. 1998, SILVEIRA et al. 1999). Apesar, de ser corriqueiramente encontrada no peridomicílio e intradomicílio, não é considerada vetor importante para o mal de Chagas (BARRETO 1979).

R. prolixus, como comentado anteriormente, está entre os mais importantes vetores da América Latina, e ocorre em habitações humanas da Colômbia, Venezuela e América Central.

A árvore de Máxima Parcimônia (**Fig. 7**) apresentou topografia em que as relações filogenéticas entre as espécies foram coincidentes com as da árvore de distância. Já a árvore de Máxima Verossimilhança (**Fig. 8**) apresentou *T. vitticeps* em ramo basal relacionado aos Triatomini do hemisfério norte, diferindo da árvore de distâncias e de MP assim como, aos resultados do gene 16S obtidos nesta Tese e em filogenias anteriores (HYPŠA et al. 2002, SAINZ et al. 2004; PAULA et al. 2005).

Neste trabalho, as árvores de distância obtidas por *Neighbor Joining* (NJ) (**Figs. 2;6**) foram utilizadas para inferir relações filogenéticas pelo número de diferenças encontradas nas seqüências de bases resultantes do alinhamento dos produtos de PCR de cada gene. Este método pressupõe que as espécies com menores distâncias entre si sejam mais proximamente relacionadas (RIDLEY, 2006).

É um modo fácil e rápido, porém não tão preciso de se estabelecer inferências quanto às relações de parentesco evolutivo entre espécies ou grupos de espécies (RIDLEY, 2006). E pode ser aplicado ao DNA mitocondrial dos insetos, que apresenta alto teor de pares A – T (cerca de 70%), pois, admite não haver equilíbrio na composição das seqüências de base (A, T, C e G) que ocorrem em desigualdade (DeSALLE et al., 1987;

SAITOU e NEI, 1987; GALTIER e GOUY, 1995). Os resultados desta tese estão portanto, coerentes com as observações desses autores.

Aceita-se que valores de corte de distâncias genéticas que distinguem espécies tenham valores próximos a 16% (THORPE e SOLÉ-CAVA, 1994). NOIREAU et al. (1998) estabeleceram que valores ao redor de 10% sejam indicativos de nível específico para os insetos de importância médica. Em triatomíneos os valores médios encontrados para comparações interespecíficas foram de $50,1 \pm 34,1\%$ e entre populações geográficas de uma mesma espécie (co-específicos), cerca de $1,3 \pm 0,9\%$ (DUJARDIN et al, 2002).

Nesta tese o valor máximo de distâncias genéticas entre duas espécies foi para *R. neglectus* 1A e *T. sordida* 20C (20,9%) (**Tab. 7**) para o gene 16 S e 31,5% entre *R. prolixus* (29C) e *T. dimidiata* do GenBank para o gene CitB (**Tab. 9**), portanto, dentro dos estabelecidos por DUJARDIN et al. (2002).

Em contra partida, os métodos de Máxima Parcimônia (MP) (**Figs. 3;7**) e Máxima Verossimilhança (ML) (**Figs. 4;8**) são métodos mais sofisticados que permitem análises cladísticas. E distinguem dos métodos numéricos de inferências sistemáticas, que consideraram apenas as quantidades de igualdades (e/ou diferenças) existentes entre as espécies (ou grupos). Pois, estão pautadas na capacidade de se identificar os estados primitivos (plesiomórficos) e derivado (apomórfico) dos caracteres, no caso, a composição das seqüências das bases nitrogenadas de fragmentos dos genes 16S e CitB do DNA mitocondrial de triatomíneos, mediante comparação com um grupo “externo” (*out group*) utilizando-se apenas a apomorfias verdadeiras (sinapomorfias) para as inferências (AVISE, 1994; THORPE e SOLÉ-CAVA, 1994; ABAD-FRANCH e MONTEIRO; 2005).

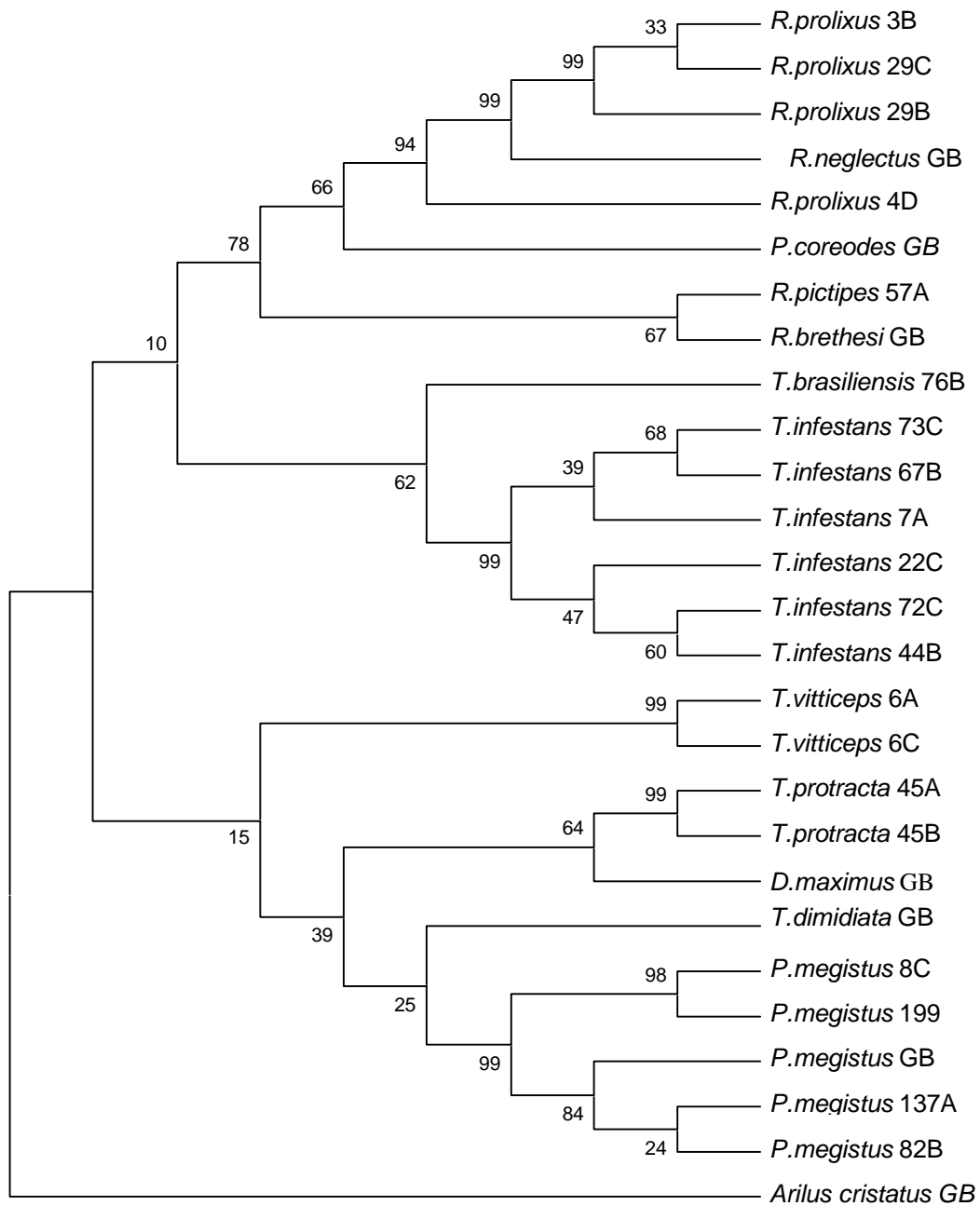


Figura 7. Árvore de Máxima Parcimonia obtida por meio de seqüências de fragmentos do gene CitB para Triatomíneos mantidos pelo Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara-SP (SESA) e disponíveis no GenBank. Os números associados aos ramos referem-se aos valores de “*bootstraps*” para 1000 replicações.

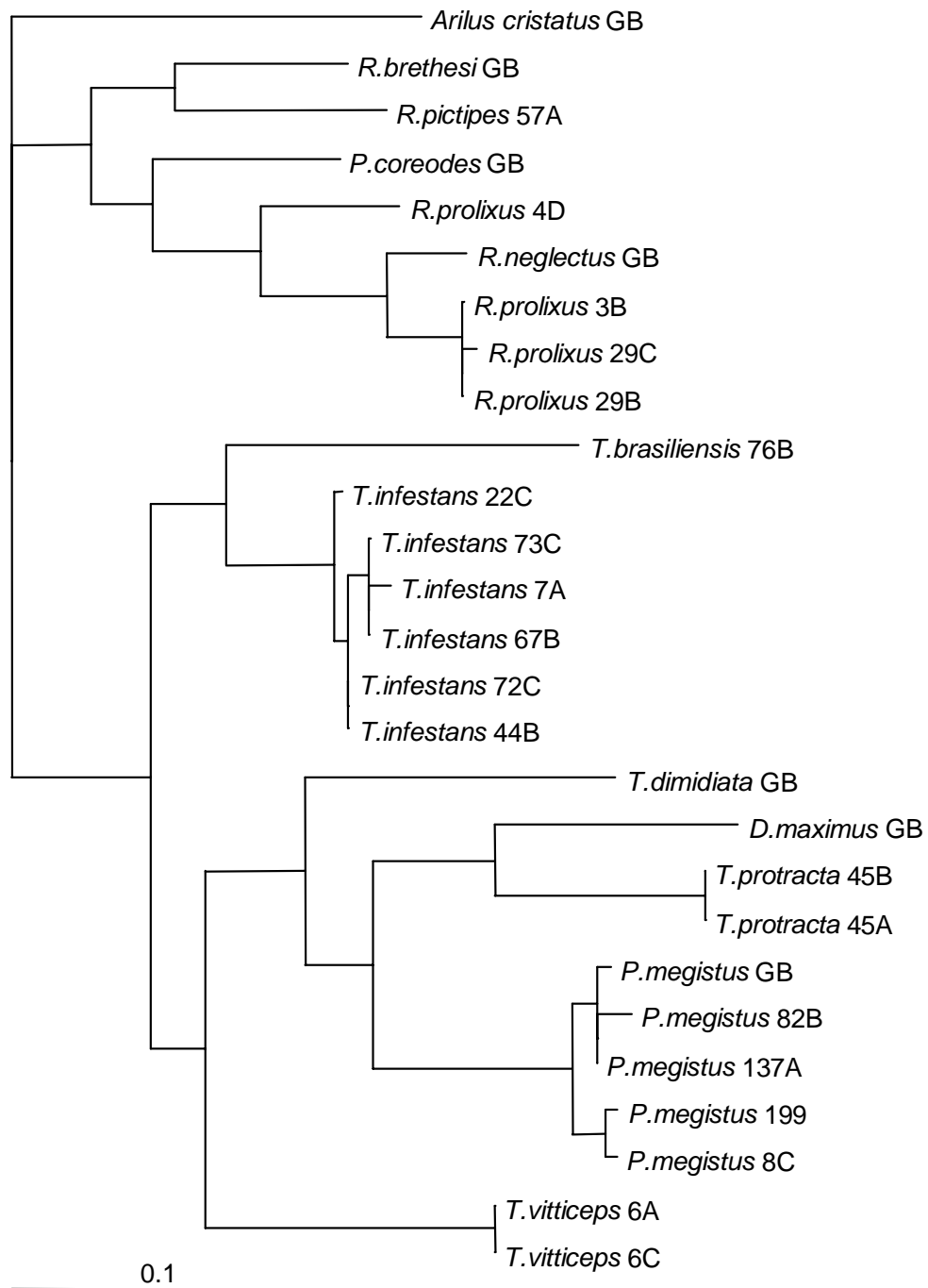


Figura 8. Árvore de Máxima Verossimilhança obtida por meio de fragmentos do gene CitB para Triatomíneos mantidos em colônias pelo insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara – SP (SESA) e disponíveis no GenBank.

É preciso ressaltar que a análise de Máxima Verossimilhança é considerada a mais confiável, entre os três métodos aqui utilizadas pois, apresenta menor probabilidade de erro, porque, além de examinar todas as filogenias possíveis, como faz a parcimônia, faz também estimativas e cálculos detalhados para todas elas (RIDLEY 2006).

Por isso, a presença de *T. protracta* em ramo basal aos Triatomini quando usado o gene 16S e de *T. vitticeps* basal ao ramo dos Triatomini Neárticos, com a inclusão de *P. megistus* no mesmo ramo, para o CitB (**Figs. 4; 8**) são relevantes, uma vez que, revelam afinidade genética entre esses táxons e sustentam a hipótese de derivação dos Triatomini Neotropicais a partir de linhagens ancestrais de Triatomini Neárticos, como exposto acima (PATTERSON et al. 2001, GAUNT e MILES, 2002; SCHAEFER 2003), que deve, no entanto, ser melhor avaliada futuramente.

Como pressuposto, as colônias do insetário do SESA de fato, constituem um acervo importante de material biológico a ser utilizado tanto em estudos sistemáticos clássicos, como morfologia, fisiologia, bionomia, etc, quanto em estudos por meio de técnicas moleculares. Porém, é necessário muito cuidado em relação às inferências feitas a partir de estudos com colônias, uma vez, que as mesmas podem conter erros de rotulagem ou de identificação (CARBAJAL DE LA FUENTE, 2007; SANTOS et al., 2007), possuir híbridos acidentais de populações distintas e/ou mesmo, espécies (BELISÁRIO et al., 2007; in press) e endogenia devido ao confinamento (GARCIA et al., 1995) que podem levar a erros de interpretação e comprometer os resultados da pesquisa.

VI. CONCLUSÕES:

- 1- Os genes 16S e CitB mostraram-se úteis para estudos filogenéticos e de genética de populações, pois permitiram a distinção entre populações geográficas (ou mesmo crípticas) dos grupos analisados;
- 2- O gene CitB revelou-se mais polimórfico do que o 16S na distinção das populações geográficas pela análise de distâncias genéticas. No entanto, apresentou maior grau de dificuldade para se obter amplicons adequados ao seqüenciamento e alinhamento;
- 3- Evidenciou-se a polifilia, em caráter entertribos e intratribos, da subfamília Triatominae, suportada pela parafilia observada tanto em *Rhodniini* quanto em *Triatomini* mostradas, tanto em caráter entretribos quanto intratribos, pela ocorrência de dois ramos distintos observados nos Gêneros *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma*;
- 4- Foi possível identificar possíveis erros de identificação ou rotulagem para as colônias de *R. robustus* (CTA-011); *R. prolixus* (CTA 004) e *R. prolixus* (CTA-029) e um erro real deste tipo par *T. maculata* (CTA-120) do SESA
- 5- Evidenciou-se a possível origem dos “*Triatomas*” Neotropicais a partir de derivações de *Triatomas* Neárticos, verificada pela estreita relação genética de *Panstrongylus* e *Triatoma vitticeps* com o ramo Norte-Centro Americano de *Triatoma*; por meio das relações com *T. protracta*, *D. maxima* e *T. dimidiata*;
- 6- Foi possível conseguir a primeira seqüência de bases nitrogenadas de fragmentos do gene 16S para *Triatoma sherlocki* Papa et al. 2002.

- 7- As análises filogenéticas com base em marcadores moleculares constituem importante ferramenta para resolução de questões sistemáticas dos diversos táxons. Porém, os conhecimentos da sistemática clássica como a morfologia, morfometria, ecologia, comportamento, entre outros, são indispensáveis para uma análise segura dos dados obtidos por estas técnicas.
- 8- Apesar dos problemas referidos como erros de rotulagem, formação acidental de híbridos ou mesmo homogenia genética (endogenia) que podem ocorrer, as colônias de triatomíneos do SESA revelaram-se importante fonte de material para estudos sistemáticos de triatomíneos, pois compreendem amostras significativas de várias populações triatomínicas da América, principalmente de espécies consideradas vetores principais do mal de Chagas como *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma brasiliensis*.
- 9- Algumas questões sistemáticas relativas a origem do relacionamento filogenético dos triatomíneos continuam em aberto. Talvez sejam necessários novos reagrupamentos dos membros deste grupo, para que a Subfamília continue válida. Para tanto, são necessárias análises mais completas, com a inclusão dos demais representantes da subfamília ainda não estudados: Alberproseniini, Bolboderini e Cavernicolini, outros marcadores moleculares, bem como, de caracteres oriundos da sistemática clássica, para decisões sistemáticas seguras.

VII. COMENTÁRIOS FINAIS

Os resultados desta Tese, quando vistos em conjunto aos obtidos em trabalhos precedentes, apesar de muito esclarecedores, ainda deixam em aberto muitas questões referentes ao relacionamento evolutivo da subfamília Triatominae.

Algumas destas questões referem-se, por exemplo, à origem desses insetos. As evidências aqui apresentadas sustentam a hipótese de origem polifilética proposta por SCHOFIELD (1988, 2000) e defendida por GORLA et al. (1997) e reforçada em trabalhos posteriores como MARCILLA et al. (2002), HYPŠA et al., 2002 e PAULA et al. (2005). Mas, não são conclusivas, pois as relações estabelecidas, por ambos os genes, também apontam para a uma origem dos Triatomini Neotropicais a partir de ancestrais Neárticos como posto anteriormente (Ver discussão). Se for assim, a hipótese monofilética sugerida por USINGER (1944) e apoiada por LENT e WIGODZINSKY (1979) ganhará novo fôlego.

Porém, como manter válida essa subfamília mediante aos resultados de PAULA et al. (2005) que, apesar de não conclusivos (segundo os próprios autores), refutam a hipótese de Rhodniini e Triatomini consistirem grupos-irmãos e sugerem claramente a origem polifilética desses insetos?

Outra questão em aberto reside na origem de *Linshcosteus*: Teriam os representantes deste gênero derivado diretamente de *T. rubrofasciata*, como mostram as filogenias de HYPŠA et al. (2002), PAULA et al. (2005) ou a partir de *T. lecticularia* como propõe PATTERSON et al. (2001)?

Contudo, ambos os autores admitem que esse evento evolutivo esteja relacionado a um processo de evolução rápida ocorrido entre os últimos três ou cinco séculos. Mas, a

origem de *Linshcosteus* pode ser mais antiga, a partir de um ancestral comum compartilhado com *T. rubrofasciata* ou outro “*Triatoma*” Neártico que tenha iniciado a sua dispersão da América do Sul para a massa de terra que constituí, hoje, a Índia e desta forma derivado por alopatria.

Os Triatomini da América do Sul são descendentes de linhagens de triatomíneos, ou de ancestrais não-triatomíneos, do hemisfério norte? Ou ainda, têm origem independente em relação a eles? Como mostram os trabalhos de SAINZ et al. (2004) e de PAULA et al. (2005). Assim sendo, poderemos no futuro nos referir aos “barbeiros” como membros de uma única subfamília?

Admitimos que certamente devam ser feitos novos arranjos na sistemática deste táxon. De certo, serão necessárias proposições novas para gêneros ou tribos, que permitam conciliar as parafilias de *Rhodnius* e *Triatoma*. Por exemplo, a revalidação do Gênero *Mestor* para a inclusão de *P. rufotuberculatus*, o mais divergente entre os representantes do gênero *Panstrongylus*, como mostrou o trabalho de SANTOS et al. (2003).

Concordamos com SCHAEFER (2003, 2005) e PAULA et al. (2005) ao admitir que somente a análise cladística poderá solucionar as questões, ainda em aberto, das relações filogenéticas e do caminho evolutivo dos aqui considerados Triatominae mas, que são necessários novos testes, mais “robustos”, em que sejam incluídos representantes dos demais gênero, até agora não testados, para tomarmos uma decisão sistemática mais adequada.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Franch F, Monteiro FA, Patterson JS and Miles MA. 2003. Phylogenetic relationships among members of the Pacific *Rhodnius* lineage (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 2: 244–245.
- Abad-Franch F, Monteiro FA. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2005; 77(3): 437-454
- Abalos JW. Sobre híbridos naturales y experimentales de *Triatoma*. *An. Inst. Med. Reg., Tucuman* 1948, 2(2): 209-223.
- Abalos JW, Wygodzinsky P Las Triatominae argentinas. *Mon. 3 Inst. Méd. Reg. Pub. N° 601*; 1951
- Akhavan D. Análise de custo efetividade do Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil: relatório final. Dariush Akhavan. – Brasília: Programa de desenvolvimento de recursos humanos / OPAS. 1998; 271 P.
- Arcoverde CAC. Surtos de Doença De Chagas de Provável Transmissão Oral: uma análise de possibilidades. Disponível em: www.sbac.org.br/qualinews.htm. [Consultado em 16/10/07].
- Aufderheid AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE, Fornaciari G, Allison M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Nat. Acad. Science* 2004; 101(7): 2034-2039.
- Avise JC. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York, NY, USA, 1994, 511p.

- Barata JMS. Aspectos morfológicos dos ovos do gênero *Rhodnius* Stål 1859 (Hemiptera, Reduviidae) e sua importância na identificação específica. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 1979.
- Barata JMS, Santos JFL, Leite CAP. Aspectos morfológicos de ovos de Triatominae. Mensuração de dez espécies de gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). Rev Bras Entomol 1980; 24: 197-214.
- Barata JMS, Santos JFL, Leite CAP. Aspectos morfológicos de ovos de Triatominae. II. Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). Rev Saúde Pública 1981; 15:490- 542.
- Barata JMS, Rosa JÁ da, Barata EAM, Urbinati PR. Aspectos macroscópicos e exocoriais de ovos em oito gêneros da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). IX Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, Uberaba, MG 1993 [Resumo]. Rev Bras Med Trop 1993 Supl 2; 95-6.
- Barata JMS, Rosa JA da, Urbinatti PR, Ceretti Jr. W, Marassá AM, Barreiros RM de OV, Andrade RMG de, Serra OP. Processo do I urotergito, nova estrutura para a identificação genérica e específica em Triatominae. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia, 1-4 de agosto de 1995 [Resumos]. Rev Patol Trop 1994a; 23 Supl 2: 216.
- Barata JMS, Rosa JA da, Ceretti Jr. W, Urbinatti PR, Freitas Barata EAM de. Aspectos morfológicos de ovos em nove gêneros de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Rev Patol Trop 1994b; 23 Supl 2: 217.

- Barata JMS. Aspectos morfológicos de huevos de Triatominae. Taller Internacional sobre Genética Poblacional y control de triatomíneos. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador 24- 28 de septiembre de 1995. p. 3-58.
- Barata JMS, Rosa JA da, Urbinatti PR, Ceretti Jr. W, Marassá AM, Barreiros RM de OV, Andrade RMG de, Souza RP de, Mazzuia ETA. Diferenciação entre *Rhodnius prolixus* Stål 1859 e *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 através da utilização do processo do I urotergito (Hemiptera, Reduviidae). In: XXXII Congresso da SBMT, Goiânia, GO de 3-7 de março de 1996a [Resumos]. Rev Soc Bras Med Trop 1996a; 29(Sup 1): 140-141.
- Barata JMS, Rosa JA da, Urbinatti PR, Ceretti Jr. W, Marassá AM, Barreiros RM de OV, Andrade RMG de, Souza RP de. Characterization of *Triatoma infestans* Klug, 1834 and *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) by means of the I urotergite process through scanning electron microscopy. In: XII Meeting of Brazilian Society of Protozoology, XXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease. Caxambu, MG, 5-8 November 1996b [Resumos]. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996b; 91 Supl: 126.
- Barata JMS, Rosa JA da, Urbinatti PR, Ceretti Jr. W, Marassá AM, Barreiros M de OV, Andrade RMG de, Souza RP de. Characterization of *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 and *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 (Hemiptera, Reduviidae) by means of the I urotergite process through scanning electron microscopy. In: XII Meeting of Brazilian Society of Protozoology, XXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease. Caxambu, MG, 5-8 November 1996 [Resumos]. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996c; 91 Supl.: 127.

- Barata JMS. Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae). Estruturas macroscópicas e exocoriais de ovos de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) 1998a. Vol. II, pp. 409-448. In: RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent - orgs.). Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas, Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ
- Barata JMS, Rosa JA da, Urbinatti PR, Ceretti Jr W, Andrade RMG de, Marassá AM. Characterization of the I urotergito process in *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 through scanning electronic microscopy and optic microscopy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1998b; 93 (supl.): 326.
- Barata JMS, Rosa JA da, Urbinatti PR, Ceretti Jr. W, Andrade RMG de, Marassá AM. Characterization of the urotergito process in *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma rubrovaria* Neiva, 1913 through scanning electronic microscopy and optic microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998c; 93 Supl: 327.
- Barata JMS, Rosa JA da, Urbinatti PR, Ceretti Jr. W, Marassá AM, Barreiros RM de OV, Andrade RMG de. Characterization of the I urotergito process in *Triatoma delpontei*, Romaña & Abalos, 1947 and *Triatoma platensis* Neiva, 1913 through electronic microscopy and optic microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94 Supl 2: 246.
- Barbosa SE, Diotaiuti L, Soares RPP, Pereira MH. Differences in saliva composition among three Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae). Acta Tropica 1999, 72: 91-98.

- Barbosa SE, Soares RPP, Pires HHR, Diotaiuti L. Experimental evidence for a demographic cline in *Panstrongylus megistus* populations. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2001, 96: 773-775.
- Barbosa SE, Dujardain JP, Soares RPP, Pires HHR., Margonari C, Romanha AJ, Panzera F, Linardi PM, Duque-de-Melo M, Pimenta PFP, Pereira MH, Diotaiuti L. Interpopulation Variability Among *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) from Brazil. J. Med. Entomol. 2003, 40(4): 411-420.
- Barbosa SE, Diotaiuti L, Braga EM, Pereira MH. Variability of the salivary proteins of 20 Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Acta Tropica 2004, 92 25–33
- Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RCM, Paula AS, Pedro M. Linardi PM, Álvaro J. Romanha AJ, Diotaiuti L. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. Acta Tropica 2006; 99(2-3): 144-154.
- Bargues MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz . 2000; 95(4): 567-573.
- Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Mas-Coma S. Triatominae vectors of *Trypanosoma cruzi*: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 2002; 96(supl.1): 159-164.
- Bargues, M. D.; Klisiowicz, D. R.; Panzera, F.; Noireau, F.; Marcilla, A.; Perez, R.; Rojas, M. G.; O'Connor, J. E. ; Gonzales-Candelas, R.; Galvão, C.; Jurberg, J.;

- Carcavallo, R.U.; Durjardin, J. P. & Mas-Coma, S. 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infection, Genetics and Evolution* 6:42-62.
- Barretto MP. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1976, 10:339-353.
- Barretto MP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA (eds.) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1979. p 89 – 291.
- Barretto MP. Reservatórios del *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Chagas, 1909. In: Carcavallo RU, Rabinovich JE e Tonn RJ. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas: Tomo II – Parasitos – Reservorios – Control – Situation Regional. *Chagas* 1985; 3: 275-288.
- Belisário CJ, D’avila GCP, Diotaiutti L. Biological aspects between the crosses between *T. maculata* (Erichson, 1848) and *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2007 (In press).
- Bérenger JM, Blanchet D. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2007, 102(6): 733-736.
- Braga MV, Meirelles M de N, Brazil RP. Massive experimental inoculation of *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Rhodnius neglectus* Lent 1954 (Hemíptera, Reduviidae) and *Mus musculus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998; 93(4): 555-557.

- Brenière SF, Bosseno MF, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Noel S, Dujardin JP e Tibayrenc M. Smallness of the panmictic unit of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol 1998; 35: 911–917.
- Brenière SF, Taveira B, Bosseno MF, Ordoñez R,-Kasten FL, Magallón-GE, Ouaiissi A, Ramsey J. Preliminary Results of Random Amplification of Polymorphic DNA among Triatominae of the phyllosoma Complex (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(8): 1033-1038.
- Cahet DMB, Carcavallo RU, Barbosa HS, Jurberg J. Estudo morfológico das asas de *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 (Hemiptera- Reduviidae- Triatominae), vistas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.) e Óptica. Entomol Vect 1999; 6(3): 236- 263.
- Caldas Junior AL Epidemiologia e controle da doença de Chagas: Relação com a estrutura agrária na Região de Sorocaba, SP. {Dissertação de Mestrado} - São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1980.
- Carbajal de la Fuente AL and Catalá S. Relationship between antennal sensilla pattern and habitat in six species of Triatominae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2002; 97: 1121-1125.
- Carbajal de la Fuente AL. Ecogenética comparativa das espécies afins de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 e *T. wygodzinskyi* Lent, 1951 (Hemiptera, Reduviidae). [Tese de doutorado] – Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, 2007.

- Carbajal de la Fuente AL, Noireau F; Catalá SS. Inferences about antennal phenotype: the "maculata complex" (Hemiptera: Reduviidae) is valid? *Acta Tropica* 2008; (no prelo).
- Carcavallo RU. Sinopsis epidemiológica de la enfermedad de Chagas. In: Carcavallo, RU, Rabinovich JE, Tonn, RJ. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas: Tomo I – Epidemiología – Vectores. Chagas 1985; 2: 19-20.
- Carcavallo, RU, Galindez- Girón, I, Martínez, A, Jurberg, J. Cuticular structures of Triatominae. Their taxonomic significance. *Entomol Vect* 1994; 1(2): 79-91.
- Carcavallo, RU, Galindez- Girón, I. Systematic value of the scutellum in Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol Vect* 1995; 2(1): 23-29.
- Carcavallo RU, Girón IG, Catalá S, Jurberg J, Lent H, Galvão C, Barata JMS. Algumas estruturas anatômicas estudadas com Microscopia Eletrônica de Verredura (MEV). In: Carcavallo, RU, Galindez- Girón, I, Martínez, A, Jurberg, J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997.
- Carcavallo RU; Galíndez-Gíron 1; Jurberg J; Galvão C; Noireau F; Canale DM. 1998, vol II, 515-536. Mutations, hybrids and teratologies. In: Carcavallo, RU, Galindez- Girón, I, Martínez, A, Jurberg, J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Carcavallo RU, Rodriguez MEF, Salvatella R, Curto de Casas SI, Dherloch I, Galvão C, Rodcha ES, Galindez Girón I, Arocha MAO, Martinez A, Rosa JA, Canale DM, Farr TH, Barata JMS, 1998, vol. II, p. 561-600. Habitat and related fauna. In: In: Carcavallo, RU, Galindez- Girón, I, Martínez, A, Jurberg, J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Fiocruz, Rio de Janeiro.

- Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H. Phylogeny of the Triatominae. Filogenia dos Triatomíneos 1999. Vol. III, pp. 925-969. In: RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent - orgs.). Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Carcavallo R.U., Jurberg J., Lent H., Noireau F., Galvão C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. Entomologia y Vectores 2000, 7(supl. 1): 1-99.
- Carcavallo, RU, Jurberg J, Lent H, Galvão C, Steindel M, Pinto CJC. Nova espécie do complexo *oliveriai* (nova denominação para o complexo *matogrossensis*) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(1): 77- 79.
- Carlier L, Muñoz M, Dujardin JP. 1996. ARAPD protocol for Triatominae, p. 81-83 in (Schofield CJ, Dujardin JP and Jurberg J (Eds)), Proceedings of the International Workshop on population genetics and control of Triatominae, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, INDRE, Mexico City, Mexico.
- Catalá S & Schofield CH. Antennal sensilla of *Rhodnius*. J Morphol 1994; 219: 193-203.
- Catalá S. Sensilla associated with the rostrum of eight species of Triatominae. J Morphol 1996; 228: 195- 201.
- Catalá S. Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): a comparative study of five genera. Int J Insect Morphol Embriol 1997; 26(2): 67- 73.

- Catalá S and Dujardin JP. Antennal sensilla patterns indicate geographic and ecotopic variability among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations. J. Med. Entomol. 2001; 38: 423-428.
- Catalá S, Sachetto C, Moreno M, Rosales R, Salazar-Schetrino PM, Gorla D. Antennal phenotype of *Triatoma dimidiata* populations and its relationship with species of phyllosoma and protracta complexes. J. Med. Entomol. 2005; 42:, 719-25.
- Ceretti Junior. W. Estudos sobre domiciliação espontânea em galinheiros experimentais por população silvestre de triatomíneos no município de Araraquara, São Paulo, no período de XI/1998 a III/2002. [Dissertação de mestrado] – São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2003.
- Cerqueira RL. Estudos Sobre População de Triatomíneos Silvestres Encontrados em Santo Inácio – Bahia. [Tese de Doutorado] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1982.
- Chagas CRJ. Nova tripanozomíase humana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; 1: 159-219
- Chavez T, Moreno J, Dujardin JP. Isoenzyme electrophoresis of *Rhodnius* species: a phenetic approach to relationships within the genus. Ann Trop Med Parasitol 1999; 93(3): 299-307.
- Correia RR e Espínola HN. Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de Triatomíneo de Sobral, Ceará. Arq. Hig. Saúde públ. 1964; 29: 115-127.
- Costa JM, Jurberg J, Barth MO. Estudos morfológicos de *Cavernicola lenti* Barreto & Arias, 1985 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1991; 86(2): 247- 263.

- Costa J, Argolo AM, Felix M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* .2006; 1385: 47–52.
- Costa J, Felix M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(1):87-90.
- Costa Lima AM. Hemípteros. In: Costa Lima AM. *Insetos do Brasil*, v.2. Rio de Janeiro. Escola Nacional de Agronomia; 1940. 351 pp.
- Coura JR, Feranadéz O, Arboleda M, Barret TV, Carrara N, Degrave W, Campbell DA. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996; 90: 278-279.
- Crossa RP, Hernández M, Caraccio M N, Rose V, Valente SAS, Valente VC, Mejía JM, Angulo VM, Ramírez CMS, Roldán J, Vargas F, Wolff M, Panzera F. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution* 2 (2002) 47–56.
- De Geer C. *Mémoires pour servir à l’histoire des insectes*. V. Stockholm, 1773, 448 pp.
- Del Ponte E. Algunas especies nuevas del gèn. *Triatoma* Laporte. *Bol. Soc. Ent. Arg.* 1929, 1(4): 3-8.
- Del Ponte E, Catalogo descriptivo de los géneros *Triatoma* Lap., *Rhodnius* Stal e *Eratyrys* Stal. *Rev. Inst. Bacteriol. Dep. Nac. Higiene* 1930, 5: 855-937.
- DeSalle R, Freeman T, Prager EM, Wilson AC. Tempo and mode of sequence variation in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Evolution* 1987; 42: 1076–1084.
- Dias JCP e Dias RB. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. *Ciência e Cultura* 1979; 31(supl.): 105-117

- Dias JCP. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today* 1987; 3(11): 336-341.
- Dias JPC. Doença de Chagas no Brasil - situação atual e perspectivas. *Inf Epidemiol SUS* 1992; 1: 17-32.
- Dias JCP. Problemas e possibilidades de participação comunitária no controle das grandes endemias no Brasil. *Cad. Saúde Públ.* 1998; 14 Suppl 2: 19-37.
- Dias JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral- Netto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2^a ed., 2000, p. 48-74.
- Dias, JCP. Doença de Chagas, ambiente, participação e Estado. *Cad Saúde Pública* 2001; 17 Supl: 165-169.
- Dias JCP. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cad. Saúde Públ.* 2006a; 22 (10): 2020-2021.
- Dias JPC. 2006b. Descentralización y enfermedad de Chagas, Brasil, 2005. In: Descentralização e gestão do controle das enfermidades transmissíveis na América Latina (Yadón, Zaida – ed.). OPS, Buenos aires, Argentina;320 pp.
- Dias JPC, Schofield CJ. The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(supl. 1): 103-121.
- Dias JPC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin América. A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1002; 97: 603-612.
- Dobzhansky T. *Genetics and the Origin of species.* Columbia University Press. 1951

- Dotson EM e Beard CB. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Molecular Biology*, 2001; 10(3): 205–215.
- Dujardin JP, Bermudez H, Schofield CJ. The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Tropica* 1997a; 66: 145- 153.
- Dujardin JP, Bermudez H, Casini C, Schofield CJ, Tibayrenc M. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol* 1997b; 34(5): 544- 551.
- Dujardin JP, Torrez EM, Le-Pont F, Hervas D, Sossa D. Isozymic and metric variation in the *Lutzomyia longipalpis* complex. *Med Vet Entomol* 1997c; 11: 394-400.
- Dujardin JP, Muñoz M, Chavez T, Ponce C, Moreno J and Schofield CJ. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Med Vet Entomol* 1998a; 12: 113–115.
- Dujardin JP, Schofield CJ and Tibayrenc M. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Med Vet Entomol* 1998b; 12: 20–29.
- Dujardin JP. Introducción a la morfometria com énfasis en Triatominae Phlebotominae. [monograph on line]. 1999. available in <URL: <http://eclat.fcien.edu.uy>>. [2002 Maio 31].
- Dujardin JP, Panzera P. E Schofield C. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1999; 94(supl. 1): 223-228.

- Dujardin, J.P. Schofield, C.J. e Panzera, F. 2000. Les Vecteurs de la Maladie de Chagas. Recherches taxinomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Classe des Sciences naturelles et médicales, N.S. 24 (5), 162 pp.
- Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop.* 2000; 75: 79-84.
- Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde públ* 1980; 14: 265-99.
- Forattini OP. *Culicidologia Médica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1996. v.1.
- Forero, D., Weirauch, C. & Baena, M. (2004) Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator*. (Klug, 1830) *Zootaxa*, 670,1–12. Disponível em www.mapress.com/zootaxa
- Frías D e Dujardin JP. 1996. Detección de la variación genética a nivel poblacional a través de electroforesis de isoenzimas, p. 65-71 in (Schofield CJ, Dujardin JP and Jurberg J (Eds)), *Proceedings of the International Workshop on population genetics and control of Triatominae*, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, INDRE, Mexico City, Mexico.
- Galíndez-Girón I, Torres E. Morphometry in the systematics and ecology of the Triatominae. *Morfometria na sistemática e ecologia dos Triatominae* 1999. Vol. III, pp. 1115-1160. In: RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent - orgs.). *Atlas*

of Chagas' disease vectors in the Americas. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Galvão, C. A sistemática de Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Veterinaria. VII Jornadas de Zoología del Uruguay, 13-17 de octubre de 2003, Montevideo Uruguay. Entomología y Vectores 2003; 10(4): 511-530.

Galvão C, Carcavallo RU, Rocha D da S, Jurberg J. A checklist of the current valid species of subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa 2003, 202: 1-36. Disponível em www.mapress.com/zootaxa.

Galvão C, Patterson JS, Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU, Rajen K, Ambrose DP, Miles MA. A new species of Triatominae from Tamil Nadu, India. Med. Vet. Entomol. 2002; 16(1): 75-82.

Galvão C, Carcavallo RU, Rocha D da S, Jurberg JA checklist of the current valid species of subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa 2003; 202: 1-36. Disponível em www.mapress.com/zootaxa.

Galvão C, Angulo VM. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia Zootaxa 2006; 1241: 61–68. Disponível em www.mapress.com/zootaxa.

Galtier N, Gouy M. Inferring phylogenies from DNA sequences of unequal base composition. Proc Nat Acad Sci USA 1995; 92: 11317–11321.

- García AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Valente SAS, Frame IA, Stothard JR and Miles MA. Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 1998; 35: 38–45.
- Garcia BA, Powell J. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Medical Entomology* 1998; 35(3): 232-238.
- Garcia B.A. Moriyama E.N. and Powell J. R. 2001. Mitochondrial DNA sequences of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. *Journal of Medical Entomology* 38(5): 675-683.
- Garcia BA, Manfredi C, Fichera L, Segura EL. Short report: Variation in mitochondrial 12S and 16S Ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(6): 692–694.
- Gaunt MW, Miles MA. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2000, 95:557–565.
- Gaunt MW, Miles MA. An Insect Molecular Clock Dates the Origin of the Insects and Accords with Palaeontological and Biogeographic Landmarks. *Mol. Biol. Evol.* 2002, 19(5):748–761.
- Gonçalves TCM, Jurberg, J, Costa JM e Souza W de. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviinae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1985, 80(3): 263-276.

- Gonçalves TCM, Lent H, Almeida JR. Estudo anatômico e morfométrico dos folículos testiculares de algumas espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82(4):543-550.
- Gorla DE, Jurberg J, Catalá SS, Schofield CJ. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1993; 88(3): 379- 385.
- Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ. Biosystematics of Old World Triatominae. Acta Tropica 1997; 63: 127-140.
- Grant IH, Gold JW, Winter M. Transfusion associated acute Chagas' disease acquired in the United States. Ann. Inter. Med. 1987; 111: 849-851.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitology 1999; 118:375-82.
- Guhl F and Schofield CJ. Population genetics and control of Triatominae. Parasitol Today 1996; 12: 169–170.
- Guhl F, Jaramillo N, Carranza JC, Vallejo GA. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Arch. Med. Res. 2002; (33): 362-370.
- Guhl F, Jaramillo N, Vallejo GA, Yockteng R, Cardenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriza B, Aufderheide C. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year old mummified human tissue from Northern Chile. Am. J. Phys. Antrop. 1999; (108): 401-407.
- Guhl F e Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera 1920 – An updated Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2003; 98(4): 435-442.

- Harry M, Galindez I, Cariou ML. Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. *Med Vet Entomol* 1992; 6: 37-43.
- Harry M. Isozymic data question the specific status of blood- sucking bugs of genus *Rhodnius*, vectors of Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 492.
- Harry M. Morphometric variability in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *JPN Gen.* 1994; 69(3): 233-50.
- Harry M, Moreno G, Goyffon M. Genetic variability in populations of *Rhodnius prolixus*, vector of Chagas disease in Venezuela. *Evol Biol.* 1992; 6: 175–194.
- Hey J. The mind of the species problem. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 2001; 16(7): 326-329.
- Hypša V, Tietz, D.F., Zrzavy, J., Rego, R.O.M., Galvao C.and Jurberg J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2002; 23: 447–457
- Jaramillo C, Montaña MF, Castro LR, Vallejo GA, Guhl F. Differentiation and Genetic Analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD Amplification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(8): 1043-1048.
- Jurberg J. Ferramentas usadas em taxonomia de triatomíneos: o uso múltiplo. II Encontro Nacional de Entomologia Médica y Veterinaria. In: VII Jornadas de Zoología del Uruguay, 13 – 17 de octubre de 2003, Montevideo, Uruguay. *Entomologia y Vectores* 2003; 10(4): 497 –509.

- Jurberg J, Fagundes LM de, Barth OM. Estudo morfológico de ovos e ninfas de *Dipetalogaster maxima* (Uhler 1894) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1993; 86(2): 269- 283.
- Jurberg J, Campos P. Morfologia de huevos e ninfas de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859)(Hemiptera - Reduviidae). Entomol Vect 1995; 2(1): 9-22.
- Jurberg J, Silva MBA, Galvão C, Silva- Rocha D da, Barbosa HS, Carcavallo RU. Descrição dos ovos e dos estádios ninfais de *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 vistos através de microscopia óptica e eletrônica de varredura (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97(2): 209- 216.
- Justino HHG. Variabilidade da Região ITS 2 do DNA Ribossomal de *Triatoma arthurneivai* (Lent & Martins, 1940) e *Triatoma tibiamaculata* (Pinto 1935) avaliada por RFLP. [Dissertação de mestrado] – Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, 2004.
- Kirchhoff LV, Gam AA, Gillam F. American trypanosomiasis (Chagas disease) in Central American immigrants. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 1987; 82: 915-920.
- Lainson R, Shaw JJ, Frahia H, Miles MA, Draper CC. Chaga's disease in Amazon Basin I. *Trypanosoma cruzi* infections in silvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. Trans Royal Soc Med Trop Hyg 1979; 73(2): 193-204.
- Lent H, Jurberg J. Ogênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Bras Biol 1965; 25(4): 349-376.

- Lent H, Jurberg J. Algumas informações sobre *Triatoma spnolai* Porter, 1934, com um estudo sobre as genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae). Rev Bras Biol 1967, 27(3): 273:288.
- Lent H, Jurberg J. Estudo morfológico comparativo de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e suas genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Bras Biol 1968, 28(4): 499:520.
- Lent H, Jurberg J. O gênero *Cavernicola* Barber, 1937, com um estudo sobre a genitália externa (Hemiptera, Reudiidae, Triatomiane). Rev Bras Biol 1969a, 29(3): 317:327.
- Lent H, Jurberg J. O Gênero *Rhodnius* Stal, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera- Reduviidae- Triatominae). Rev Bras Biol 1969b; 29(4): 487-560.
- Lent H, Jurberg J. O Gênero *Eratyrus* Stal, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Bras Biol 1970; 30(2): 297-312.
- Lent H, Jurberg J. O Gênero *Paratriatoma* Barber, 1938, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Bras Biol 1971; 31(4): 39-48.
- Lent H, Jurberg J. O Gênero *Panstrongylus* Berg, 1879, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera- Reduviidae- Triatominae). Rev Bras Biol 1975; 35(3): 487-560.
- Lent H, Jurberg J. Estudo comparativo da genitália externa masculina de seis espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 que mais frequentemente habitam o domicílio humano no Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Rev Bras Biol 1978; 38(4): 931- 944.

- Lent H, Jurberg J. Comentários sobre a genitália externa masculina em *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera, Reduviidae). Rev Bras Biol 1980; 40(3): 611- 627.
- Lent H, Jurberg J. A genitália externa dos machos no complexo *Triatoma phyllossoma* (Burm.), espécies mexicanas transmissoras da doença de Chagas (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1982; 77(3): 299- 317.
- Lent H, Jurberg J. Estudo comparativo da genitália externa masculina de seis espécies de *Linshcosteus costali* Ghauri e *L. kali* Lent & Wygodzinsky (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1983; 78(4): 421- 429.
- Lent H, Jurberg J. A genitália externa na tribo Bolboderini (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1984; 79(1): 1- 27.
- Lent H, Jurberg J. Sobre a variação intra-específica em *Triatoma dimidiata* (Latreille) e *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80(3): 285-299.
- Lent H, Jurberg J. A genitália externa dos machos de sete espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 da região Neártica (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82(2): 227-246.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Amer Museum Nat Hist 1979; 163(3): 123-520.
- Lorosa ES, Jurberg J, Souza ALA, Vinhaes MC, Nunes IM. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859). Entomología y Vectores 2000; 7(3): 287-296

- Loxdale HD and Lushai G. Molecular markers in entomology. *Bull Entomol Res.* 1998; 88: 577–600.
- Lyman de, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DN, Dujardin JP, Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999; 60(3): 377-386.
- Marcet PL, Lehmann T, Groner G, Gürtler RE, Kitron U, Dotson EM. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 2006, 6:32-37.
- Marcilla A, Canese N, Acosta E, López A, Rojas de Arias A, Bargues MD and Mas-Coma S. Populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Paraguay: a molecular analysis based on the second internal transcribed spacer of the rDNA. *Res Rev Parasitol* 2000; 60: 99–105.
- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallón-Gastélum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ and Mas-Coma S. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet. Evol.* 2001; 18: 136–142.
- Marcilla A., Bargues M.D., Abad-Franch F., Panzera F., Carcavallo R.U., Noireau F., Galvão C., Jurberg J., Miles M.A., Dujardin J.P., Mas-Coma S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae:

Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. Infection, Genetics and Evolution 2002; 1: 225-235.

Marcondes CB. Entomologia médica e veterinária. São Paulo: Atheneu; 2001.

Martínez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Benigno V, Vidaurre P. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolívia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. Bol. Inst. Invest. Salud y Desarrollo 2007; 3(1): 1-10.

Martínez FH, Alejandre-Aguilar R, Moncada YH, Espinoza B. Molecular taxonomic study of Chagas disease vectors from the *Phyllosoma*, *Lecticularia* and *Rubrofasciata* complexes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005; 73(2): 321–325.

Martínez FH, Villalobos GC, Cevallos AM, De la Torre P, Laclette JP, Alejandre-Aguilar R, Espinoza B. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 2006; 4(1): 279–287.

Matias A, Riva de la JX, Torrez M, Dujardin JP. *Rhodnius robustus* in Bolívia identified by its wings. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(7):947-950.

Mayr E. Populações, espécies e evolução. Tradução de Hans Reichardt. São Paulo, Ed. Nacional, EDUSP. 1977.

Mayr E, Linsley EG, Usinger RL. Methods and Principles of Systematic Zoology. New York, McGraw-Hill Book Co. 1953.

- Mejia JM, Galvão C, Jurberg J. *Rhodnius colombiensis* sp. n. da Colômbia, com quadros comparativos entre estruturas fálicas do Gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol. y Vectores* 1999, 6(6): 601-617.
- Miles MA, Souza AA de, Povoá M. Chagas disease in the amazon basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. *J Med Entomol* 1981; 18: 266-278.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Técnica: Doença de Chagas Aguda, 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas_091007.pdf.
- Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (Suppl. 1): 401-404.
- Monroy C., Rodas A., Mejía M., Rosales R., Yuichiro Tabaru. Epidemiology of Chagas Disease in Guatemala: Infection Rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2003; 98(3): 305-310
- 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*, Rio de Janeiro, 1999; 94(Suppl. I): 229-238.
- Monterio 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* .2000; 62(4): 460-465.
- Monteiro F.A., Escalante A.A. & Ben Beard C. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends in Parasitology* 2001; 17 (7): 344-347.
- Monteiro FA, Lazoski C, Noireau F and Solé-Cava AM. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini, showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. *Med Vet Entomol* 2002; 16: 83–90.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordón-Rosales C, Feliciangeli D and Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 2003; 12: 997–1006.
- Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB and Costa J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 2004; 32: 46–56.
- Moreno AR e Carcavallo RU. Enfoque ecológico para epidemiologia da doença de Chagas. In: *Atlas of Chagas Disease Vectors on the Americas*. Ed. R.U. Carcavallo, I.G. Girón, J. Jurberg & H. Lent, Vol. III. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro; 1999.
- Moreno ML, Gorla D, Catalá S. Association between antennal phenotype, wing polymorphism and sex in the genus *Mepraia* (Reduviidae: Triatominae). *Infections, Genetics and Evolution*, 2006; 6:228-234.
- Neagele MP, Costa PI da , Rosa JA da. Polymorphism of the ITS-2 region of the ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. *Medical and Veterinary Entomology* 2006; 20, 353–357.

- Nei M. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 1972; 106: 283-292.
- Neiva A. Contribuição ao estudo dos hematophagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de *Triatoma*. *Brazil-Medico* 1911; 25(4): 461-462.
- Neiva A. Revisão do gênero *Triatoma* Lap. Thesis, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro, 1914. 80 pp.
- Neiva A, Pinto C. Estado atual dos conhecimentos sobre o gênero *Rhodnius* Stal, com a descrição de uma nova espécie. *Brazil-Medico* 1923a; 37(1): 20 - 24.
- Neiva A, Pinto C. Dos reduvidos hematophagos encontrados no Distrito Federal e Estado de Rio de Janeiro com descrição de uma especie nova. *Brazil-Medico* 1923b; 37(1): 45 - 47.
- Neiva A, Pinto C. Dos hemipteros hematophagos encontrados do Norte do Brazil com a descrição de duas novas especies. *Brazil-Medico* 1923c; 37(1): 73 - 76.
- Neiva A, Lent H. Notas e commentarios sobre triatomideos. Lista de espécies e sua distribuição geographica. *Rev. Entomol.* 1936; 6(2): 153-190.
- Neiva A, Lent H. Sinopse dos Triatomideos. *Rev. Entomol.* 1941; 12(1-2): 61-92.
- Noireau F, Gutiérrez T, Zegarra M, Flores R, Breinière SF, Cardozo L and Dujardin JP. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from Bolivia Chaco. *Trop Med Int Health* 1998; 3: 364-372.
- Noireau F, Zegarra M, Ordóñez J, Gutiérrez T and Dujardin JP. Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia: application on control interventions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 347-351.
- Noireau F, Bastrenta B, Catalá S, Dujardin JP, Panzera F, Torrez M, Perez R, Galvão C, Jurberg J. Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from

field collection to characterization. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000a; 95 Supl 1:119-122.

Noireau F and Dujardin JP. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *T. guasayana*. Mem Inst Oswaldo Cruz . 2001; 96: 385–389.

Noireau F, Flores R, Gutiérrez T, Abad-Franch, Flores E and Vargas F. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000b; 94: 23–27.

Noireau F, Rojas Cortez MG, Monteiro F, Jansen AM and Torrico F.. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? Trends Parasitol 2005; 21: 7–10.

Obara MT. Estudo de ovos de dez espécies da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). [Dissertação de Mestrado] – São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo 2003.

Obara MT, Barata JMS, Silva NN da, Ceretti Jr. W, Urbinatti PR, Rosa JÁ da, Jurberg J, Galvão C. Estudo de ovos de quatro espécies do gênero Meccus (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vetores da doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007a; 102(1): 13-19.

Obara MT, Rosa JA da, Ceretti Jr W, Urbinatti PR, Osório Quintero L, Barata JMS, 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 Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007b; 102(4): 463-468.

- Obara MT, Rosa JA da, Silva NN da, Ceretti Jr. W, Urbinatti PR, Barata JMS, Jurberg J, Galvão C. Estudo Morfológico e Histológico dos Ovos de Seis Espécies do Gênero *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology* 2007c, 36(5):798-806.
- Osorio-Quintero L. Avaliação do valor sistemático do Processo do I Urotergito em machos de onze espécies de da subfamília Triatominae (Hemíptera, Reduviidae). [Tese de Doutorado] – São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo 2002.
- Osório-Quintero L, Barata JMS, Rosa JÁ da, Ceretti Jr W, Urbinatti PR, Papa AR, Obara MT, Galvão C, Jurberg J. Valor Sistemático do processo do I urotergito em Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) I. Estudo morfológico de nove espécies de *Triatoma*. *Rev. Bras. Entomol.* 2007 (no prelo).
- Pacheco RS, Alameida CE, Costa J, Klisiowicz DR, Mas-Coma S e Bargues MD., RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2003; 97(7):757–768,
- Paláu Castaño MT, Montilla Moreno M, Zúñiga Martí CA. Estudio del comportamiento de dos cepas de *Trypanosoma rangeli*. *MedUnab* 2001; 4 (12): 161-167.
- Panzera F, Pérez R, Hornos S, Panzera Y, Cestau R, Delgado V, Nicolini P. Chromosome Numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 1996; 91(4): 515-518.
- Panzera F, Dujardin JP, Nicolini P, Caraccio MN, Rose V, Tellez T, Bermudez H, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE, Pérez R, Genomic changes of Chagas disease vector, South America, *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(3): 438–446.

- Panzera F, Ferrandis I, Ramsey, J, Ordóñez R, Salazar-Schettino PM, Cabrera M, Monroy MC, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE, Angulo VM, Jaramillo N, Cordón-Rosales C, Gómez D, Pérez R. Chromosomal variation and genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Tropical Medicine and International Health* 2006; 11(7) : 1092–1103.
- Papa AR, Jurberg J, Carcavallo RU, Cerqueira RL, Barata JMS. *Triatoma sherlocki* sp. n. coletada na Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol. Vect.* 2002, 9(1):133-146.
- Patterson JS, Schofield CJ, Durjardin JP, Miles MA. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with old world species of *Triatoma*: evidence of new world ancestry. *Med Vet Entomol* 2001; 15: 443-451.
- Paula AS de, Diotaiuti L, Schofield CJ. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Molecular Phylogenetics Evolution*, 2005; 35: 712 - 718.
- Pavan MG, Monteiro FA. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae) *Tropical Medicine & International Health*, 2007; 12 (6): 751–758.
- Pérez-Gutiérrez E, Salvatella Agrelo R, Figueroa R. Consulta Técnica em Epidemiologia, Prevenção e Manejo da Transmissão da Doença de Chagas como Doença Transmitida por Alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; 39(5):512-514

- Pérez R, Hernández M, Rose V, Calleros L, Panzera F. Citotaxonomia e evolución cromosómica en Triatominae, insectos vectores de la enfermedad de Chagas (Heteroptera – Reduviidae) In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Veterinária. Montevideo, Uruguay, 13 – 17 de octubre, 2003. Entomol. Vect. 2003; 10(4): 431-436.
- Pérez R, Hernández M, Quintero O, Scvortzoff E, Canale D, Méndez L, Cohanoff C, Martinho M, Panzera F. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). Genetica 2005; 125(2-3):261-70
- Pfeiler E, Bitler BG, Ramsey JM, Palacios-Cardiel C, Markow TA. 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, 2006; 41: 209–221.
- Pinto C. Ensaio monographico dos Reduvidos hematophagos ou “barbeiros”. Thesis Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro. 1925. 118 pp.
- Pinto C. Classificação dos Triatomídeos (hemipteros-heteropteros hematophagos). Sci. Méd. 1926; 4(9): 485-490.
- Pinto C. Artrópodes parasitos e transmissores de doenças. In: de Mello, Pimenta (Ed.), Tratado de Parasitologia 1930; 4: 173- 234.
- Pinto C. Valor do rostro e antenas na caracterização dos generos de Triatomídeos. Hemiptera, Reduviidae. Boletim Biol. 1931; 19: 45 –136.
- Poinar JR. G. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil

- Evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2005; 5(1): 72-81.
- Rabinovich JE. Vital statistic of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions I. *Triatoma infestans* Klug. *J Med Ent* 1972; 9(4): 351-370.
- Ramírez CJ, Jaramillo CA, Delgado MP, Pinto NA, Aguilera G, Guhl F. Genetic structure of sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from an endemic zone of Boyaca, Colombia. *Acta Tropica* 2005; 93 23–29.
- Ridley M. *Evolução* (3ª ed.). Artmed, Porto Alegre. 2006. 752 pp.
- Rocha S da; Patterson JS; Sandoval CM; Jurberg J; Angulo VM; Lyda-Esteban A and Galvão C. Description and Ontogenetic Morphometrics of Nymphs of *Belminus herreri* Lent & Wygodzinsky (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). *Neotropical Entomology* 2005, 34(3):491-497
- Rosa JA da. Contribuição ao estudo morfológico dos segmentos abdominais de ninfas do 5º estágio de seis espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae)). [Dissertação de Mestrado] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo 1989.
- Rosa JA da, Barata JMS, Barelli N. Cerdas Abdominais de espécies de Triatominae, através de Microscopia Eletrônica de Varredura. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989; Supl 2 84: 117.
- Rosa JA da, Barata JMS, Barelli N; Santos JLF; Belda Neto FM. Sexual distinctions between 5th instar nymphs of six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1992; 87:257-264.

- Rosa JA da, Barata JMS, Barelli N. Morphology of Abdominal Bristles Determined by Scanning Electron Microscopy in Six Species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1995; 90(4): 487-488.
- Rosa JA da, Barata JMS, Santos JLF, Cilense M. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). Rev Saúde Pública 2000a; 34(5): 538-42.
- Rosa JA da, Tres DFA, Santos JLF, Barata JMS. Estudo morfométrico dos segmentos antenais de ninfas e adultos de duas colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae). Entomol. y Vectores 2000b; 7(3): 255-264.
- Rothhammer F. Chagas disease in chilean mummies. Parasitology Today 1985; 1(1): 3.
- Ruas-Neto AL, Corseuil É, Cavalleri A. Development of rupestrian Triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) following hemolymphagy on blaberids (Blatoodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. Entomol. y vectores 2001; 8(2): 205-216.
- Ryckman RE. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). J. Parasitol., 1951; 37(5): 433 – 434.
- Ryckmam RE. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North America (Hemipter: Reduviidae) (Rodentia: Cricetidae). Univ Callifornia Publ Ent 1962; 27: 93-239.
- Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, García BA. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. Genetica 2004; 121: 229–240.

- Sandoval CM, Joya MI, Gutiérrez R e Angulo VM. Cleptohaematophagy of the triatomine bug *Belminus herreri*. *Med Vet Entomol* 2000; 14:100-101.
- Sandoval CM, Pabon E, Jurberg J, & Galvão C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) *Zootaxa* 2007; 1443: 55–64 www.mapress.com/zootaxa.
- Santos CM dos, Jurberg J, Galvão C, Rocha DS da, Fernandez JIR. Estudo morfométrico do Gênero *Panstrongylus* Berg, 1879 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2003; 98(7): 939 – 944.
- Santos CM dos, Jurberg J, Galvão C, Rosa JA da, Ceretti Jr. W, Urbinatti PR, Barata JMS, Obara MT. Descrição morfológica e morfométrica e ultra-estrutural de ovos de *Rhodnius colombiensis*, *R. milesi* e *R. stali* (Hemiptera, Reduviidae). *Men. Inst. Oswaldo Cruz* 2008;(no prelo).
- Santos SM dos, Lopes CM, Dujardin JP, Panzera F, Pérez R, Carbajal de la Fuente AL, Pacheco RS, Noireau F. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution* 2007; 7: 469–475.
- Schaefer CW. Phylogeny, Systematics and Practical Entomology: The Heteroptera (Hemiptera). *An. Soc. Entomol. Brasil* 1998; 27(4): 499-511.
- Schaefer, CW. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic Questions and Some Others. *Neotropical Entomology* 2003; 32(1):001-010 (FORUM).
- Schaefer CW. Why are the subfamily relationships of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) important? *Entomologia y Vectores* 2005; 12 (1): 19-35.

- Scheafer CW e Coscarón MC. The status of *Linschosteus* in the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol. 2001; 38(6): 862 – 867.
- Schenone H, Christensen HA, Vásquez AM de, González C, Méndez E, Rojas A e Villarroel F. Fuentes de alimentación de *Triatomas* domesticos y su implicancia en relación a la enfermedad de Chagas en areas rurales de siete regiones de Chile. Bol Chil Parasitol 1985; 40: 34-38.
- Schofield CJ. Bisystematics of Triatominae. In: Biosystematics of Haematophagous insects (ed. M.W. Service) Systematics Association Special Volume 37, pp.284-312. Clarendon Press, Oxford. 1988.
- Schofield CJ. Triatominae - Biología y control. West Sussex: Eurocommunica Publications, 1994.
- Schofield CJ. Biosystematics and evolution of the Triatominae. Cad. Saúde Públ. 2000a; 16 (Suppl 2): 89-92.
- Schofield CJ. Trypanosoma cruzi – The vector-parasite paradox. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2000b; 95(4): 535 – 544.
- Schofield CJ, Dujardin JP and Jurberg J. 1995. Population Genetics of Triatominae: support for vigilance and control interventions. Mem Inst Oswaldo Cruz 90 (Suppl. 1): 57.
- Schofield CJ and Dujardin JP. Chagas disease vector control in Central America. Parasitol Today 1997; 13: 141–144.
- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(suppl. I): 375-378.
- Schofield CJ, Maudlin I. Trypanosomiasis control. Inter J Parasitol 2001; 31: 615 – 620.

- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006; 22 (12): 583-588.
- Schmunis GA A tripanosomíase americana e seu impacto na Saúde Pública das Américas. In : BRENER Z, ANDRADE Z.A. & BARRAL-NETO M, *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2^a ed., 2000.
- Sherlock IA. Vetores. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral- Netto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.; 1979. p. 42-88.
- Silva LJ da. Evolução da doença de Chagas no estado de São Paulo. [Tese de doutorado] - Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP., 1980.
- Silveira AC e Rezende DF de. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27(Suppl. III): 11-22.
- Silveira AC e Vinhaes M. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31(supl. II): 15-60.
- Silveira AC. Current situation with control of vectors-borne Chagas' disease transmission in the Americas. In: Atlas of Chagas' disease vectors in the america. Rio de Janeiro, FIOCRUZ Editorial, vol. III, p. 1161-1181, 1999.
- Silveira AC. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. Cad. Saúde Públ 2000; 16(supl.2): 35-42.
- Soares RPP, Barbosa SE, Dujardin JP, Schofield CJ, Siqueira AM, Diotaiuti L. Characterization of *Rhodnius neglectus* from two regions of Brazil using isoenzymes, genitalia morphology and morphometry. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(2): 161- 166.

- Solano P, Dujardin JP, Schofield CJ, Romana C, Tibayrenc M. Isoenzymes as a tool for identification of *Rhodnius* species. *Res Rev Parasitol* 1996; 56: 41- 47.
- Stearns SC, Hoehstra RF. *Evolução: uma introdução*. Walter Neves (coord.); tradução de Max Blum. São Paulo: Ateneu Editora, 2003.
- Stevens JR and Schofield CJ. Phylogenetics and sequence analysis – some problems for the unwary. *Trends Parasitol* 2003; 19: 582–588.
- Stothart 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: Reduviidea) using polymerase chain reaction-based single stand conformational polymorphism (SSPC) analysis and direct sequencing. *Bulletin Entomological* 1998; 88: 553-560.
- Tartarotti, E, Azeredo-Olioveira, M, Ceron, C R. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera) *Braz. J. Biol.*, 2006; 66(2B): 703-708.
- Tartarotti E, Ceron CR. Ribosomal DNA ITS-1 Intergenic Spacer/Polymorphism in Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Biochemical Genetics* 2005;43(7/8): 365-373.
- Thompson J.D., Higgins D.g., Gibson T.J., CLUSTAL-W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequenced weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 1994; 22: 4673-4680.
- Thorpe JP and Solé-Cava AM. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoo Scripta*, 1994; 23: 3-18.

- Ueshima N Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 1966; 18: 97-122.
- Usinger RL. The triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. U.S. Public Health Serv. *Publ.Bull* 1944; 288:1-83.
- Usinger, R.L., Wygodzinsky, P., Ryckman, R.E., The biosystematics of Triatominae. *Ann. Rev. Entomol.* 1966; 11, 309–330.
- Weinman D, Wallis RC, Cheong WH e Mahadevan S. Triatomines as experimental vectors of trypanosomoses of asian monkeys. *Amer Soc Trop Med Hyg* 1978; 27(2): 232-237.
- WHO Control of Chagas disease. WHO Technical Report Series 811, World Health Organization, Geneva. 95pp. 1991.
- WHO. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 2002; 905: 109.
- Wink M. Use of DNA markers to study bird migration. *J. Ornithol*, 2006; 147:234-244.
- Zahler A.M. and Roth M.B. Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. *Proceeding of Natural Academy of Science. USA.* 1995; 92: 2642-2646, *Biochemistry*.
- Zerpa MG e Yépes MS. Probable accion vectora de blatarios contaminados com el *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 mediante triatomofagia. *Acta Biol Venezuelica* 1967; 5(16): 255-266.

IX. ANEXOS

**Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos
(Hemiptera: Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de
Araraquara, inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial**

Walter Ceretti Junior, Daniel Pagotto Vendrami, José Maria Soares Barata & Mauro Toledo
Marrelli

Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo,
Av. Dr. Arnaldo 715, 01246-904, São Paulo, SP, Brasil

ABSTRACT: Nucleotide sequences of mitochondrial 16S rDNA gene were analysed in 14 populations of triatomine bugs from colonies maintained by SESA, Araraquara, São Paulo, Brazil, comparing them with sequences of same gene found in the GenBank. The fragments varied from 311 to 317 bp, with low intra-specific genetic distance (0% to 0.6%), with exception of the relationship among *Triatoma sordida-sordida* (1%) and *T. brasiliensis-brasiliensis* (1.3%) that were attributed to population genetic differences. The paraphyly of Rhodniini and *Panstrongylus* genus was evidenced by this analyses, confirming previous results between these and the narrow relationships of *R. prolixus* with *R. robustus* and of *T. infestans* with *T. platensis*. The analyses have also demonstrated that the colony of *T. maculata* of the SESA was indeed *T. pseudomaculata*. The results evidence the utility of the gene 16S as molecular marker in the species of triatomine bugs and its importance in systematic and taxonomy questions. There is a necessity of new studies including new molecular markers associated with classic systematic characters of morphology, ecology and behaviour for adjust systematic decisions since that will be not only systematic impact but, for new strategies of control.

KEYWORDS: Triatominae, Chagas disease vectors, systematic, 16S rDNA.

RESUMO: Foram analisadas seqüências de nucleotídeos do gene 16 S do rDNA mitocondrial em 14 populações de triatomíneos mantidos em colônias no insetário SESA de Araraquara- SP, comparando-as com seqüências do mesmo gene disponíveis no GenBank. Os fragmentos variaram de 311 a 317 pb com baixa variação intra-específica entre as distâncias genéticas (0% a 0,6%), exceto para os relacionamentos entre *Triatoma sordida-sordida* (1%) e *T. brasiliensis-brasiliensis* (1,3%) atribuídos a populações geográficas diferentes. A parafilia de Rhodniini e do gênero *Panstrongylus* foi evidenciada pelas análises, confirmando resultados anteriores entre estes e os estreitos relacionamentos de *R. prolixus* com *R. robustus* e de *T. infestans* e *T. platensis*. **Não houve possibilidade de solucionar o relacionamento entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*. Esses taxa apareceram ora em arranjo monofilético, ora em parafilia, com *T. maculata* (GenBank) associado a *T. brasiliensis* (SESA), enquanto *T. maculata* (SESA) apareceu em “cluster” com os *T. pseudomaculata* do SESA e GenBank.** Os resultados evidenciam a utilidade do gene 16S como marcador de espécies de triatomíneos e sua importância em questões de sistemática e taxonomia. Há necessidade de novos estudos envolvendo outros marcadores associados a caracteres sistemáticos clássicos de morfologia, ecologia e comportamento para decisões sistemáticas adequadas uma vez, que teriam impacto não apenas sistemático mas, para as estratégias de controle.

PALAVRAS-CHAVE. Triatominae, Vetores da doença de Chagas, sistemática, 16S rDNA.

INTRODUÇÃO

A subfamília Triatominae de Reduviidae comporta hoje, cerca de 140 espécies ocorrentes e uma fóssil, distribuídas em 18 gêneros. Esses insetos, hematófagos estritos em todas as fases da vida são reconhecidos vetores da Doença de Chagas, parasitemia endemicamente distribuída entre as latitudes 40°N e 46°S do Sul dos EUA à Patagonia Argentina (Lent & Wygodzinsky 1979; Schofield 1988; Forrero *et al.* 2004; Poinar 2005; Costa *et al.* 2006; Galvão & Angulo 2006; Sandoval *et al.* 2007; Costa & Felix 2007).

Essa enfermidade é considerada um dos mais importantes problemas de Saúde na América Latina, com cerca de 12 a 14 milhões de indivíduos chagásicos, 60 milhões vivendo em risco e cerca de 20.000 caso/ano em 18 países da América do Sul e Central (Monteiro 2001; WHO 2002; Schofield *et al.* 2006).

Morfologicamente os triatomíneos em sua maioria são de fácil distinção, no entanto alguns taxa necessitam de ferramentas mais sutis para uma adequada distinção (Schofield 1988; Barata *et al.* 1998; Carcavallo *et al.* 2001; Jurberg 2003). É o caso dos “complexos” de espécies crípticas, robustus de *Rhodnius* e, sordida de *Triatoma*, entre outras (Monteiro *et al.* 2001).

O uso de marcadores moleculares para fins de análise cladística em Triatominae, auxilia na resolução desses impasses sistemáticos e também acirrou as questões sobre as hipóteses de origem monofilética e parafilética do grupo (Jurberg 2003; Scheafer 2003; 2005).

Para inferências filogenéticas de populações e problemas relativos ao *status* específico de alguns taxa o gene 16S do DNA mitocondrial tem sido bastante útil, e no GenBank já existe uma enorme quantidade de seqüências disponíveis deste gene para os insetos, inclusive para Triatominae (Abad-Franch & Monteiro 2005).

O Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) pertencente à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Brasil, mantém um insetário constituído a partir da desativação do biotério existente no Departamento de Epidemiologia, na unidade matriz, na década de 1980. Conta atualmente com cerca 31 espécies de triatomíneos dos Gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* distribuídos em 140 colônias de diversas procedências nacionais e internacionais que são utilizadas por pesquisadores locais e de

instituições de outros estados e nações. No entanto, somente umas poucas colônias foram pauta de estudos moleculares.

O presente trabalho tem por finalidade apresentar as seqüências obtidas do gene 16S do rDNA mitocondrial dos triatomíneos mantidos nas colônias do SESA e compará-las àquelas disponíveis no GenBank no intuito de fornecer novos dados moleculares que possibilitarão análises mais robustas futuramente.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência dos Triatomíneos. Foram testados triatomíneos dos Gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*, adultos (machos e/ou fêmeas) e ninfas de V estadios, conforme Tabela 1. Esses indivíduos foram procedentes de colônias mantidas pelo insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA), da Universidade de São Paulo.

De algumas espécies testamos mais de uma procedência caso, de *R. prolixus* Stal 1859, *R. robustus* Larrousse, 1927, *P. megistus* (Burmeister, 1835), *T. brasiliensis* Neiva 1911, *T. infestans* Klug 1834, *T. pseudomaculata* Correa & Espinola 1964, *T. rubrovaria* Blanchard 1843 e *T. sordida* Stal 1859. Os trabalhos foram executados no Laboratório de Entomologia em Saúde Pública (LESP) da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Os exemplares enviados semanalmente pelo insetário do SESA foram condicionados em Tubos tipo Falcon de 50 ml, devidamente identificados e conservados em *freezer* a -70°C até o momento da extração do DNA total.

Seqüências de alguns exemplares de outras espécies de triatomíneos foram obtidas do GenBank, e estão listados na Tabela 2 com os respectivos número de acesso.

Tabela 1 Lista de espécies de triatomíneos examinados pelo gene 16S do DNAr mitocondrial, sexo e estádio, procedência e código da colônia (CTA), mantidas pelo SESA - USP, Araraquara-SP. A-ninfa, B-fêmea, C-macho.

Gênero	Espécie	Sexo Estádio	Procedência	CTA - Colônia
<i>Rhodnius</i>	<i>R. neglectus</i>	B	Guaira – SP - Brasil	001
	<i>R. prolixus</i>	A	Colômbia	003
		B		
	<i>R. prolixus*</i>	C	Colômbia	004
	<i>R. robustus</i>	A	Madere de Dios - Perú	011
	<i>R. robustus</i>	C	Lima – Perú	012
	<i>R. pictipes</i>	A	Jacundá – PA - Brasil	057
	B			
	C			
<i>Panstrongylus</i>	<i>P. megistus</i>	C	Almino Alfonso – RN - Brasil	008
	<i>P. megistus</i>	B	Araraquara – SP - Brasil	082
	<i>P. megistus</i>	A	São Felipe - BA- Brasil	137
	<i>P. megistus</i>	A	Sta. Maria do Cambuçá – PE- Brasil	139
	<i>P. megistus</i>	A	Boca da Mata - AL- Brasil	146
<i>Triatoma</i>	<i>T. brasiliensis</i>	B	São João do Piauí - PI- Brasil	076
		C		
	<i>T. infestans</i>	A	Mambaí – GO- Brasil	007
	<i>T. infestans</i>	A	Frutal – MG- Brasil	022
		C		
	<i>T. infestans</i>	C	Tucuman - Argentina	030
	<i>T. infestans</i>	C	Cochabamba - Bolívia	044
	<i>T. infestans</i>	B	Santa Cruz - Bolívia	072
	<i>T. infestans</i>	B	Tanhaçu - BA- Brasil	067
	<i>T. infestans</i>	B	Gloria de Dourados - MS- Brasil	073
		C		
	<i>T. maculata</i>	B	C. Galaú - Venezuela	120
		C		
	<i>T. pseudomaculata</i>	A	Pocinhos - PB- Brasil	018
	<i>T. pseudomaculata</i>	A	Ceará- Brasil	091
	<i>T. pseudomaculata</i>	A	Teofelândia - BA- Brasil	094
	<i>T. platensis</i>	A	La Pampa - Argentina	133
	<i>T. protracta</i>	A	Monte Del Diablo – California – EUA	045
		B		
	<i>T. sordida</i>	A	Guaira – SP- Brasil	020
	C			
<i>T. sordida</i>	C	Tanhaçu - BA- Brasil	026	
<i>T. rubrovaria</i>	A	Caçapava do Sul - RS- Brasil	108	
<i>T. rubrovaria</i>	A	Pelotas – RS- Brasil	117	
	C			
<i>T. vitticeps</i>	A	Guarapari - ES- Brasil	006	
	C			

* Linhagem: olhos vermelhos

Tabela 2. Número de acesso de seqüências do gene 16S do DNA mitocondrial de espécies de insetos da Família: Reduvidae, obtidas no GenBank, para comparação com as seqüências geradas nesse estudo.

Espécie	Número de acesso
<i>Oncerothelus sp</i>	AY252739
<i>Arius cristatus</i>	AF045712
<i>Rhodnius domesticus</i>	AY035440
<i>Rhodnius stali</i>	AY035437
<i>Rhodnius brethesi</i>	AF045710
<i>Rhodnius colombiensis</i>	AY035438
<i>Psammolestes tertius</i>	AY035439
<i>Psammolestes coreodes</i>	AF045708
<i>Triatoma maculata</i>	AY035465
<i>Triatoma pseudomaculata</i>	AY035461
<i>Triatoma dimidiata</i>	AF045695
<i>Triatoma circummaculata</i>	AF021188
<i>Triatoma arthurneivai</i>	AY035460
<i>Triatoma rubrofasciata</i>	AY035468
<i>Panstrongylus lutzi</i>	AY035449
<i>Panstrongylus geniculatus</i>	AF394593
<i>Panstrongylus herreri</i>	AY185833
<i>Dipetalogaster maximus</i>	AF045699
<i>Eratyrus mucronatus</i>	AY185832
<i>Mepraia spinolai</i>	AF324518
<i>Linshcosteus sp.</i>	AF394595

Extração do DNA total. Os exemplares obtidos foram mortos por congelamento a -70°C . O DNA genômico foi extraído individualmente utilizando o método de extração fenol-clorofórmio, (Zahler *et al.* 1995) adaptado para triatomíneos por Lyman *et al.* (1999). De cada exemplar adulto retirou-se as pernas (os três pares) e a cabeça. As ninfas foram processadas integralmente.

O DNA foi obtido por meio da maceração individual, com pistilo, das peças anatômicas acima, em micro-tubos de 1,5 ml nos quais adicionou-se 150 μl tampão de lise (Tris-HCl 10mM, SDS 20%, EDTA 50 mM) + 0,8 μl de proteinase K 20 ng/ μl + 1,0 μl de

RNAse 10 ng/μl. Desta forma obteve-se um homogenato ao qual submeteu-se a quatro ciclos de congelamento-descongelamento em N₂ líquido e incubados por 1 hora em “banho seco” a 60° C. Após a incubação o DNA foi extraído com 100μl de FCI (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico 25:24:1) e precipitado pela adição de 2 volumes de etanol absoluto (overnight a 4°C). Após centrifugação (12,000 x g por 5 min), o pelete foi ressuspendido com 50μl de TE (Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM).

Amplificação do gene 16S do DNA mitocondrial e sequenciamento. Cada DNA individualmente obtido foi utilizado para amplificação do gene 16S. Foram utilizados como iniciadores (*primers*) dos fragmentos do gene 16S de acordo com Lyman *et al.* (1999), e denominados aqui como: 16SF 5' CAT CTG TTT A(A/T)C AAA (A/G)AC AT 3', e 16SR 5' AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA 3'.

As reações de amplificação do 16S foram conduzidas por 35 ciclos (95°C por 45 min, 55°C por 1 min, e 72°C por 1 min) e seus produtos (ao redor de 500 pares de base) foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Os fragmentos obtidos foram então seqüenciados diretamente em ambas direções com os mesmos *primers* usando o sistema ABI Prism dGTP BigDye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Análise das seqüências. As seqüências dos fragmentos do gene 16S foram alinhadas usando CLUSTAL W software (1.60) (Thompson *et al.* 1994). As seqüências podem ser disponibilizadas pelos autores deste trabalho. O alinhamento foi examinado com o programa MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 3.01) (Kumar *et al.* 2003) e uma matriz de divergência foi gerada. As relações entre as espécies foram avaliadas por três métodos: Neighbor Joining (NJ) com distância Kimura dois parâmetros, 1000 replicações no teste de “*bootstrap*” (MEGA); Máxima Parcimônia (MP) com 1000 replicas de “*bootstrap*” e opção de busca “*branch-and-bound*”; e Máxima Verossimilhança (ML), utilizando o programa PHYLIP: (Phylogeny Inference Package, version 3.6) (Felsenstein 2004). As três árvores foram enraizadas com seqüências de 16S de *Oncerotrachelus sp* e *Arilus cristatus*, como grupo externo (número de acesso no GenBank/EMBL na Tabela 2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas seqüências de nucleotídeos de fragmentos do gene 16S do DNA mitocondrial de 14 espécies dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* aos quais pertencem reconhecidos vetores da doença de Chagas na América Latina. De algumas espécies foi possível gerar seqüências de diferentes procedências, isto ocorreu com *Triatoma infestans* (8); *Panstrongylus megistus* (4), *Triatoma pseudomaculata* (3); *Rhodnius prolixus* (3) e *T. rubrovaria* (2). As seqüências geradas variaram entre 311 pb, para *R. pictipes*, a 317 pb em *T. sordida* (CTA 20C e 26C) (dados não mostrados).

Estes fragmentos foram alinhados com seqüências do mesmo gene para outros triatomíneos e também de *Arilus cristatus* e *Oncerostratus* sp (usados como grupos externos) disponíveis no GenBank (Tabela 2). Uma matriz de distância foi construída utilizando o programa MEGA (matriz não mostrada) e com os dados uma árvore de distâncias foi gerada (Fig. 1). Embora árvores por três métodos (Neighbour-Joinig, Máxima Parcimônia e, Máxima Verossimilhança) foram geradas, as espécies foram basicamente mantidas nos mesmos “clusters” ou clados e, portanto, a árvore de distância foi decidida como melhor escolha para ser mostrada e discutida neste estudo. A árvore de distância demonstra a clara parafilia das tribus Rhodniini e Triatominini, corroborando com dados apresentado por Monteiro *et al.* (2000) e Paula *et al.* (2005).

Em Rhodniini, obtivemos um clado composto pelo relacionamento (domesticus (neglectus (prolixus3 (prolixus3-prolixus4-robustus (prolixus 29)))))). As distâncias entre *R. prolixus-robustus* foi de 0%. *R. prolixus* 29 (Faculdade de Medicina) foi o mais divergente do grupo, variando de 0,3% a 0,6% e posicionando-se em ramo separado. Tal topografia corrobora a hipótese de *R. prolixus* e *R. robustus* tratarem-se de linhagens distintas de espécie única adaptadas a ecótopos diferentes. No entanto, Monteiro *et al.* (2000) confirmaram a validade dos dois taxa. Em análises mais recentes mostrou-se ainda, que o ramo acima está mais próximo relacionado a *Psammolestes tertius* e *P. coreodes* do que o relacionamento constituído por (*R. pictipes (stali-brethesi)*). *R. colombiensis* situou-se em ramo mais basal em relação aos outros Rhodniini, em filogenias anteriormente publicadas

esta espécie aparece relacionada a *R. pallescens/ecuadoriensis* (Monteiro *et al.* 2000; Hypsa *et al.* 2002; Paula *et al.* 2005).

Em Triatomini, ficou demonstrada a parafilia de *Panstrongylus* formando clados distintos *P. geniculatus-lutzi* basal ao ramo *P. herreri-megistus* e este, mais próximo a *Dipetalogaster maximus* e aos “*Triatomas*” Norte-americanos do que aos da América do Sul. *D. maximus* aparece basal em relação a o ramo *P.herreri-megistus*. As distâncias entre as populações de *P. megistus* variaram entre 0,3% e 0,6% confirmando derivação distinta para esse gênero observada também por Marcilla *et al.* (2002) com o uso de ITS-2 como marcador.

O ramo formado por *T. pseudomaculata-maculata* apresentou divergência nula e corrobora os resultados obtidos por Sainz *et al.* (2004) que obtiveram diferença que variou de 0,2-0,8%. Mas, que sustentam nossos resultados para *T.pseudomaculata* 91 (Ceará) que se mostrou 0,3% divergente dos demais e formou ramo consistente com *T.arthurneiva* que no entanto, não foi testado pelos autores *op.cit.* Porém, quando incluímos em nossa análise seqüências de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* obtidas do GenBank verificamos que *T. maculata* do SESA manteve-se associado aos *T. pseudomaculata* do SESA enquanto, o *T. maculata* do GenBank relacionou-se ao *T. brasiliensis*. Esse resultado coincide com Hypsa *et al.* (2002). Essas espécies são de difícil separação por caracteres morfológicos dos adultos e foram tratadas por Lent & Wygodzinsky (1979) como o mesmo taxon. Posteriormente por estudos com base em ovos e ninfas Gonçalves *et al.* (1985) demonstraram tratar-se de taxa distintos. Ambas são encontradas nos ambientes domésticos e primumésticos em geral, associadas a aves. Schofield (1988) sustenta a provável evolução das mesmas a partir de populações alopátricas originadas de uma ancestral comum por dispersão passiva dependente de aves.

Para Sainz *et al.* (2004) a inclusão de *T. arthurneivai* na análise poderia ajudar a resolver a questão quanto ao relacionamento de *T. maculata* e *T. pseudomaculata* entretanto, aqui isto não foi possível. Admitimos a necessidade de testes com outros marcadores moleculares para que esse impasse seja solucionado.

As espécies de *T. infestans* procedentes de Chochabamba e Santa Cruz (Bolívia) formaram ramo com as procedentes de Glória de dourados e Mambaí (GO-BRA), Frutal (MG-BRA) e Tanhaçu (BA-BRA) com inclusão de *T. platensis* e divergência de 0% entre

essas. No entanto, *T. infestans* procedente de Tucuman (ARG) divergiu 0,3% das demais, formando ramo basal a este clado.

A similaridade genética entre *T. infestans* e *T. platensis* já foi demonstrada anteriormente tanto, por apresentarem híbridos naturais viáveis (Perez *et al.* 2005) quanto por dados moleculares: Garcia *et al.* (2001) pelo uso de COI, 12S e 16S e também, por Bargues *et al.* (2006) usando o primeiro espaçador interno transcrito (ITS-1). Estas espécies estão mais relacionados entre si do que com *T. delpontei*. Estas três espécies juntamente a *T. melanosoma*, *T. rubrovária* e *T. carcavallo* e *T. infestans* Darck Morphs, pertencem ao complexo *T. infestans* Carcavallo *et al.* (2000). No entanto, Monteiro *et al.* (1999) com base na análise de fragmentos de citocromo b (citb), evidenciou que tanto *T. melanosoma* quanto *T. infestans* Darck Morphs Andinos referem-se a variações fenotípicas de *T. infestans* l.s.

T. circummaculata-*T. rubrovaria* formaram clado independente mais derivado de *T. infestans-platensis* o que pode evidenciar separação mais recente. Tal topografia tem amparo nos resultados de (Garcia *et al.* 2001). A distância de 0% observada para *T. rubrovaria-rubrovaria* mostra não haver variação geográfica nas populações de Caçapava do Sul e Pelotas, pelo menos quanto ao gene testado.

Resultados inesperados com distância acima de 1% foram obtidos para os ramos de *T. sordida-sordia* (1%) e *T. brasiliensis-brasiliensis* (1,3%) com divergências que podem ser atribuídas a populações geográficas.

Quanto a *T. brasiliensis* Neiva 1911, é considerado o principal vetor do *Trypanosoma cruzi* para os estados do nordeste brasileiro. Essa espécie possui ao longo de sua distribuição quatro variantes cromáticas nos padrões do pronoto, pés e asas: *T. brasiliensis brasiliensis* Neiva 1911, encontrado na região de Caiacó, Rio Grande do Norte; *T. brasiliensis melânica* Neiva & Lent 1941, da região de Espinosa, Minas Gerais; *T. brasiliensis macromelanosoma* Galvão, 1956, prodedente de Petrolina, Pernambuco e *T. brasiliensis juazeirensis*, de Juazeiro, Bahia (Costa *et al.* 1998). Recentemente foi demonstrado que os fenótipos conhecidos como juazeiro e melânica mereciam provável status de espécies, pois pareciam representar linhagens evolucionárias distintas (Monteiro *et al.* 2004; Abad-Franch & Monteiro 2005), o que, de fato, ocorreu: em 2006 *T. brasiliensis melânica* recebeu o status de espécie passando a se chamar *Triatoma melânica*

Neiva & Lent 1941 stat nov. (Costa *et al.* 2006) e no presente ano, aqueles coletados em Juazeiro receberam o mesmo *status* com o nome de: *T. juazeirensis* Costa & Felix 2007 n.sp (Costa & Felix 2007).

Triatoma sordida (Stal 1859) é considerado vetor secundário do mal de Chagas principalmente devido ao seu comportamento peridomiciliar, colonizando, em especial, galinheiros. No entanto, após a eliminação das populações domésticas de *R. prolixus* e *T. infestans* aumentaram os relatos de sua ocorrência intradomiciliar (Schofield 1994). É a espécie nominotípica do complexo específico que inclui ainda: *T. guasayana* Wygodzinsky e Abalos, 1949, *T. patagonica* Del Ponte 1929 e *T. garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínéz, Prosen e Ronderos, 1967 que foi considerada como sinônimo de *T. sordida* por quase duas décadas (Carcavallo *et al.* 2000).

A posição basal no clado correspondente aos *Triatomas* sul-americanos de *T. vitteceps* (Stal 1859) necessita ser melhor avaliada em análises futuras. Esse triatomíneo ocorrente nos estados de Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, é freqüentemente coletado pelos moradores de áreas rurais do Espírito Santo e incriminado com a transmissão do *T. cruzi* no Estado do Rio de Janeiro. Essa espécie apresentou elevada taxa de infecção natural por tripanosomatídeos semelhantes ao *T. cruzi* e índices elevados de domiciliação para o Estado do Espírito Santo. (Santos *et al.* 2006).

Nossa análise evidencia a importância do 16S como marcador de espécies de triatomíneos e sua importância em questões de sistemática e taxonomia. No entanto, os resultados aqui obtidos podem ter sofrido influências relacionadas à homogeneidade genética de cada colônia devido ao estado panmítico das mesmas.

A partir dos trabalhos de Garcia & Powell (1998) e Stothart *et al.* (1998) que inauguraram segundo Galvão (2003) a era cladística molecular nos estudos sistemáticos de Triatominae resolveram-se muitos impasses relacionados ao *status* de algumas espécies ou relativos à espécies crípticas, no entanto, acirrou-se a discussão sobre a origem evolutiva deste grupo e as evidências para polifilia, ou parafilia ganharam mais suporte (Monteiro *et al.* 2004; Paula *et al.* 2005). Novas análises com uso de um maior número de marcadores genéticos associadas ainda, aos padrões sistemáticos clássicos de morfologia e ecologia e comportamento, devem ser adicionadas para uma decisão filogenética adequada. Uma vez

que isto não tem apenas relevância sistemática mais sérias implicações quanto as medidas de controle das espécies de vetores (Schaffer 2003, 2005).

Agradecimentos. João Molina Gil, SESA, pelos envio dos triatomíneos utilizados no trabalho. Financiado pela FAPESP (05/50225-2)

REFERÊNCIAS

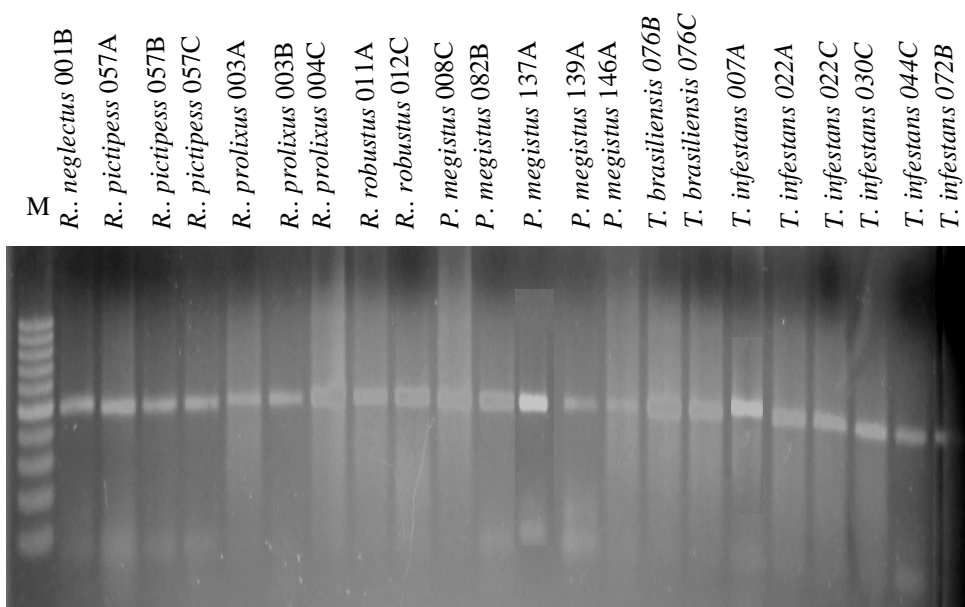
- Abad-Franch, F. & Monteiro, F. A. 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 77(3): 437-454
- Barata, J. M. S. 1998. Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae). Estruturas macroscópicas e exocoriais de ovos de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). In: RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent - orgs.). **Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Vol. II, pp. 409-448.
- Bargues, M. D.; Klisiowicz, D. R.; Panzera, F.; Noireau, F.; Marcilla, A.; Perez, R.; Rojas, M. G.; O'Connor, J. E. ; Gonzales-Candelas, R.; Galvão, C.; Jurberg, J.; Carcavallo, R.U.; Durjardin, J. P. & Mas-Coma, S. 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. **Infection, Genetics and Evolution** 6:42-62.
- Carcavallo, R.U.; Jurberg, J.; Lent, H.; Noireau, F. & Galvão, C. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Entomologia y Vectores**, 7(supl. 1): 1-99.
- Carcavallo, R. U.; Jurberg J.; Lent H.; Galvão C.; Steindel M. & Pinto C. J. C. 2001. Nova espécie do complexo *oliveriai* (nova denominação para o complexo *matogrossensis*) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 96(1): 77- 79.
- Costa, J.; Almeida, J. R. de; Britto, C.; Duarte, R.; Marchon-Silva, V.; Pacheco & R. S. da E. 1998. Natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 93(1):7-13

- Costa, J.; Argolo, A. M. & Felix, M. 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) **Zootaxa** **1385**: 47–52.
- Costa, J. & Felix, M. 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 102 (1): 87-90.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **J Molecular Evolution**, **17**(6): 368-76.
- Forero, D.; Weirauch, C. & Baena, M. 2004. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator*. (Klug, 1830) **Zootaxa**, 670,1–12. Disponível em www.mapress.com/zootaxa
- Galvão, C. 2003. A sistemática de Triatomíneos (Hemikptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Vetrinária. VII Jornadas de Zoología del Uruguay, 13-17 de octubre de 2003, Montevideo Uruguay. Entomología y Vectores 10(4): 511-530.
- Galvão, C. & Angulo, V. M. 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia **Zootaxa** 1241: 61–68. Disponível em www.mapress.com/zootaxa.
- Garcia, B. A. & Powell, J.R. 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. Journal of Medical Entomology 35(3): 232-238.
- Garcia, B.A.; Moriyama, E. N. & Powell, J. R. 2001. Mitochondrial DNA sequences of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. **Journal of Medical Entomology** **38**(5): 675-683.
- Gonçalves, T. C. M.; Jurberg, J.; Costa, J. M. & Souza, W. de. 1985. Estudo morfológico comparativo de ovos e ninfas de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviinae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **80**(3): 263-276.
- Hypsa, V.; Tietz, D. F.; Zrzavy, 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. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **23**:447–457
- Jurberg, J. 2003. Ferramentas usadas em taxonomia de triatomíneos: O uso múltiplo. In: II Encontro Nacional de Entomologia Médica y Vetrinária. VII Jornadas de Zoologia del Uruguay, 13-17 de octubre de 2003, Montevideo Uruguay. *Entomología y Vectores* 10(4): 497-509.
- Kumar, S.; Tamura, K. & Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, **5**: 150-163.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of American Museum of Natural History**; **163**(3): 123-520.
- Lyman, D. F.; Monteiro, F. A.; Escalante A.A.; Cordon-Rosales, C.; Wesson, D. N.; Dujardin, J.P. & Beard, C. B. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60(3):377-386.
- Marcilla, A.; Bargues, M. D.; Abad-Franch, F.; Panzera, F.; Carcavallo, R.U.; Noireau, F.; Galvão, C.; Jurberg, J.; Miles, M. A.; Dujardin, J. P. & Mas-Coma, S. 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution** **1**: 225-235.
- Monteiro, F.A.; Pérez, R.; Panzera, F.; Dujardin, J. P.; Galvão, C.; Rocha, D., Noireau, F.; Schofield, C. & Beard, C. B. 1999. Mitochondrial DNA Variation of *Triatoma infestans* Populations and its Implication on the Specific Status of *T. melanosoma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. **94**, Suppl. I: 229-238.
- Monterio, F. A.; Wesson, D. M.; Dotson, E. M.; Schofield, C. J. & Beard, C. B. 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from **mitochondrial and nuclear DNA sequences**. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 62(4): 460-465.
- Monteiro, F. A.; Escalante, A. A. & Beard, C. B. 2001. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **TRENDS in Parasitology** **17** (7): 344-347.

- Monteiro, F. A.; Donnelly, M. J.; Beard, C. B. & Costa, J. 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. **Molecular Phylogenetics Evolution** **32**: 46–56.
- Paula, A. S. de; Diotaiuti, L. & Schofield, C. J. 2005, Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Molecular Phylogenetics Evolution** **35**: 712 - 718.
- Pérez, R.; Hernández, M.; Quintero, O.; Scvortzoff, E.; Canale, D.; Méndez, L.; Cohanoff, C.; Martinho, M. & Panzera, F. 2005. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). **Genetica** **125**(2-3):261-70.
- Poinar, J. R. G. 2005. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. **Vector-borne and Zoonotic Diseases** **5**(1): 72-81.
- 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.
- Sandoval, C. M.; Pabon, E.; Jurberg, J. & Galvão, C. 2007. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) **Zootaxa** **1443**: 55–64 www.mapress.com/zootaxa.
- Santos, C.B. dos; Leite, G.R.; Ferreira, G. E. M. & Ferreira, A. L. 2006. Infecção natural de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) por fragelados morfológicamente semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) no Estado do Espírito Santo. *Rev. Bras. Med. Trop.* **39**(1): 89-91.
- Scheafer, C.W. 2003. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic Questions and Some Others. **Neotropical Entomology** **32**(1):001-010 (FORUM).
- Scheafer, C.W. 2005. Why are the subfamily relationships of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) important? **Entomologia y Vectores** **12** (1): 19-35.
- Schofield, C. J. 1988. **Biosystematics of Triatominae**. In: **Biosystematics of Haematophagous insects** (ed. M.W. Service) Systematics Association Special Volume 37, pp.284-312. Clarendon Press, Oxford.

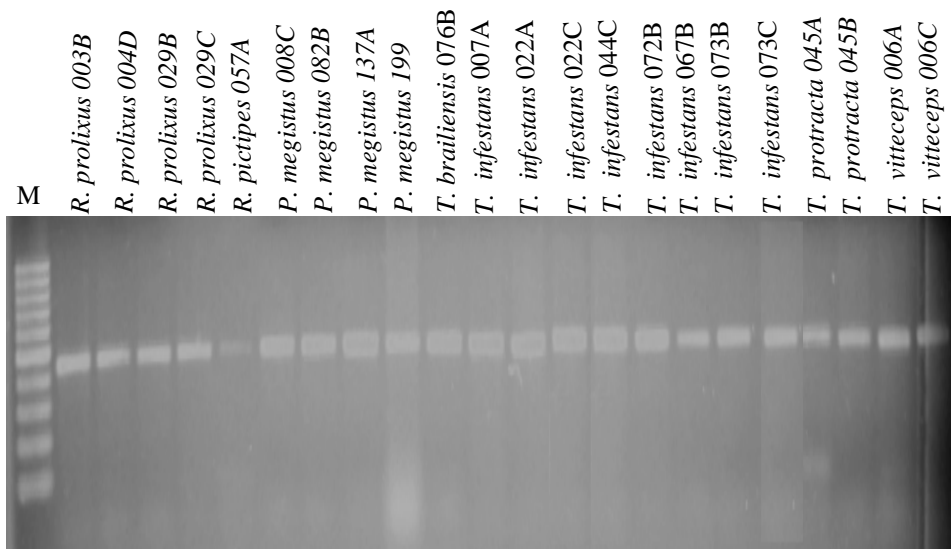
- Schofield, C. J. 1994. **Triatominae - Biología y control**. West Sussex: Eurocommunica Publications. 79pp.
- Schofield, C.J.; Jannin, J. & Salvatella, R. 2006. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitology** **22** (12): 583-588.
- Stothart, J. R.; Yamamoto, Y.; Cherchi, A.; Garcia, A. L.; Valente, S. A. S.; Schofield, C. J. & Miles M. A. 1998. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSPC) analysis and direct sequencing. **Bulletin of Entomological** **88**: 553-560.
- Thompson, J. D.; Higgins, D.G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL-W: improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research** **22**: 4673-4680.
- WHO. 2002. **Control of Chagas disease**. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 905: 109
- Zahler, A. M. & Roth, M. B. 1995. Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites **Proceeding of Natural Academy of Science. USA.** **92**: 2642-2646, Biochemistry.



M
T. infestans 073B
T. infestans 073C
T. maculata 120B
T. maculata 120C
T. pseudomaculata 018A
T. pseudomaculata 091A
T. pseudomaculata 094A
T. platensis 133A
T. protracta 045A
T. protracta 045B
T. rubrovaria 108A
T. rubrovaria 117A
T. rubrovaria 117C
T. sordida 020A
T. sordida 020C
T. sordida 026C
T. sherlocki 245
T. vitticeps 006A
T. vitticeps 006C



Anexo 3. Produtos da amplificação do gene 16S em gel de agarose, segundo espécie, estágio de desenvolvimento e CTA. M=marcador; A = ninfa; B = macho; C=fêmea.



Anexo 4. Produtos da amplificação do gene CitB em gel de agarose, segundo espécie, estágio de desenvolvimento e CTA. M=marcador; A = ninfa; B = macho; C=fêmea.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)