

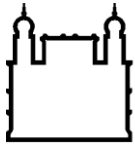
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

Infecção natural de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, Caicó, Rio Grande do Norte, pelo *Trypanosoma cruzi* e o estudo de peptídeos antimicrobianos em diferentes espécies de triatomíneos (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae)

ANA CAROLINA BASTOS DE LIMA

Rio de Janeiro
Agosto de 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ANA CAROLINA BASTOS DE LIMA

Infecção natural de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, Caicó, Rio Grande do Norte, pelo *Trypanosoma cruzi* e o estudo de peptídeos antimicrobianos em diferentes espécies de triatomíneos (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (es): Dr^a. Jane Costa
Dr^a. Catarina Andréa Chaves de Araújo

RIO DE JANEIRO
Agosto de 2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

L732 Lima, Ana Carolina Bastos de

Infecção natural de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, Caicó, Rio Grande do Norte, pelo *Trypanosoma cruzi* e o estudo de peptídeos antimicrobianos em diferentes espécies de triatomíneos (hemiptera, heteroptera, reduviidae) / Ana Carolina Bastos de Lima. – Rio de Janeiro, 2013.

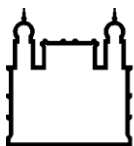
xiv, 55 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2013.

Bibliografia: f. 37-51

1. Doença de chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Defensinas. 4. Triatomíneos. 5. *Triatoma brasiliensis*. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTORA: ANA CAROLINA BASTOS DE LIMA

Infecção natural de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, Caicó, Rio Grande do Norte, pelo *Trypanosoma cruzi* e o estudo de peptídeos antimicrobianos em diferentes espécies de triatomíneos (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae)

ORIENTADOR (ES): Dr^a. Jane Costa
Dr^a. Catarina Andréa Chaves de Araújo

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Jacenir Reis dos Santos Mallet - Presidente (IOC-Fiocruz)

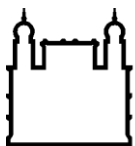
Prof^a. Dr^a. Suzete Araújo Oliveira Gomes (UFF)

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Legey (UGF)

Prof^a. Dr. Márcio Eduardo Felix - Revisor (IOC-Fiocruz)

Prof^a. Dr^a. Maria Denise Feder (UFF)

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Às minhas amadas Maria (mãe), Iracy (vó) e Clarinha (filha).

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras que acreditaram, investiram, apoiaram e que durante esses dois anos acrescentaram e muito para o meu crescimento profissional: Dr^a Jane Costa e Dr^a Catarina Araújo. Com certeza o incentivo e a dedicação de vocês foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Em especial, à Dr^a Catarina Araújo que me acompanhou bem de perto, estando mais que presente em TODOS os momentos desta jornada, MUITO OBRIGADA!!!

À Dr^a Patrícia Azambuja, por ceder gentilmente não somente o espaço e os equipamentos em seu laboratório, mas também pelo suporte ao trabalho.

À Dr^a Ana Maria Jansen, pelo suporte dado para que algumas etapas deste trabalho pudessem ser concluídas, principalmente por ter cedido as cepas e ter mantido nossos isolados.

Ao Dr José Jurberg, pelos insetos cedidos para que tudo pudesse ser realizado e finalizado.

Ao Dr Márcio Felix, pela revisão da minha dissertação e também por aceitar ser membro da banca.

A todos os membros da banca, Dr^a Suzete Gomes, Dr^a Ana Paula Legey, Dr^a Jacenir Mallet e Dr^a Denise Feder, muito obrigada por terem aceitado o convite de integrarem a banca para a defesa desta dissertação.

Ao Dr Peter Waniek, por ter me acompanhado e me ajudado em vários momentos nos experimentos, sua presença foi fundamental para que este trabalho pudesse estar concluído.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida ao longo destes dois anos.

Às agências financiadoras do projeto das defensinas: CNPq, Fiocruz-PV, Faperj - APQ1 (E-26/110.403/2011) e Faperj - Cientistas de Nosso Estado (E-26/100.456/2007).

À Dani Bilac e ao Marcos Lima do LABTRIP, por terem estado este tempo todo me ajudando não só na questão laboratorial, mas principalmente pela amizade formada, adoro vocês!

A todos do LABE, que de alguma forma me ajudaram para que essa etapa fosse concluída, principalmente a Renata Amaro.

Aos amigos da pós-graduação: Aline Schilithz, Ana Paula Gomes, Carol Valente, Carol Fonseca, Cesar Coelho, Karlinha Bitencourth, Renata Rocha e Rebecca Leal pelas ótimas risadas e por terem dividido esse momento tão especial.

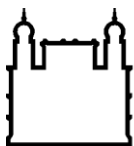
E claro, à nossa queridíssima representante, que mora no coração, Carol Dale, por ter aturado muuuuuitas reclamações, ter tirado dúvidas e estar sempre correndo atrás dos nossos direitos, TE ADORO!

Às minhas amigatonas que tanto amo, Alyne Félix, Grazi Freitas, Laís Bessa, Jackie Lopes e Quel Santos, por compreenderem minha ausência muitas vezes e principalmente por não saírem do meu lado. AMO MUIIIITO!

Às minhas mais que amigatonas, as madrinhas da Clarinha, Nata Ardente, Suka Bernardo e Paulinha Fontoura...não tenho palavras para descrever a importância de vocês na minha vida (e agora na da Clarinha também) e, portanto, o quanto vocês colaboraram nessa minha etapa acadêmica também. AMO DEMAIS, muito obrigada por tudo!

Aos meus alicerces, Maria Bastos (mãe) e Iracy Bastos (vó), com certeza sem o apoio, a presença, o carinho, a paciência, o incentivo e principalmente o amor de vocês duas, eu não teria conseguido dar um passo sequer. Peço à Deus que continue dando muita saúde a vocês e que Ele continue permitindo que eu desfrute da companhia e desse amor incondicional de vocês. MUITO OBRIGADA! AMO VOCÊS!!

A vida vai ficando cada vez mais dura perto do topo (Friedrich Nietzsche, 1844-1900).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Infecção natural de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, Caicó, Rio Grande do Norte, pelo *Trypanosoma cruzi* e o estudo de peptídeos antimicrobianos em diferentes espécies de triatomíneos (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae)
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Ana Carolina Bastos de Lima

Triatoma brasiliensis é um dos vetores da doença de Chagas no Nordeste do Brasil, apresentando altos índices de infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. No presente estudo, dois aspectos foram abordados: primeiro a coleta de exemplares de *T. b. brasiliensis* oriundos de Caicó, RN, para análise de infecção natural por *T. cruzi*, em períodos diferentes (abril e novembro de 2011). O segundo aspecto abordado está relacionado ao estudo do gene que codifica defensinas como marcador molecular filogenético para a análise de diferentes espécies de triatomíneos, incluindo o complexo *T. brasiliensis*, além de exemplares de *T. b. brasiliensis* coletados em Caicó. Em relação à infecção natural de *T. b. brasiliensis* por *T. cruzi* observamos um alto índice (86%), mais especificamente na localidade de Penedo. Também foi observado que não houve diferenças significativas entre as expedições realizadas nos períodos de chuva (abril de 2011) e seca (novembro de 2011). Além disso, cinco isolados de *T. cruzi* foram caracterizados molecularmente por duas metodologias: mini-exon, 24S α rDNA e 18S rDNA. Como resultados observamos os dois genótipos (Tcl e TcII) circulando em Caicó. Foram obtidas sequências do gene que codifica defensina, onde diferentes isoformas deste gene puderam ser identificadas e caracterizadas nas diferentes espécies de triatomíneos estudadas. A espécie *Panstrongylus megistus* ficou nos mesmos clados que representantes do gênero *Rhodnius*. Houve uma clara separação dos clados em relação aos gêneros *Triatoma* e *Rhodnius*. Com relação aos membros do complexo *T. brasiliensis*, não foi possível uma clara distinção entre as espécies pelo fato da molécula de defensina apresentar menos que 500 bp em seu tamanho, além de ser bastante conservada, não sendo portanto um bom marcador para separar grupos muito proximamente relacionados.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Natural infection of *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, Caicó, Rio Grande do Norte by *Trypanosoma cruzi* and the study of antimicrobial peptides in different triatomine species (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Ana Carolina Bastos de Lima

Triatoma brasiliensis is one of the main Chagas disease vectors in Northeastern Brazil, presenting a high natural *Trypanosoma cruzi* infection rate. In the present work, two different aspects were investigated: First, triatomines of the subspecies *T. b. brasiliensis* were collected in Caicó, RN for analysis of natural infection by *T. cruzi* in two dissimilar periods (April and November 2011). The second aspect is related to use of defensin encoding genes as a phylogenetic marker for the study of different triatomine species, mainly the *T. brasiliensis* species complex, including *T. b. brasiliensis* specimens from Caicó. The results showed a high infection rate (86%) of *T. b. brasiliensis* from Caicó by *T. cruzi*, especially in insects from Penedo. No significant differences between the rainy period (April 2011) and dried season (November 2011) could be observed. In addition, five *T. cruzi* isolates were cultivated and characterized by three different molecular methods (mini-exon, 24S α rDNA and 18S rDNA). The results showed the presence of TcI and TcII genotypes circulating in Caicó. Defensin encoding genes were amplified and sequenced for different triatomine species, showing three differing forms. *Panstrongylus megistus* clustered together with representatives of the genus *Rhodnius*. A separation between the genus *Triatoma* and *Rhodnius* could also be detected. However, inside of the *T. brasiliensis* species complex the taxa could not be well separated. Since this molecular marker has a size of less than 500 bp and is highly conserved defensin encoding sequences might not be a good marker to separate closely related species and subspecies.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 Triatomíneos e as espécies estudadas	4
1.2.1 Complexo <i>Triatoma brasiliensis</i>	6
1.3. Caicó – Rio Grande do Norte	9
1.4 Peptídeos antimicrobianos e as defensinas	12
1.5 Justificativa	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Área de estudo	16
3.2. Origem de insetos	16
3.3 Infecção natural por <i>T. cruzi</i>	16
3.4 Origem dos isolados e caracterização molecular das cepas de <i>T. cruzi</i>	17
3.5 Extração de RNA, DNA genômico e PCR	17
3.6 Análise filogenética	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Coleta de insetos	19
4.2 Infecção natural por <i>T. cruzi</i>	19
4.3 Caracterização molecular das cepas de <i>T. cruzi</i>	21
4.4 Análise das sequências dos genes que codificam defensina	22
4.5 Análise filogenética	25
5 DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÕES	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8 APÊNDICES E/OU ANEXOS	52
Anexo 1	52
Anexo 2	54

Anexo 3.....	55
---------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de desenvolvimento do parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> (Garcia et al. 2007).	2
Figura 2 - Os cinco membros do complexo <i>Triatoma brasiliensis</i>	9
Figura 3 - Mapa de localização do município de Caicó, RN. (fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:RN-mapa-Caic%C3%B3.png)	10
Figura 4 – Caicó, fisionomia da localidade.	11
Figura 5 - Caicó/Penedo, fisionomia da localidade.....	11
Figura 6 - Estrutura secundária da molécula de defensina A de inseto (Ganz 2003).	12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número total de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* coletados, analisados e infectados por *Trypanosoma cruzi*, em Caicó e outras localidades - RN, em abril e novembro de 2011.....20

Tabela 2 - Número total de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* adultos coletados, analisados e infectados por *Trypanosoma cruzi* em diferentes pontos de coleta em Penedo, Caicó – RN em novembro de 2011.20

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas e o *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas acomete aproximadamente 8 milhões de pessoas no mundo todo, sobretudo na América Latina, sendo um dos maiores problemas de saúde pública (WHO 2013). A principal via de transmissão do parasito, causador da doença de Chagas, é o contato com fezes de vetores, insetos conhecidos como triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), que apresentam formas metacíclicas infectantes de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) nas fezes (Figura 1) (Kollien & Schaub 2000, Garcia et al. 2007, Araújo et al. 2009). Entretanto, outras formas de transmissão do *T. cruzi* também podem ocorrer, como transplante de órgãos, transfusão sanguínea e via oral (Dias 2006a, b).

Trypanosoma cruzi está amplamente distribuído no continente americano e, inicialmente, este parasito foi visualizado no intestino de triatomíneos em Lassance, Minas Gerais pelo cientista Carlos Chagas, que também descreveu a presença destes flagelados em reservatórios (Chagas 1909).

A doença de Chagas é caracterizada pelo amplo espectro de desfechos clínicos, variando em severidade desde infecções assintomáticas até as formas graves relacionadas aos danos cardíacos, assim como no trato digestivo (Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda 2003, Dias 2006a, Coura 2007). Essa doença é também conhecida como tripanossomíase americana e apresenta 3 características: a aguda, a crônica e a congênita. Na fase aguda, em alguns casos, pode haver hiperplasia linforeticular no ganglio linfático, fígado e baço, além da presença de macrófagos invadidos por células parasitárias. Em outros casos, ou concomitantemente, pode haver miocardite aguda difusa, com edema intertissular, hipertrofia das fibras miocárdicas e dilatação das cavidades cardíacas. A fase crônica se desenvolve em 30% dos casos, na qual o indivíduo pode apresentar, principalmente, três formas: indeterminada, digestiva e cardiopatia chagásica. A forma congênita ocorre em mulheres grávidas, apresentando lesão na placenta, favorecendo a penetração de *T. cruzi* (Coura 2007, Coura & Viñas 2010).

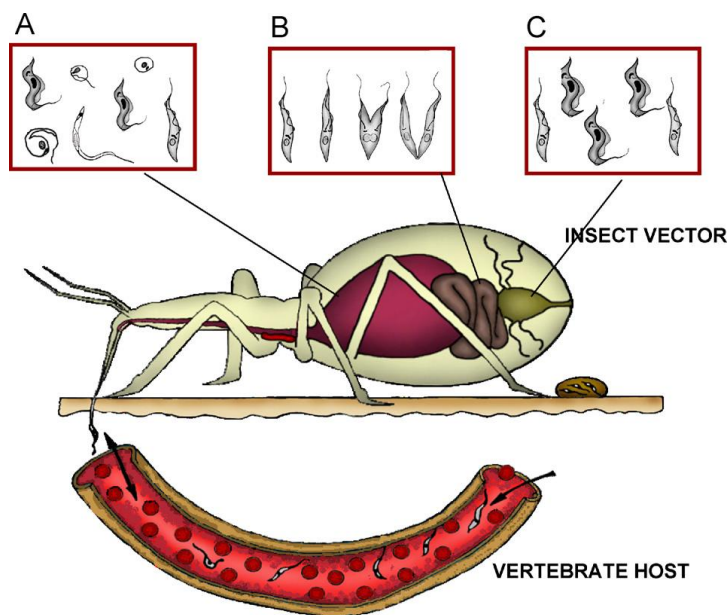


Figura 1- Ciclo de desenvolvimento do parasita *Trypanosoma cruzi* (Garcia et al. 2007).

A epidemiologia da doença de Chagas está em constante transformação e conforme mencionado anteriormente, a transmissão vetorial de *T. cruzi* constitui-se na via mais importante, sendo propiciada por espécies de vetores que infestam domicílios. Dentre as espécies mais importantes citamos: *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) e *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (Dias 2000, Coura & Dias 2009, Noireau et al. 2009). Esses vetores por serem capazes de colonizar ecótopos silvestres, peridomiciliares e domiciliares além de apresentarem outras características biológicas que favoreçam a transmissão de *T. cruzi*, são considerados de grande importância epidemiológica, como é o caso de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Costa et al. 1998, 2003a, Silveira & Vinhaes 1999, Borges et al. 2005, Sarquis et al. 2010).

Com o acordo do Cone Sul feito entre Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e, mais tarde, Peru, objetivando o controle vetorial utilizando inseticidas, as populações de *T. infestans* (até então a principal espécie vetora da doença), foram eliminadas ou reduzidas, resultando em uma diminuição na transmissão vetorial nesses países (Silveira & Vinhaes 1999, Dias et al. 2002, Costa et al. 2003a). Porém, juntamente com a constante atividade antrópica também em ambientes silvestres, várias outras espécies de triatomíneos ocuparam os nichos deixados vagos por *T. infestans*, possibilitando, assim, a formação de novos ciclos de transmissão da doença de Chagas no peri e intradomicílio por espécies

autóctones (Silveira & Vinhaes 1999, Costa 1999, Costa et al. 2003a). Desta forma, após o controle vetorial de *T. infestans*, uma das espécies que passou a ter grande importância para o Ministério da Saúde do Brasil foi *T. brasiliensis*, passando a ser considerada o principal vetor da tripanossomíase americana na região semi-árida do nordeste brasileiro (Costa et al. 2003a, Costa & Lorenzo 2009).

Com relação ao parasita, *T. cruzi*, é um hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae de grande variabilidade genética (Miles et al. 1977, 1978, Tibayrenc et al. 1986, 2010) e suas características bioquímicas, biológicas e através de lectinas puderam ser analisadas e registradas evidenciando sua estrutura multiclonal (Tibayrenc & Ayala 1988, Fernandes et al. 1998, 2001, Pinho et al. 2000, Araújo et al. 2002). A sua heterogeneidade intraespecífica tem sido extensivamente investigada por vários métodos bioquímicos, biológicos e moleculares (Dvorak 1984, Tibayrenc & Ayala 1988, Fernandes et al. 1998, Burgos et al. 2007, Llewellyn et al. 2009).

Os primeiros estudos sobre a diversidade genética das subpopulações de *T. cruzi* foram realizados por Miles e colaboradores (1977) quando analisaram o polimorfismo isoenzimático de isolados obtidos de casos humanos e de mamíferos e vetores silvestres e domésticos. Desta forma, inicialmente, conseguiu-se identificar três zimodemas que foram correlacionados com o ciclo de transmissão do parasita no Brasil: zimodema 1 (Z1) e o zimodema 3 (Z3), associados ao ciclo de transmissão silvestre, enquanto o zimodema (Z2) foi associado ao ciclo de transmissão doméstico (Miles et al. 1977, Barrett et al. 1980). Posteriormente, estudos mostraram que as diferentes subpopulações do *T. cruzi* foram agrupadas em dois genótipos distintos, distantes e independentes filogeneticamente: TcI e TcII (Souto et al. 1996, Zingales et al. 1998). Brisse e colaboradores (2000, 2001) desenvolveram estudos sobre DTUs classificando o parasita em seis subdivisões: TcI, TcIIa-e, onde recentemente, na tentativa de melhor entender a estrutura populacional que compõe o táxon *T. cruzi*, foi proposto por um novo comitê uma nova nomenclatura, a saber: TcI-TcVI (Zingales et al. 2009, 2012).

Considerando seus habitats e hospedeiros, *T. cruzi* é um parasita eclético transmitido em uma rede parasitária bem estabelecida em todos os biomas (Garcia et al. 2007, Araújo et al. 2009). Além disso, estudos apontam para a existência de dois ciclos principais de transmissão de *T. cruzi*: (i) ciclo de transmissão silvestre, no qual o parasita circula entre os animais silvestres, incluindo uma grande diversidade de espécies de mamíferos e de triatomíneos e (ii) ciclo de transmissão doméstico, no

qual humanos e animais domésticos e sinantrópicos estão envolvidos (Fernandes et al. 1998, 1999, Jansen et al. 1999).

Atividades antrópicas, que muitas vezes alteram drasticamente o ambiente silvestre, podem favorecer a domiciliação de insetos silvestres nas habitações humanas e podem, também, explicar a associação destes dois ciclos de transmissão. A complexidade da transmissão de *T. cruzi* está claramente documentada pelas recentes infecções orais, nas quais estão ocorrendo com aumento frequente em diferentes regiões do Brasil, independentemente de domiciliação de triatomíneos (Dias 2006b, Steindel et al. 2008).

Vale a pena ressaltar que apesar da interação de *T. cruzi* com diferentes reservatórios na natureza estar bem compreendida, é evidente que não somente os mamíferos, mas também os triatomíneos são capazes de selecionar subpopulações de *T. cruzi*, agindo assim, como filtros biológicos (Araújo et al. 2009). Além disso, o bioma, a diversidade de população de animais silvestres, os micro-climas, e as diferentes áreas geográficas também são aspectos muito importantes que podem estar exercendo influências nestas interações (Coura et al. 2002, Cox et al. 2004, Araújo et al. 2009, Noireau et al. 2009).

1.2 Triatomíneos e as espécies estudadas

Os vetores da doença de Chagas são insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae), denominados triatomíneos. São percevejos hematófagos obrigatórios, vulgarmente conhecidos como barbeiro, chupão, pocotó, fincudo, bicão entre outros nomes (Lent & Wygodzinsky, 1979). Estes insetos sofrem metamorfose incompleta (hemimetabólicos) e desenvolvem-se a partir do ovo até a fase adulta, incluindo cinco estádios ninfais. O tempo de desenvolvimento pode variar de acordo com a espécie e também de acordo com as condições ambientais e climáticas (Lent & Wygodzinsky 1979, Jurberg & Galvão 2006).

Atualmente, a subfamília Triatominae está constituída por 147 espécies agrupadas em 18 gêneros e 5 tribos (Galvão & Angulo 2006, Costa & Felix 2007, Martínez et al. 2007, Bérenger & Blanchet 2007, Jurberg et al. 2009, Frías-Lassere 2010, Rosa et al. 2012, Gonçalves et al. 2013). Deste total, 63 ocorrem no Brasil e 36 destas espécies são endêmicas. O Brasil é o país onde está registrada a maior diversidade da fauna triatomínica, que ocorre principalmente no Cerrado e na Caatinga (Costa & Lorenzo 2009, Gurgel-Gonçalves et al. 2012).

Dessas 147 espécies, a grande maioria ocorre apenas no ambiente silvestre e não apresenta importância para a transmissão da doença para humanos como, por exemplo: *Cavernicola lenti* Barrett & Arias, 1985 e *Cavernicola pilosa* Barber, 1937, ambas associadas a morcegos; e espécies do gênero *Psammolestes* (*Psammolestes coreodes* Bergroth, 1911, *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1985 e *Psammolestes arthuri* Pinto, 1926), que estão associadas a pássaros (Lent & Wygodzinsky 1979, Galvão et al. 2003). Apenas cerca de uma dezena de espécies apresentam importância epidemiológica por serem capazes de colonizar o domicílio humano, onde cerca de 80% dos casos da doença de Chagas são transmitidos (Galvão et al. 2003, Schofield & Galvão 2009).

No Brasil, as espécies consideradas de importância primária são: *T. infestans* (que hoje ocorre apenas em alguns focos residuais devido às eficazes medidas de controle), *Panstrongylus megistus* Stål, 1859 e *T. brasiliensis*. As principais espécies secundárias são: *Triatoma sordida* (Stål, 1859), *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola 1964, *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, *Rhodnius nasutus* Stål, 1859, *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto 1923), *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), entre outras (Lent & Wygodzinsky, 1979, Silveira & Vinhaes 1999, Costa & Lorenzo 2009).

A seguir são mencionadas algumas características ecológicas de espécies que apresentam importância epidemiológica para a transmissão da doença de Chagas e que foram utilizadas neste estudo:

Rhodnius prolixus é um dos vetores da doença de Chagas mais eficientes, sendo considerado o segundo vetor mais importante. Mostra-se bem adaptado aos habitats peri e intradomiciliares, especialmente na América Central, Venezuela e Colômbia, onde é considerado como um importante vetor doméstico de *T. cruzi*, porém, no Brasil tem importância secundária (Schofield & Galvão 2009). Sua distribuição tem mostrado uma notável descontinuidade e apesar de estar amplamente distribuído em partes da Venezuela e da Colômbia e em outros países da América Central, nunca foi registrado no Panamá e nem no sudeste ou na parte central da Costa Rica (Dias 1953, Schofield 1989). No ecótopo silvestre, *R. prolixus* encontra-se principalmente adaptado a palmeiras e ninhos de *Mycteria americana*.

Rhodnius nasutus é predominantemente encontrado na Caatinga, na Região Nordeste do Brasil, habitando palmeiras da espécie *Copernicia prunifera*, podendo ser encontrado também em outras palmeiras e árvores deste bioma (Pinto & Bento 1986, Sarquis et al. 2004, Lima & Sarquis 2008). Apesar de ser considerada como

uma espécie endêmica da Caatinga, existem registros de *R. nasutus* em áreas de transição com a Floresta Amazônica e também com o Cerrado (Batista & Gurgel-Gonçalves 2009).

Panstrongylus megistus é uma espécie de ampla distribuição geográfica (Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Uruguai). No Brasil é a mais amplamente distribuída, estando registrada em 22 estados, podendo ser encontrada tanto na Mata Atlântica, como no Cerrado e na Caatinga (Silveira 2011, Gurgel-Gonçalves et al. 2012). Apresenta níveis distintos de adaptação aos ecótopos domiciliares, dependendo da região do país (Forattini 1980, Dias et al. 2000, Villela et al. 2009). Na Região Sul é considerado silvestre (Ramos et al. 2008). É uma espécie que está associada a ambientes com altos níveis de umidade, entretanto pode ser também encontrada na Região Nordeste do Brasil, em microclimas mais secos. Nessa região, infesta frequentemente o intra e o peridomicílio (Barreto 1979, Sherlock 1979, Forattini 1980, 2006, Patterson et al. 2009). É comumente encontrado em palmeiras, ocos de árvores, associado a marsupiais, o que explica seus altos índices de infecção natural (Forattini et al. 1977, Patterson et al. 2009).

Triatoma sordida apresenta ampla distribuição geográfica em diferentes países da América Latina (Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai). No Brasil, ocorre em vários estados (Piauí, Pernambuco, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Está amplamente distribuído no Cerrado, podendo ser encontrado em outros biomas, como Pantanal e Caatinga (Lent & Wygodzinsky 1979). Nos ecótopos naturais é encontrado habitando cascas de árvores e ninhos de pássaros. Em ambientes antropizados é encontrado, principalmente, no peridomicílio, em galinheiros e em áreas que no passado foram usadas para atividades agrícolas (Forattini et al. 1971, 1980, Carcavallo et al. 1988, Diotaiuti et al. 1993, Klink & Machado 2005). Apesar das altas infestações registradas por *T. sordida* no peridomicílio, esta espécie não é considerada um bom vetor da doença devido ao seu alto grau ornitófilico e baixos índices de infecção natural por *T. cruzi* (Forattini et al. 1971, Diotaiuti et al. 1998, Argolo et al. 2008).

1.2.1 Complexo *Triatoma brasiliensis*

Estudos multidisciplinares (morfológicos, biológicos, ecológicos, isoenzimáticos e de sequências de DNA mitocondrial) mostraram que o complexo *Triatoma brasiliensis* é constituído por 2 subespécies e 3 espécies que ocorrem em

áreas geográficas distintas: *Triatoma brasiliensis brasiliensis* Neiva, 1911; *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão 1956; *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941; *Triatoma juazeirensis* Costa & Felix, 2007; e *Triatoma sherlocki* Papa et al. 2002 (Figura 2) (Costa 1997, Costa et al. 1997a, 1997b, 1998, 2002, 2003b, Monteiro et al. 2004, Mendonça et al. 2009, Costa et al. 2013, no prelo).

Apesar das diferenças morfológicas, ecológicas e genéticas observadas neste grupo, progenes viáveis foram produzidas através de cruzamentos experimentais sob condições laboratoriais entre todas as possíveis combinações, sugerindo uma origem monofilética para o grupo (Costa et al. 2003b, Correia et al. 2013, no prelo). Como resultado taxonômico de tais estudos, uma nova espécie foi descrita, *T. juazeirensis* (Costa & Felix 2007) e a subespécie *T. b. melanica* foi elevada à categoria de espécie, sendo então *T. melanica* (Costa et al. 2006). Mais recentemente, *T. b. macromelasoma* foi redescrito e seu *status* como subespécie foi revalidado (Costa et al. 2013, no prelo). Estudos morfológicos recentes e de análise das sequências de 2 genes distintos do citocromo B entre as espécies do complexo, confirmaram a inserção de *T. sherlocki* neste grupo, além de sugerirem que este táxon se trata de uma espécie-irmã de *T. melanica*, com forte suporte cladístico segundo Mendonça et al. (2009). A seguir listamos os membros do complexo *T. brasiliensis* e suas principais características ecológicas e epidemiológicas com base principalmente nos estudos realizados por Costa et al. (1998, 2003a, 2013, no prelo).

Triatoma b. brasiliensis ocorre nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba. Está amplamente distribuído na Caatinga, sendo encontrado com variáveis percentuais de infecção natural por *T. cruzi* e por isso considerado como a principal espécie vetora em áreas semiáridas do nordeste brasileiro. É considerado de maior importância epidemiológica quando comparado aos outros membros deste complexo de espécies. Pode ser encontrado em diferentes ecótopos no ambiente silvestre, habita frequentemente fendas de rochas em associação com roedores e outros animais que apresentam níveis significativos de infecção natural por *T. cruzi* (Alencar 1987, Costa et al. 1998). Nos ecótopos peridomiciliares pode ser encontrado em galinheiros, currais, cercas de madeira, muros de pedras, etc. No intradomicílio pode também desenvolver infestações numerosas.

Triatoma b. macromelasoma está distribuído no estado de Pernambuco. Encontra-se tanto no ambiente silvestre (em pedregais), quanto, principalmente, no peridomicílio, raramente infesta o interior das residências (Argolo et al. 2008).

Triatoma melanica está geograficamente restrito ao norte de Minas Gerais e ao sul da Bahia. Esta espécie é encontrada exclusivamente no ambiente silvestre (em pedregais) e tem capacidade de invadir os domicílios, principalmente nos períodos de seca. Não existem registros desta espécie colonizando o interior dos domicílios (Argolo et al. 2008).

Triatoma juazeirensis está restrito ao estado da Bahia e é encontrado no ambiente silvestre (em pedregais) e no peridomicílio, podendo infestar o intradomicílio. Seus índices de infecção natural variam de localidade para localidade (Argolo et al. 2008).

Triatoma sherlocki era considerado, originalmente, como sendo exclusivamente silvestre, baseando-se nos exemplares coletados no município de Gentio do Ouro, Bahia (Papa et al. 2002). Apesar de ter sido descrito, primeiramente como uma subespécie de *T. brasiliensis* (Cerqueira 1982), *T. sherlocki* foi considerado como estando relacionado com *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967. Existem poucos estudos a respeito desta espécie, sendo somente conhecida em sua localidade-tipo: o distrito de Santo Inácio, no município de Gentio do Ouro, Bahia. Mais recentemente, estudos moleculares mostraram que *T. sherlocki* deveria ser incluído no complexo *T. brasiliensis* (Mendonça et al. 2009) e que, apesar de suas características morfológicas bem diferenciadas em comparação com os outros membros do complexo, híbridos férteis foram obtidos através de cruzamentos experimentais entre todos os membros desse complexo de espécies. Um achado interessante foi o encontro de *T. sherlocki* colonizando o intradomicílio apresentando significativo índice de infecção natural (Almeida et al. 2009).

Os índices de infecção natural das subespécies e espécies que constituem este complexo variam ao longo de suas distribuições geográficas sendo, portanto, um interessante modelo para estudos sobre a ecologia da doença de Chagas e dispersão de *T. cruzi*, além de podermos explorar questões ligadas à interação parasito-vetor (Silveira & Vinhaes 1999, Costa et al. 2002, 2003a, 2006, 2009, Costa & Felix 2007, Costa & Lorenzo 2009).

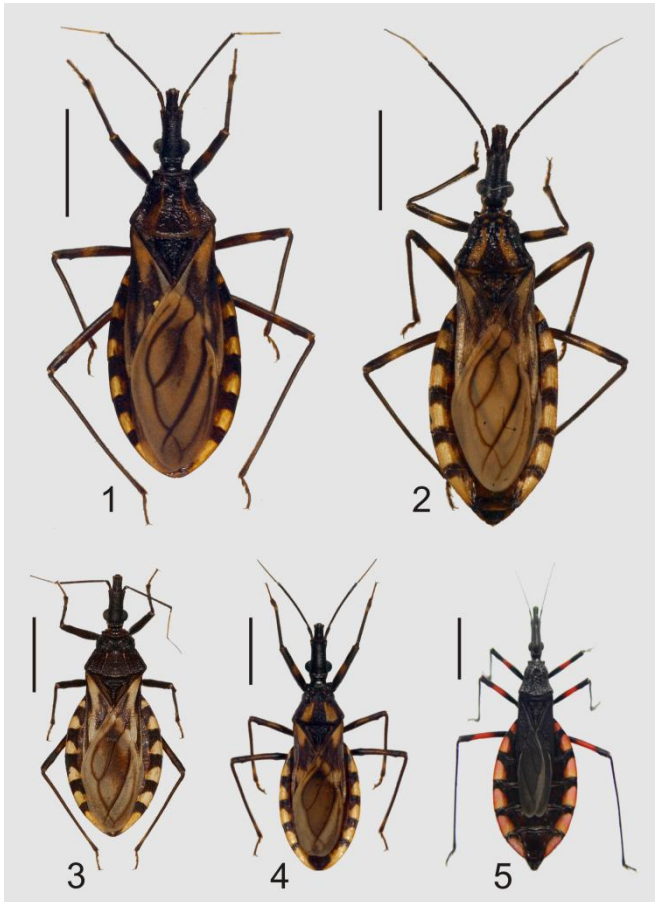


Figura 2 - Os cinco membros do complexo *Triatoma brasiliensis*.
(1) *T. brasiliensis macromelasoma*, (2) *T. brasiliensis brasiliensis*, (3) *T. juazeirensis*, (4) *T. melanica*, (5) *T. sherlocki*. Escala: 5 mm (Costa et al. 2013, no prelo).

1.3. Caicó – Rio Grande do Norte

Caicó é um município brasileiro pertencente ao estado do Rio Grande do Norte. Principal cidade da região do Seridó, região centro-sul do estado distante 256 km da capital estadual, Natal. Seu território ocupa uma área de 1.228,574 km², o equivalente a 2,33% da superfície estadual, posicionando-o como o quinto município com maior extensão do Rio Grande do Norte (Figuras 3 e 4). Localizada na confluência dos rios Seridó e Barra Nova, na microrregião do Seridó Ocidental, exibe uma altitude média de 151 metros (IBGE 2010) (Figura 5).

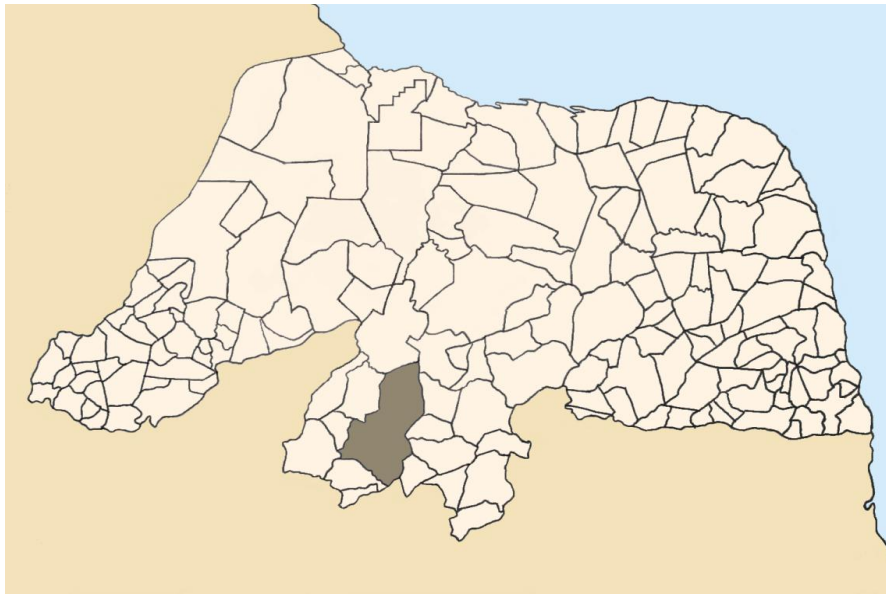


Figura 3 - Mapa de localização do município de Caicó, RN. (fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:RN-mapa-Caic%C3%B3.png>)

A população de Caicó, em 2011, estava em torno de 63.147 habitantes, o que a colocou como a sétima cidade mais populosa do estado, sendo a segunda mais populosa do interior do Rio Grande do Norte, com uma densidade populacional de 51 habitantes por km² (IBGE 2010).

O clima é do tipo semiárido com sua estação chuvosa atrasando-se para outono sujeito a regime irregular de chuvas, acontecendo entre os meses de fevereiro a maio, com média de precipitação pluviométrica anual de 716,6 mm. O município apresenta grande amplitude térmica, com média de 27,5°C, mínima de 18,0°C e máxima de 33,3°C (IDEMA 2011).

Conhecida como Caatinga Subdesértica do Seridó - vegetação mais seca do estado e segunda mais árida da Caatinga - é caracterizada pela vegetação baixa, de cactos espinhentos e agressivos, agarrados ao solo, de arbustos espaçados, com capins de permeio e manchas desnudas, em terra procedente do Arqueano, muito erodida e áspera. As espécies predominantes nesta localidade são: a jurema, o pinhão bravo, o pereiro, o xiquexique, a faveleira, a malva rasteira, o angico, o pau-branco, o marmeleiro e o mata pasto (Duque 2004).

Estudos feitos por Costa e colaboradores (1998, 2003a), abordando algumas cidades do Rio Grande do Norte, incluindo Caicó, demonstraram que a taxa de infecção natural por *T. cruzi* em *T. brasiliensis* para esta região é de 15% para o

município e de 4,5% para o estado. Estudos nesta localidade tornam-se importantes por ser a localidade-tipo de *T. b. brasiliensis*, por apresentar altas infestações por esta subespécie, tanto em ambientes naturais como em ecótopos artificiais, e também pelo fato da região estar sob forte impacto ambiental, devido principalmente à taxa de crescimento da população humana e ao crescimento das cidades e municípios.



Figura 4 – Caicó, fisionomia da localidade.



Figura 5 - Caicó/Penedo, fisionomia da localidade.

1.4 Peptídeos antimicrobianos e as defensinas

A imunidade inata exerce um papel de grande importância no controle de infecções por microorganismos tanto em vertebrados como em invertebrados. No caso de insetos, infecções por bactérias e/ou parasitas podem ser controladas pelos AMPs (peptídeos antimicrobianos) (Boulanger et al. 2006).

Dentro deste cenário, os AMPs são moléculas pertencentes ao sistema de imunidade humoral em insetos, sendo geralmente sintetizados em resposta a uma infecção na hemocele por bactérias, fungos ou parasitas (Hetru et al. 1998, Lamberty et al. 1999), onde a maioria destas moléculas é produzida no corpo gorduroso (equivalente ao fígado de mamíferos) ou nos hemócitos e, posteriormente, liberados para a hemolinfa dos insetos (Dimarcq et al. 1998, Lamberty et al. 1999, Lopez et al. 2003, Bulet et al. 2004, Araújo et al. 2006). Existem diferentes classes de AMPs, comumente encontrados em diferentes espécies de insetos, podendo-se mencionar as drosomicinas, dipterocinas, cecropinas, atacinas, mas destacaremos aqui as defensinas.

As defensinas são peptídeos geralmente catiônicos com peso molecular de aproximadamente 4 kDa, contendo em suas estruturas três pontes dissulfídicas, formadas por seis resíduos de cisteína e três domínios característicos: um loop amino-terminal flexível, seguido por uma α -hélice e uma β -folha anti-paralela carboxi-terminal (Bonmantin et al. 1992, Bulet et al. 1999, Ganz 2003). Estas moléculas têm sido isoladas de diferentes organismos, tais como: humanos, mamíferos, insetos e plantas, sendo consideradas como parte da resposta imune inata de diferentes espécies de insetos de diferentes ordens como: Odonata, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera e Hemiptera (Bulet et al. 1992, Ishibashi et al. 1999, Lamberty et al. 1999, Lopez et al. 2003, Ganz 2003, Bartholomay et al. 2004) (Figura 6).



Figura 6 - Estrutura secundária da molécula de defensina A de inseto (Ganz 2003).

As defensinas são moléculas abundantemente encontradas em células e tecidos que estejam relacionados à defesa contra microorganismos e possuem atividade principalmente contra bactérias Gram-positivas, apesar de também possuírem ação contra bactérias Gram-negativa e fungos (Ganz 2003, Thevissen et al. 1999, 2004). Dentro do grupo de defensinas, existem duas principais sub-famílias: α e β defensinas, que se diferem pelo tamanho das cadeias peptídicas ao longo dos resíduos de cisteínas presentes em suas estruturas (Ganz 2003), onde em se tratando de insetos, as defensinas são do tipo α linear, também encontradas em vertebrados.

1.5 Justificativa

Triatoma brasiliensis brasiliensis é hoje um dos principais alvos para as campanhas de monitoramento e controle vetorial da doença de Chagas no nordeste do Brasil. Este vetor faz parte de um complexo de espécies que apresenta variados potenciais de transmissão de *T. cruzi* e muitos dos aspectos relacionados à interação parasita vetor ainda estão por ser explorados, não somente nas espécies do complexo *T. brasiliensis*, mas também no grupo dos triatomíneos em geral.

Para se entender a relação parasito-vetor, um dos importantes aspectos a ser abordado é o estudo da imunidade inata em triatomíneos, uma vez que o estabelecimento da infecção por *T. cruzi* no intestino depende de diferentes fatores bioquímicos e fisiológicos.

O presente trabalho abordou como primeiro aspecto a avaliação da presença ou não de *T. cruzi* nas fezes dos exemplares de *T. b. brasiliensis* coletados em Caicó, bem como a caracterização das cepas de *T. cruzi* provenientes destes insetos. O segundo aspecto abordado, foi o estudo filogenético com base nas sequências de genes que codificam defensina nos diferentes membros do complexo *T. brasiliensis*, inclusive exemplares de *T. b. brasiliensis* coletados em áreas do município de Caicó (Rio Grande do Norte) que é a localidade-tipo dessa subespécie.

Neste contexto, *T. b. brasiliensis* capturados naturalmente infectados no campo foram avaliados para saber se poderiam apresentar polimorfismos nas sequências das diferentes isoformas de defensinas, quando comparados com *T. brasiliensis* não infectados. Além de uma análise filogenética entre os membros do complexo *T.*

brasiliensis, diferentes isoformas de defensinas também foram identificadas e caracterizadas de outras espécies de triatomíneos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a infecção natural por *Trypanosoma cruzi* de exemplares de *T. b. brasiliensis* coletados em Caicó, Rio Grande do Norte, bem como isolar e caracterizar diferentes isoformas do gene que codifica defensina nos diferentes membros do complexo *T. brasiliensis* além de outras espécies de triatomíneos.

2.2 Objetivos Específicos

- 1- Confirmar os índices de infecção natural por *T. cruzi* observados em Caicó (duas expedições em períodos diferentes), Rio Grande do Norte.
- 2- Realizar a caracterização molecular das cepas de *T. cruzi* isoladas de exemplares de *T. b. brasiliensis* coletados no município de Caicó.
- 3- Identificar e caracterizar os genes que codificam defensinas para os membros do complexo *T. brasiliensis*: *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki* além de outras espécies triatomínicas.
- 4- Realizar um estudo filogenético entre os membros do complexo *T. brasiliensis* e outras espécies de triatomíneos comparando as sequências dos genes que codificam as defensinas obtidas deste estudo com as sequências de outros insetos anteriormente caracterizadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Foram realizadas duas expedições a Caicó, onde exemplares de *T. b. brasiliensis* foram coletados. A primeira expedição ocorreu em abril de 2011, com três localidades estudadas neste município, a saber: Penedo, Pedra do Sino e Ilha Santana. Duas outras localidades pertencentes a outros dois municípios adjacentes também foram estudadas: Mulungu - São João de Sabugi e Fazenda - São Fernando. A segunda expedição ocorreu em novembro do mesmo ano, sendo somente considerada a localidade de Penedo - Caicó.

3.2. Origem de insetos

Em Caicó, foram coletados exemplares de *T. b. brasiliensis* para o estudo da infecção natural por *T. cruzi*.

Ninfas de 5º estágio (N5) de *T. b. macromelasoma* e *T. melanica* foram obtidas da colônia pertencente ao Laboratório de Biodiversidade Entomológica (IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro). Ninfas de 5º estágio (N5) de *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *P. megistus*, *T. sordida*, *R. nasutus* e *R. prolixus* foram cedidas gentilmente pelo Dr. José Jurberg (Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos - IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro), além de ninfas de 5º estágio (N5) de *R. prolixus* também cedidas gentilmente pela Dr^a Patrícia Azambuja (Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos – IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro). Todas essas espécies triatomínicas foram utilizadas para o estudo filogenético tendo como marcador molecular genes que codificam defensinas.

3.3 Infecção natural por *T. cruzi*

Somente exemplares adultos de *T. b. brasiliensis* coletados em Caicó, provenientes das duas expedições, foram analisados. Para esta análise, os insetos foram submetidos à compressão abdominal e as fezes coletadas foram depositadas

em lâminas contendo solução salina (PBS, pH 7.2), para a posterior checagem da presença ou não de *T. cruzi*, utilizando microscópio óptico.

3.4 Origem dos isolados e caracterização molecular das cepas de *T. cruzi*

Os isolados de *T. cruzi* foram obtidos de cinco exemplares de *T. b. brasiliensis* coletados em Caicó (abril de 2011). Os parasitas foram cultivados em meio de cultura McNeal, Novy e Nicolle (NNN), contendo infusão de fígado e triptose (LIT), suplementado com 10% de soro fetal de bovino (Chiari & Camargo 1984, Araújo et al. 2007, 2008, 2011). A manutenção dos isolados de *T. cruzi* foi gentilmente realizada pelo Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos/IOC. As culturas de *T. cruzi* foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2) e centrifugadas a 2800g para a extração de DNA genômico. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, USA), seguindo protocolo do fabricante. Foi feita amplificação do gene de mini-exon por PCR seguindo a metodologia de Fernandes et al. (1998). Os domínios de 24S α rRNA e 18S rRNA também foram amplificados pela reação PCR, anteriormente descrito por Brisse et al. (2001) e Araújo et al (2011). Para a visualização dos produtos amplificados, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 2% e 4%, respectivamente, sendo os géis corados com brometo de etídeo.

3.5 Extração de RNA, DNA genômico e PCR

Para a extração de RNA e DNA genômico, foram utilizados o trato digestivo de dez ninfas de 5^o estágio (N5) de cada espécie de triatomíneo estudada. Ambas as extrações foram realizadas utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA) e SV Genomic DNA Purification System kit (Promega, Madison, USA), respectivamente, seguindo protocolos do fornecedor. A transcrição reversa foi realizada conforme descrito anteriormente por Araújo et al. (2006) e Waniek et al. (2009a,b, 2012).

As amplificações do gene que codifica defensina para todas as espécies vetoras estudadas foram feitas pela técnica de PCR, assim como os primers foram desenhados segundo Araújo et al. (2006) e Waniek et al. (2009b). Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1% e

corados com brometo de etídeo. Posteriormente, cada fragmento obtido foi purificado utilizando o kit NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel, Germany), seguindo protocolo do fabricante. Os produtos purificados foram sequenciados, no mínimo três vezes nos sentidos forward (3'-5') e reverse (5'-3') cada, através da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, o que resultou no total em torno de 400 sequências. Entretanto, considerando todo o experimento, gerou-se um total de 600 sequências obtidas do sequenciamento, mas muitas não serviram para o presente estudo. As sequências obtidas com sucesso foram analisadas utilizando o programa Clustal W, Versão 1.83 (Thompson et al. 1994) e posteriormente submetidas para o GenBank.

3.6 Análise filogenética

As árvores filogenéticas foram construídas com análise Neighbor-Joining (NJ), utilizando modelo de distância genética Kimura 2-parameter (K2P) com o programa MEGA versão 5.1 com 1000 repetições bootstrap e pairwise deletion (Tamura et al. 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Coleta de insetos

Em abril de 2011 (primeira expedição), foi coletado um total de 340 insetos em cinco localidades pertencentes a três municípios. No município de Caicó foram coletados 225 exemplares de *T. b. brasiliensis*, considerando as três localidades estudadas: Penedo (110 insetos), Pedra do Sino (72 insetos) e Ilha Santana (43 insetos). Em São João do Sabugi, 43 exemplares de *T. b. brasiliensis* foram coletados em Mulungu. Em São Fernando, 24 exemplares de *T. b. brasiliensis* foram coletados na localidade Fazenda (Tabela 1). Outras localidades pertencentes a estes municípios foram visitadas, totalizando 48 insetos coletados, entretanto nenhum exemplar foi submetido a análise de infecção natural por *T. cruzi*.

Em relação a Penedo, foram capturados 57 exemplares adultos de *T. b. brasiliensis* e 59 ninfas dessa subespécie. Em Pedra do Sino foram coletados 21 exemplares de *T. b. brasiliensis* (adultos) e 51 ninfas. Em Ilha de Santana foram coletados sete exemplares de *T. b. brasiliensis* (adultos) e 38 ninfas. Na localidade de Mulungu foram coletados dois exemplares de *T. b. brasiliensis* adultos e 41 ninfas, e por último, na localidade de Fazenda foram coletados quatro exemplares de *T. b. brasiliensis* adultos e 20 ninfas (Tabela 1). Entretanto, na segunda expedição, somente Penedo foi considerada como área de estudo, sendo coletado um total de 315 exemplares de *T. b. brasiliensis* (160 adultos e 155 ninfas) (Tabela 1).

4.2 Infecção natural por *T. cruzi*

Durante a primeira expedição, dos 340 exemplares de *T. b. brasiliensis* coletados, 127 insetos foram analisados para a checagem da presença de *T. cruzi*. Destes, 53 exemplares de *T. b. brasiliensis* (41,7%) estavam positivos para infecção por *T. cruzi* (Tabela 1). Por outro lado, na segunda expedição, o total de insetos coletados foi de 315 exemplares de *T. b. brasiliensis*, onde 144 em estágio adulto foram checados para presença de *T. cruzi*. Dos 144 insetos coletados, 125 exemplares (86,8%) estavam positivos para infecção por *T. cruzi* (Tabela 1).

Considerando a primeira expedição em Caicó, as localidades de Pedra do Sino (ecótopo peridomiciliar), Ilha Santana (ecótopo silvestre) e Penedo (ecótopo silvestre), apresentaram taxas de infecção natural por *T. cruzi* de 2,8%, 41,2% e 80%, respectivamente. Na segunda expedição, restrita somente à localidade de Penedo, foi registrada uma taxa de 86,8% (Tabela 1). Além disso, os pontos de coleta em Penedo (novembro de 2011) também apresentaram diferenças nas taxas de infecção natural devido ao diferente número de insetos coletados nestes pontos (Tabela 2). Em São João de Sabugi, na localidade chamada Mulungu, a coleta foi realizada no intradomicílio, onde dos 17 triatomíneos examinados, nenhum apresentou infecção por *T. cruzi*. Em São Fernando, na localidade Fazenda, a coleta também foi domiciliar, onde dois insetos foram analisados e somente 1 (um) apresentou infecção por *T. cruzi* (Tabela 1). Foram coletados três exemplares de *T. petrochii* habitando a mesma rocha que *T. b. brasiliensis* em Penedo (novembro de 2011).

Tabela 1 - Número total de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* coletados, analisados e infectados por *Trypanosoma cruzi*, em Caicó e outras localidades - RN, em abril e novembro de 2011

Insetos	Penedo (Abril)	Penedo (Nov)	Pedra do Sino	Ilha Santana	Mulungu	Fazenda
Coletados (adultos/ninfas/total)	54/56/110	160/155/315	21/51/72	4/38/43	2/41/43	4/20/24
Analisados*	55	144	36	17	17	2
Infectados	44 (80%)	125 (86,81%)	1 (2,78%)	7 (41,17%)	0	1

*Somente adultos foram analisados

Tabela 2 - Número total de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* adultos coletados, analisados e infectados por *Trypanosoma cruzi* em diferentes pontos de coleta em Penedo, Caicó – RN em novembro de 2011.

Insetos	Loc A	Loc B	Loc C	Loc D	Loc E
Coletados	1	23	83	10	43
Analisados	1	18	83	10	32
Infectados	1 (100%)	13 (72,2%)	78 (94%)	6 (60%)	27 (84,4%)

Loc: pontos de coleta

4.3 Caracterização molecular das cepas de *T. cruzi*

Após a amplificação do gene mini-exon dos cinco isolados de *T. cruzi* obtidos de *T. b. brasiliensis* de Caicó (primeira expedição), os resultados mostraram que os isolados TBG1, TBG2 e C5 são do tipo TcI, uma vez que apresentaram tamanho de bandas equivalentes a 350 bp (Fernandes et al. 1998). Por outro lado, os isolados E1 e TBG3 apresentaram, no perfil genotípico, bandas equivalentes ao tamanho de 300 bp, sendo considerados TcII (Figura 7).

Com relação à caracterização desses mesmos isolados utilizando os genes 24S α e 18S ribossomais, TBG1, TBG2 e C5 apresentaram bandas eletroforéticas de tamanhos 110 bp e 175 bp respectivamente, sendo portanto considerados como TcI; enquanto os isolados E1 e TBG3 apresentaram tamanhos de banda equivalentes a 125 bp e 165 bp respectivamente, sendo considerados TcII (Brisse et al. 2001) (Figura 8).

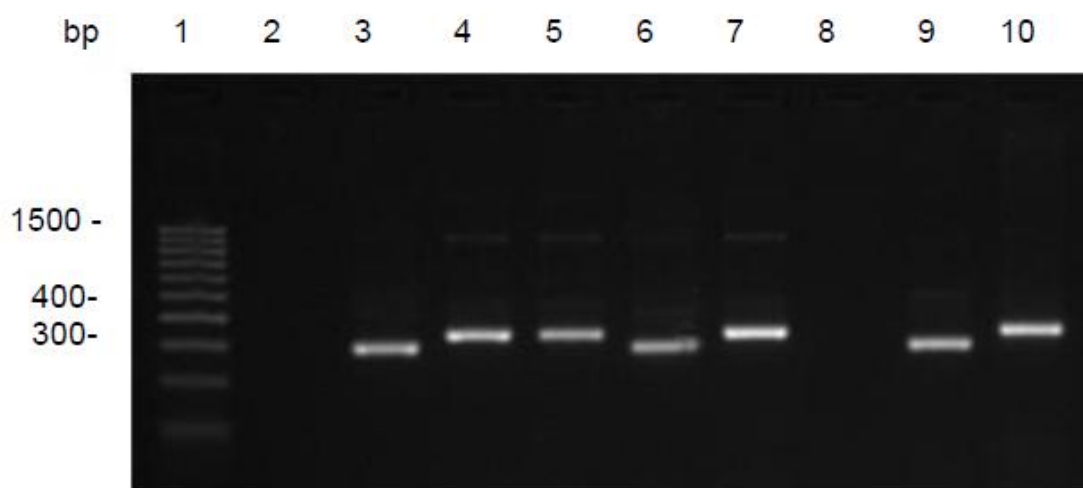


Figura 7 - Amplificação de produtos de PCR de genes Mini-exon de *T. cruzi* analisados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

Coluna: (1) marcador 100 bp (Promega, USA); (3-7) isolados de *T. cruzi* E1, TBG1, TBG2, TBG3 e C5 (todos oriundos de *T. b. brasiliensis* - Caicó, RN); (9) e (10) controles Tc2-JCA3 (*T. brasiliensis* - João Costa, Piauí) e Tc1-645 (*Didelphis marsupialis* - Teresópolis, RJ), respectivamente.

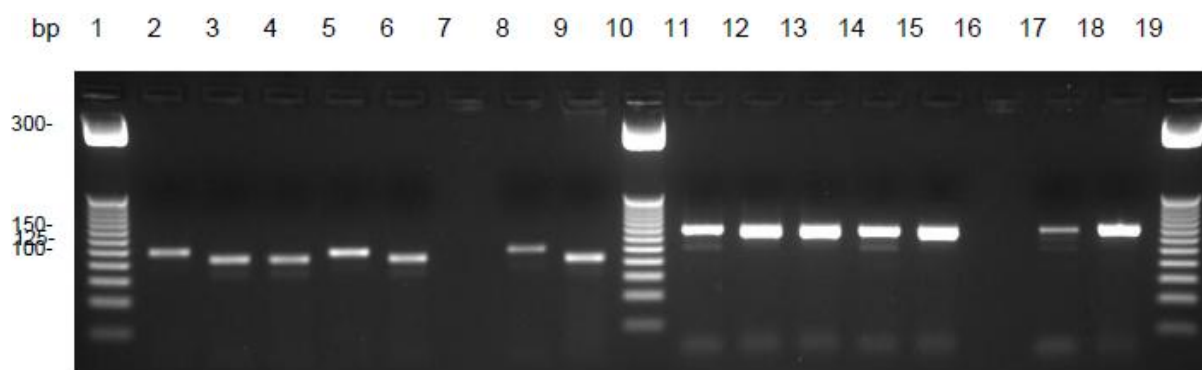


Figura 8 - Amplificação de produtos de PCR de genes 24S α rRNA e 18S rRNA de *T. cruzi* analisados em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídio.

Colunas: (1), (10) e (19) marcador 25 bp (Promega, USA); (2-6) isolados de *T. cruzi* E1, TBG1, TBG2, TBG3 e C5 (todos oriundos de *T. b. brasiliensis* - Caicó, RN); (11-15) isolados de *T. cruzi* E1, TBG1, TBG2, TBG3, C5 (todos oriundos de *T. b. brasiliensis* - Caicó, RN); (8) e (17) controle Tc2-JCA3 (*T. brasiliensis* - João Costa, Piauí); (9) e (18) controle Tc1-645 (*Didelphis marsupialis* - Teresópolis, RJ).

4.4 Análise das sequências dos genes que codificam defensina

Após o PCR com os primers específicos, transcrição reversa para a obtenção de cDNA e o alinhamento dos fragmentos de cDNA e gDNA, foram obtidas sequências de genes que codificam defensina dos membros do complexo *T. brasiliensis*, além das espécies *T. sordida*, *P. megistus*, *R. prolixus* e *R. nasutus*. Para testar a qualidade das reações de transcrição reversa e também pelo fato da actina ser um gene de expressão constitutiva, inicialmente foram feitos PCRs utilizando este gene como parâmetro para saber se todos os cDNAs obtidos das diferentes espécies de triatomíneos apresentavam qualidade para continuar os experimentos envolvendo o gene que codifica defensina. Todos os PCRs envolvendo o gene de actina funcionaram para cada cDNA obtido no estudo. Entretanto, a técnica utilizando a actina foi somente realizada para cDNA, uma vez que a transcrição reversa é uma etapa bastante crítica e nem sempre eficaz.

Com relação às sequências de cDNA obtidas de *def1* do gênero *Triatoma*, *defA*, *defB*, *defC* referentes aos gêneros *Rhodnius* e *Panstrongylus*, todas possuem região codificante de 285 bp, apresentando sempre o códon de iniciação ATG e stop códon (TGA). Por outro lado, as sequências de cDNA obtidas de *def3* e *def4* do gênero *Triatoma* apresentaram região codificante de 282 bp, com os mesmos stop códons dos outros genes, anteriormente mencionados.

Em relação ao DNA genômico, as sequências obtidas apresentaram tamanhos variáveis de íntrons e exons. As sequências de gDNA obtidas de *def1* referentes às subespécies *T. b. brasiliensis* e *T. b. macromelasoma* e às espécies *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki* apresentaram o primeiro exon com tamanho de 88 bp, íntron com 107 bp e o segundo exon com tamanho de 197 bp, respectivamente, totalizando 392 bp. Entretanto, a espécie *T. sordida* apresentou *def1* com primeiro exon no tamanho de 88 bp, íntron com 108 bp e o segundo exon com mesmo tamanho das espécies anteriormente mencionadas, totalizando 393bp. Além disso, *T. sherlocki* e a subespécie *T. b. macromelasoma* apresentaram um segundo gene *def1a*, onde ambos os exons possuem o mesmo tamanho do gene *def1*, com a diferença em relação ao íntron com tamanho de 106 bp, totalizando 391 bp.

Com relação às sequências obtidas de gDNA de *def3* referentes aos exemplares de *T. b. brasiliensis* e *T. sherlocki* (*def3aa*), eles apresentaram primeiro exon com tamanho de 88 bp, íntron de 95 bp e o segundo exon com tamanho de 194 bp respectivamente, totalizando 377bp. Entretanto, o gene *def3* amplificado para a espécie *T. melanica* e um segundo gene *def3* amplificado para a espécie *T. sherlocki* (*def3b*) apresentaram primeiro exon de 88 bp, íntron de 91 bp e o segundo exon com tamanho de 194 bp, totalizando 373 bp. Para as outras espécies triatomínicas estudadas, não foi possível a amplificação do gene *def3* (Tabela 4).

As sequências de gDNA obtidas referentes ao gene *def4* de *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. melanica*, *T. juazeirensis* e *T. sherlocki* apresentaram o primeiro exon com tamanho de 88 bp, íntron com 92 bp e o segundo exon com tamanho de 194 bp, totalizando 374 bp. Entretanto, para as espécies *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. sherlocki* e para *T. b. macromelasoma*, um segundo gene *def4a* pôde ser detectado, onde ambos os exons apresentaram o mesmo tamanho do gene *def4*, porém o íntron apresentou 91 bp em seu tamanho, totalizando assim 373 bp.

Em se tratando da espécie *R. prolixus*, foram estudados exemplares do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (*R.p.J*) e exemplares do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos (*R.p.P*). O gene que codifica *DEFA* (Lopez et al. 2003) pôde ser detectado para *R.p.J*, onde o primeiro exon apresentou tamanho de 91 bp, íntron com 97 bp e o segundo exon apresentou tamanho de 194 bp, totalizando 382 bp. Entretanto, o gene *DEFB* pôde ser amplificado tanto para *R.p.J*, como também para *R.p.P*, onde as sequências

apresentaram o primeiro exon com 85 bp, íntron de 103 bp e o segundo exon com tamanho de 194 bp, também totalizando 382 bp. Com relação às espécies *R. nasutus* e *P. megistus*, obtivemos somente alguns fragmentos de sequências do gene que codifica defensina, porém não sendo possível incluí-las nas análises.

Com relação às sequências de aminoácidos obtidas dos genes que codificam *def1*, *DEFA*, *DEFB* e *DEFC*, todas as espécies estudadas apresentaram 94 resíduos de aminoácidos (aa) em suas estruturas, destacando-se as principais características de defensinas como: a presença dos seis resíduos de cisteínas nas regiões do loop, α -helix e folhas β , formando três pontes dissulfídicas, que conferem estabilidade à molécula. Na porção amino-terminal, ocorre a presença do sítio de clivagem do peptídeo sinalizador no resíduo Ser19, bem como uma segunda clivagem do peptídeo ativador no sítio Arg51 (Anexo 1). A clivagem Lys-Arg (KR) é uma característica típica de estrutura presente em defensinas de diferentes espécies de insetos (Waniek et al. 2009b). Por outro lado, as sequências referentes aos genes *def3* e *def4* apresentaram 93 resíduos de aa em suas estruturas e sítio de clivagem do peptídeo sinalizador no mesmo resíduo Ser19, porém a segunda clivagem do peptídeo ativador no sítio Arg50.

Como referência para o cálculo do percentual de similaridade entre as sequências de aa, comparamos as sequências obtidas do presente estudo com a sequência do gene que codifica defensina em *T. brasiliensis* (*def1*), anteriormente descrita por Araújo et al. (2006). Com relação à sequência de *def1* obtida de *T. b. brasiliensis* coletados em Caicó, a mesma é idêntica à sequência de *def1* caracterizada em *T. brasiliensis* por Araújo et al. (2006). Sendo assim, a comparação entre as sequências do gene que codifica defensina obtidas de *T. b. brasiliensis* capturados naturalmente infectados com as de *T. brasiliensis* não infectados (Araújo et al. 2006) não apresentou polimorfismos. Além disso, as sequências de *def1* obtidas da espécie *T. juazeirensis* e subespécie *T. b. macromelasoma* possuem 100% de similaridade quando comparadas à sequência *def1* de *T. brasiliensis* descrita por Araújo et al. (2006). Entretanto, o percentual de similaridade entre *def1* de *T. melanica* e de *T. sherlocki* foi de 97,8%, comparando ambas com *def1* de *T. brasiliensis* (Anexo 1). O percentual de similaridade de *defA* e *Def* caracterizados de *T. infestans* foi de 78,7% e 94,6%, respectivamente, quando comparados a *def1* de *T. brasiliensis*. Quando comparamos as sequências de *def1* caracterizada em *T. sordida* com *def1* de *T. brasiliensis*, o percentual de similaridade encontrado foi de 95,7%. Com relação as sequências de *DEFA* e *DEFB* caracterizadas de *R. nasutus*,

o percentual de similaridade com def1 de *T. brasiliensis* foi de 74,7% para ambas, seguindo o mesmo para DEFB de *P. megistus*; não variando muito em relação a DEFC de *P. megistus* (74,5%). As sequências das isoformas def3 e def4 caracterizadas em *Triatoma* apresentaram similaridade de 79,7% e 78,7%, respectivamente, quando comparadas a def1 de *T. brasiliensis*. Em relação às sequências de DEFA, DEFB e DEFC caracterizados em *R. prolixus*, o percentual de similaridade com def1 de *T. brasiliensis* variou em torno de 73-74% (Anexo 1).

4.5 Análise filogenética

Para a construção das árvores filogenéticas considerando as sequências de cDNA e aa do gene que codifica defensina, três *outgroups* foram adicionados para as análises (Anexos 2 e 3), sendo utilizados os parâmetros 1000 repetições de *bootstrap* e *pairwise deletion*. Ressalta-se que todas as sequências obtidas no presente estudo para as análises filogenéticas foram comparadas com a sequência do gene que codifica defensina *def1* de *T. brasiliensis* anteriormente descrita por Araújo et al. (2006).

Baseando-se nas análises obtidas das sequências de cDNA, observou-se um primeiro clado, onde as espécies do gênero *Rhodnius* ficaram agrupadas juntamente com a espécie *P. megistus*. Um segundo clado, relacionado ao gene *def1* pôde ser identificado, onde além das espécies do complexo *T. brasiliensis*, encontra-se as espécies *T. sordida* e *T. infestans* (Assumpção et al. 2008). O gene *def2* caracterizado em *T. brasiliensis* (Araújo et al. 2006) aparece na árvore filogenética em posição intermediária entre os genes *DEFA*, *DEFB*, *DEFC* e *def1*, respectivamente. Entretanto, as distâncias filogenéticas entre as espécies do complexo *T. brasiliensis* não são relevantes, mostrando que o gene que codifica defensina não seria o marcador ideal para um estudo filogenético, considerando este complexo de espécies. O mesmo ocorre em relação aos genes *def3* e *def4*. Um terceiro clado pôde ser identificado, onde localizam-se os genes *def3* e *def4*, destacando a presença de *defA* de *T. infestans* (Assumpção et al. 2008) (Anexo 2). Observou-se também que existem dois cladogramas bem separados, considerando *def1* e *def3/def4*.

Em relação ao dendograma das sequências de aa referentes ao gene que codifica defensina, localizam-se no primeiro clado os genes *def3* e *def4*, onde além das espécies do complexo *T. brasiliensis* encontra-se *defA* caracterizada em *T.*

infestans (Assumpção et al. 2008). O segundo clado está relacionado aos genes *DEFA* e *DEFB*, onde novamente encontra-se além do gênero *Rhodnius*, a espécie *P. megistus*. Entretanto, o gene *DEFC* encontra-se em um terceiro clado, separado dos genes *DEFA* e *DEFB*, respectivamente. Por último, no quarto clado encontram-se as sequências referentes ao gene *def1*. É importante ressaltar que o dendograma utilizando as sequências de aa do gene que codifica defensina mostrou uma clara separação entre o gene *def1*, relacionado à defensina caracterizada no intestino de *T. brasiliensis* (Araújo et al. 2006), enquanto os genes *def3* e *def4* são defensinas majoritariamente encontradas no corpo gorduroso de *T. brasiliensis* (Waniek et al. 2009b). Cabe ressaltar também, comparando as árvores filogenéticas de cDNA e aa, podemos observar que em ambas as situações o gene *def1* encontra-se em clado diferente de *def3/def4*, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

No Brasil, ainda existem casos da doença de Chagas em humanos, sendo a maioria dos infectados residentes de áreas endêmicas. Para uma vigilância eficaz, se faz necessário não somente a avaliação dos casos humanos, mas também o conhecimento sobre a epidemiologia desta doença, particularmente a circulação de vetores nas áreas peri- e intradomiciliares. Dentro do contexto de transmissão vetorial, as espécies do complexo *T. brasiliensis* vêm tendo notoriedade no nordeste do Brasil, estando este complexo amplamente distribuído geograficamente, desde o Maranhão até o norte de Minas Gerais (Costa et al. 2002, 2003a, 2006). Outras espécies também merecem atenção, tais como *P. megistus*, *T. sordida*, *T. pseudomaculata* e *R. nasutus*, uma vez que são encontrados naturalmente infectados por *T. cruzi*, além de ocuparem biomas como Caatinga e outros ecótopos (Forattini et al. 1977, 1980, Sarquis et al. 2006, Argolo et al. 2008, Diotaiuti 2009, Patterson et al. 2009, Dias et al. 2000, 2011, Gurgel-Gonçalves et al. 2012).

O cenário eco-epidemiológico da doença de Chagas no nordeste brasileiro apresenta uma característica fundamental, o risco de re-domiciliação de triatomíneos autóctones seguido do tratamento com inseticida (Alencar 1987, Silveira et al. 2001). Isto mostra a necessidade da contínua vigilância epidemiológica em vastas áreas do interior do nordeste do Brasil (Silveira et al. 2001). Com relação aos vetores da doença de Chagas, seus ambientes e habitats têm sido tradicionalmente compartimentalizados pelas autoridades envolvidas no controle da doença em três segmentos: (i) silvestre, incluindo pilhas de rochas e árvores; (ii) peridomiciliares, constituído por estruturas artificiais como currais e galinheiros; e (iii) intradomicílios, representado pelas residências humanas. Dentro deste cenário, vem sendo proposto que o ambiente peridoméstico pode ser a chave para a re-colonização das residências a partir de locais silvestres representados por habitats naturais de triatomíneos (Diotaiuti et al. 2000, Borges et al. 2005).

No nordeste, *T. b. brasiliensis* é considerado como sendo o principal vetor na transmissão de *T. cruzi*. Sendo assim, estudar a infecção natural por *T. cruzi* em *T. b. brasiliensis*, uma vez que esta subespécie pode ser encontrada em ambos os ecótopos, silvestre e peridoméstico, bem como infestando o intradomicílio, é de grande importância para a saúde pública (Diotaiuti et al. 2000, Guarneri et al. 2000, Costa et al 2003a).

Neste trabalho, foram realizadas duas expedições para o município de Caicó. Na primeira expedição foram exploradas três localidades nesta cidade (Pedra do Sino, Penedo e Ilha Santana) e outros dois municípios adjacentes (São João do Sabugi e São Fernando), sendo que em todas as localidades foram coletados *T. b. brasiliensis*. Em Pedra do Sino, Ilha Santana, São João do Sabugi e São Fernando, a taxa de infecção natural por *T. cruzi* foi de 12,5%, com um total de 72 exemplares de *T. b. brasiliensis* coletados. Na primeira expedição à localidade de Penedo foi observado um alto percentual de infecção por *T. cruzi* (aproximadamente 80%), considerando-se os 55 triatomíneos examinados; o que enfatizou a necessidade de uma segunda expedição somente para esta localidade. A segunda expedição confirmou as altas taxas de infecção natural por *T. cruzi* para a localidade de Caicó.

Em estudos anteriores feitos por Costa et al. (1998), para as localidades do município de Caicó, a taxa de infecção natural por *T. cruzi* foi de 15% dos 120 insetos analisados. Durante o período de 1996 à 1999 no estado do Rio Grande do Norte, encontrou-se *T. brasiliensis* infectados apresentando taxa de infecção por *T. cruzi* de 4,5% para 8.594 insetos examinados (Costa et al. 2003a). Estes estudos corroboram para uma baixa taxa de infecção natural por este flagelado, encontrada em algumas localidades de Caicó, bem como no município adjacente. Entretanto, o presente estudo mostra um alto índice de infecção de *T. b. brasiliensis* por *T. cruzi* em Penedo, área silvestre, apesar de apresentar residências humanas em contato próximo com o meio selvagem. A Caatinga é a vegetação baixa e esparsa típica, com rochas. É uma região que está sob constante aumento da pressão ambiental, devido ao crescimento populacional e também às atividades agrícolas. Todo este cenário pode estar propiciando a perda de habitats naturais de diferentes animais (vetores e reservatórios), podendo estar incentivando a saída de animais sinantrópicos para mais perto da comunidade e, conseqüentemente, a chegada de vetores nos ecótopos peri- e domiciliares.

Vale ressaltar que para a localidade de Penedo, foram registradas poucas notificações de triatomíneos invadindo as casas, talvez devido à política do controle de pestes nas mesmas. No entanto, muitos dos triatomíneos coletados no presente estudo foram capturados próximo às casas. Além disso, evidências da presença de pequenos mamíferos reservatórios foram vistas nas fezes encontradas nas rochas, onde foi capturada uma grande quantidade de triatomíneos altamente infectados por *T. cruzi*. Apesar de não ter sido possível o reconhecimento de qual(is) espécie(s) reservatório(s) poderia(m) estar circulando nesta área, relatos de moradores

apontam para pequenos roedores que são típicos da região. Sendo assim, esses animais podem estar agindo como reservatórios e ajudando a manter o ciclo de transmissão de *T. cruzi* nos triatomíneos.

Pode-se destacar ainda que além dos 340 *T. b. brasiliensis* coletados em Penedo, três exemplares de *T. petrochii* também foram encontrados habitando a mesma rocha que *T. b. brasiliensis*. Nenhum *T. cruzi* foi detectado nos três *T. petrochii* coletados, o que pode ser explicado por sua preferência em alimentar-se de répteis, especialmente pequenos lagartos que habitam as fendas das rochas nesta localidade. Ressaltamos que nesta expedição nenhuma outra espécie de triatomíneo pôde ser encontrada em associação com *T. b. brasiliensis* nos sítios explorados em Penedo.

Em se tratando da dieta de *T. b. brasiliensis*, Costa et al. (1998) reportaram diferentes fontes alimentares utilizadas por este vetor em várias localidades de Caicó, a saber: aves (28%), cabras (54%), cães (39%), cavalos (19%), humanos (16%), gambás (9%), porcos (7%), roedores (9%) e tatus (51%), em ambos os ecótopos silvestre e peridomiciliar. Portanto, à exceção de aves, todos os recursos usados para alimentação são ferramentas que permitem a manutenção das subpopulações de *T. cruzi*, tanto na natureza quanto no peri- e intradomicílios em triatomíneos (Diotaiuti & Dias 1987, Guarneri et al. 2000). Além disso, podemos mencionar que na localidade em questão, existe um possível ciclo de transmissão de *T. cruzi* estabelecido, onde *T. b. brasiliensis* é capaz de manter altas taxas de infecção natural pelo parasita em questão. É possível que os reservatórios silvestres presentes nesta área estejam apresentando um alto número de flagelados no sangue, o que estaria facilitando a infecção do vetor.

Com relação aos genótipos de *T. cruzi* circulando no estado do Rio Grande do Norte, estudo anterior mostrou a presença de TcI, TcII e TcIII nas localidades de Caicó, Caraúbas e Serra Negra do Norte, porém oriundos de *T. brasiliensis* e *P. lutzi* (Câmara et al. 2010). É importante enfatizar que *T. brasiliensis* é um vetor extremamente competente na manutenção das duas principais subpopulações de *T. cruzi* (TcI e TcII), tanto em infecções singulares como também em infecções mistas (TcI/TcII) e em condições laboratoriais, como também na natureza (Araújo et al. 2007, 2008, 2009). Isto ocorre diferentemente de outras espécies de triatomíneos, como por exemplo, *R. prolixus*, que possui certa dificuldade em manter o genótipo TcII (cepa Y) devido a diferentes fatores de aglutinação presentes no trato digestivo e hemolinfa do mesmo (Mello et al. 1996). Ainda considerando *T. brasiliensis*, este

vetor é capaz de manter até mesmo um isolado de *T. cruzi* não familiar ao mesmo e oriundo de uma localidade diferente desta espécie vetora (Araújo et al. 2008).

Defensinas são peptídeos geralmente catiônicos relacionados ao sistema imune inato de diferentes organismos, inclusive insetos (Ganz 2003). O primeiro estudo de caracterização de genes que codificam defensinas foi realizado por Lopez et al. (2003), onde foram demonstradas diferentes isoformas do gene que codifica defensina: *DEFA*, *DEFB* e *DEFC* em *R. prolixus*. Por outro lado, o primeiro relato na literatura considerando o gênero *Triatoma*, mais especificamente, a espécie *T. brasiliensis* foi descrito por Araújo et al. (2006), onde os autores isolaram, caracterizaram e descreveram a expressão do gene que codifica defensina no estômago e intestino deste vetor, além da identificação também de lisozimas. Entretanto, a expressão gênica tanto de defensinas, como também de lisozimas foi realizada em função do repasto sanguíneo e da presença de simbioses. Lopez et al. (2003) descreveram a expressão do gene codificante para defensinas, porém em função da indução do sistema imune de *R. prolixus* por inoculação de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Mais tarde, aprofundando-se no estudo das defensinas, mais duas isoformas deste gene puderam ser identificadas e descritas em *T. brasiliensis* por Waniek et al. (2009b).

Comparando as sequências do gene que codifica defensina de *T. brasiliensis* (*def1*, *def2*, *def3* e *def4*) anteriormente descritas por Araújo et al. (2006) e Waniek et al. (2009b) com as espécies *T. infestans defA* (Assumpção et al. 2008) e *Def* (DQ391188), além de *DEFA*, *DEFB* e *DEFC* em *R. prolixus* (Lopez et al. 2003), todas as isoformas apresentaram mesmo tamanho e mesmo stop códon (Anexo 1). Entretanto, quando compara-se as sequências de defensinas de triatomíneos obtidas no presente estudo com as sequências de outros hemípteros como o Heteroptera *Pyrrhocoris apterus* (JX5604321) e o "Homoptera" *Nilaparvata lugens* (*defA* KC3551951, *defB* KC3551961), observamos que a sequência de defensina de *P. apterus* é menor, apresentando 267 bp, enquanto que *N. lugens* apresentou sequência constituída de 315 bp, sendo ambas as espécies com os mesmos stop códons das sequências caracterizadas em triatomíneos.

A pré-prodefensina *def1* de triatomíneos aqui estudada difere-se das outras defensinas, na parte sinalizadora e de ativação, considerando tamanho das sequências. O comprimento do peptídeo sinalizador de todas as sequências obtidas de triatomíneos neste estudo foi de 19 resíduos de aminoácidos (aa), contrastando com 18 resíduos de aminoácidos encontrados na espécie *P. apterus* e 24 resíduos

de aminoácidos presentes nas duas sequências de defensina (*defA* e *defB*) de *N. lugens* (Anexo 1).

Com relação aos peptídeos ativadores das sequências de aa obtidas das espécies de *Triatoma* *def1*, *def2*; *R. prolixus* *DEFA*, *DEFB*, *DEFC* e *T. infestans* *Def*, todas apresentaram 32 resíduos de aa, conforme descrito por Araújo et al. (2006) e Waniek et al. (2009b), enquanto as sequências de *def3* e *def4* obtidas das espécies do gênero *Triatoma*, além de *defA* de *T. infestans* (Assumpção et al. 2008), apresentaram peptídeo ativador com 31 aminoácidos (Anexo 1). Quando comparamos com os outros hemípteros, a diferença de tamanho entre as sequências é ainda mais visível, uma vez que *P. apterus* e *N. lugens* apresentam 27 e 36 aa, respectivamente. Esses resultados mostram que apesar de estarmos comparando insetos hemípteros, as defensinas encontradas em triatomíneos apresentam-se mais similares, quando comparadas com hemípteros mais distantes filogeneticamente. Por último, os comprimentos das defensinas maduras de todos os insetos utilizados neste estudo, inclusive as sequências de defensinas de *P. apterus* e *N. lugens*, possuem 43 resíduos de aminoácidos, apresentando em suas estruturas os seis resíduos de cisteína, característica de toda defensina (Anexo 1).

A similaridade das sequências pre-prodefensinas de *Triatoma* *def1* variaram de 78-100% dentro deste gênero, enquanto que comparando com gêneros *Rhodnius* e *Panstrongylus*, o percentual de similaridade encontrado variou de 73-76% (Anexo 1). Quando comparamos com as sequências de defensinas de outros hemípteros, o percentual de identidade foi ainda menor: *P. apterus* *def* (42,5%) e *N. lugens* *defA* e *defB* (43,2% e 40,3%, respectivamente). Esses resultados nos mostram que a maioria das diferenças estruturais encontradas nas defensinas de insetos estão localizadas na pre-pro região, enquanto que o peptídeo maduro é bastante conservado em relação ao número de aa e estrutura (Araújo et al. 2006, Waniek et al. 2009b), mesmo até em hemípteros mais distantes filogeneticamente, como *P. apterus* e *N. lugens*. É importante destacar que estudos filogenéticos envolvendo sequências de defensina madura de insetos mostraram que existem duas principais linhagens de defensinas, onde uma está associada principalmente a lepidópteros, enquanto a outra estaria associada a hemípteros, coleópteros, dípteros e himenópteros (Dassanayake et al. 2006). É importante ressaltar que o estudo do gene que codifica defensina nas diferentes espécies de triatomíneos utilizados para este modelo experimental resultou em mais de 600 sequências para análise, sendo que dentro destas 600, pudemos somente utilizar em torno de 400 sequências para

o presente trabalho. Este tipo de acontecimento é muito comum durante o processo de sequenciamento de amostras de DNA.

A subfamília Triatominae possui questões relevantes em relação a sua origem e distribuição geográfica ainda não muito esclarecidas. Desta forma, o presente trabalho mostra pela primeira vez o uso do gene que codifica defensina como uma ferramenta molecular para o estudo filogenético dentro do “complexo *T. brasiliensis*”, além de outras espécies de triatomíneos. Atualmente, estudos relacionados à filogenia de vetores da doença de Chagas vêm exaustivamente utilizando como marcadores moleculares genes relacionados ao Citocromo b (*Cytb*), ITS (Espaçador Transcrito Interno), entre outros (Monteiro et al. 2000, Hypsa et al. 2002, de Paula et al. 2007, Pfeiler et al. 2006, Tartarotti & Ceron 2005, Weirauch & Munro 2009, Quisberth et al. 2011), uma vez que separam bem os clados referentes às subpopulações de diferentes espécies de triatomíneos, além de possuírem sequências bastante variáveis em nível de espécies (Yao et al. 2010). Com base nas investigações anteriores utilizando *Cytb*, sua aplicação como marcador molecular definiu bem as diferenças populacionais e de estrutura em se tratando de *Triatoma* spp. E, principalmente, da existência das espécies e subespécies pertencentes ao complexo *T. brasiliensis*, além de ser muito utilizado quando se considera a estrutura genética populacional de *T. brasiliensis* (Monteiro et al. 2004, Pfeiler et al. 2006). Além do *Cytb*, outro marcador, o ITS, também vem sendo bastante utilizado na tentativa de responder a questões de evolução em triatomíneos, posição taxonômica, bem como uma associação entre táxons que tenham se divergido há menos de 50 milhões de anos (Marcilla et al. 2001, 2002, Tartarotti & Ceron 2005, Quisberth et al. 2011).

Recentes estudos filogenéticos mostraram o uso de genes que codificam defensinas como marcadores moleculares em diferentes organismos (Seufi et al. 2011, Chen et al. 2012, d’Alençon et al. 2013). Utilizando genes que codificam defensinas (*def1*, *def3* e *def4*), considerando tanto a árvore filogenética das sequências de cDNA como também de aa, podemos observar que o gênero *Triatoma* ficou claramente em um clado separado do gênero *Rhodnius*, corroborando a hipótese de que as espécies das tribos Triatomini e Rhodniini foram originadas de ancestrais diferentes, segundo a teoria da origem polifilética de triatomíneos (Hypsa et al. 2002, Tartarotti & Ceron 2005, Martínez et al. 2006, Tartarotti et al. 2006). Podemos também mencionar que o gene que codifica defensina como marcador molecular separou os genes em diferentes clados (*def1*,

def3 e *def4*), porém não separou as espécies vetoras dentro do complexo *T. brasiliensis*, podendo ser explicado pelo fato das sequências serem de tamanho inferior a 500 bp e bastante conservadas, consequência da alta similaridade entre as sequências.

Cabe ressaltar ainda que o gene *defA* caracterizado em *T. infestans* (Assumpção et al. 2008) provavelmente é o gene correspondente a *def3* de *T. brasiliensis* (Waniek et al. 2009b), uma vez que ambas encontram-se em um mesmo clado, enquanto que o gene *Def* obtido de *T. infestans* (DQ391188) pode ser associado a *def1* de *T. brasiliensis* (Araújo et al. 2006) (Anexo 2).

Com relação a *P. megistus*, os resultados mostraram que esta espécie foi agrupada juntamente com as espécies do gênero *Rhodnius* considerando as sequências de cDNA e de aa dos genes codificantes para defensinas, corroborando com Patterson e Gaunt (2010), onde houve também uma maior proximidade entre essas espécies, porém utilizando um outro marcador molecular (28S-rDNA). Entretanto, outros marcadores como 16S-rDNA e *Cytb* mostram a espécie *P. megistus* mais próxima do gênero *Triatoma* (Monteiro et al. 2001, Hypsa et al. 2002, Pfeiler et al. 2006). Se considerarmos a evolução, a morte de certos patógenos por AMPs vem se mostrando como um mecanismo de defesa imune altamente eficaz, podendo ser encontrado em formas mais primitivas de vida, assim como em humanos, e particularmente em se tratando de humanos, os AMPs, mais especificamente as defensinas, possuem estrutura muito conservada (Wiesner & Vilcinskis 2010). Como as defensinas são peptídeos de atividade contra bactérias, podemos sugerir que *P. megistus* apresentou-se em um mesmo clado que o gênero *Rhodnius*, devido a ambos poderem ser encontrados em um mesmo ambiente (região Amazônica – Mata Atlântica, característica úmida), possivelmente em contato com um mesmo tipo de espécie de bactérias. A presença de bactérias Gram-positivas, tanto em *R. prolixus* como também em *P. megistus*, já foi anteriormente descrita, sugerindo que essas bactérias seriam simbiotes existentes no trato digestivo de ambas as espécies vetoras (Dias 1934, Vallejo et al. 2009) e mais recentemente observado por da Mota et al. (2012). De qualquer forma, é importante esclarecer que o resultado de uma análise filogenética irá depender do marcador utilizado (gene-alvo), parâmetros escolhidos no preparo das análises, além das espécies de triatomíneos utilizadas.

As diferenças entre os cladogramas referentes aos genes *def1* e *def3/def4* são claramente visíveis, principalmente baseando-se na árvore filogenética contendo as

sequências de aa, ou seja, esses resultados corroboram com as observações descritas por Waniek et al. (2009b), quando mencionaram as diferenças entre *def1*, gene isolado e caracterizado do estômago/intestino de *T. brasiliensis*, enquanto que *def3* e *def4* foram isolados e caracterizados em corpos gordurosos da mesma espécie vetora, podendo também ser encontrados no estômago, intestino e glândula salivar, mas em menor concentração. Está claro que existe uma especificidade em relação à função de cada gene codificante para defensina, uma vez que cada um pôde ser encontrado em diferentes localidades do trato digestivo de *T. brasiliensis*. Podemos ainda concluir que é muito possível que em triatomíneos existam pelo menos dois diferentes grupos de defensinas, a saber: *def1*-DEFC (Anexo 3), predominante no estômago/intestino e provavelmente responsável pelo controle da população de simbioses nestas localidades (Araújo et al. 2006, Waniek et al. 2009b); e um segundo grupo *def3/def4*-DEFA/DEFB responsáveis pela resposta imune no corpo gorduroso e intestino.

Vale a pena ressaltar que o gene que codifica *def3* foi somente amplificado para algumas espécies do complexo *T. brasiliensis* (*T. b. brasiliensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki*), enquanto que para a outra espécie e subespécie não pôde ser amplificado tanto por cDNA como também por gDNA. É bom lembrarmos que os membros do complexo *T. brasiliensis* são morfologicamente diferentes, assim como padrões isoenzimáticos variáveis também demonstraram essas diferenças (Costa et al. 1997, 2009, Costa & Felix 2007). A ausência de *def3* nos outros membros do complexo não poderia ser justificada pela não amplificação devido aos primers, uma vez que são espécies bastante próximas. Também não poderemos justificar pela má qualidade do cDNA ou gDNA, até porque as mesmas amostras de cDNA e gDNA foram utilizadas para as amplificações de *def1* e *def4*, respectivamente, além do gene *β -actina*. Além disso, foram utilizados não somente tecido do trato digestivo, como também corpo gorduroso, para a síntese de cDNA a partir de RNA total. Então, o que poderia estar acontecendo com a não amplificação de *def3* para algumas espécies de triatomíneos?

Uma possível explicação seria a de que *def3* e *def4* são alelos e *def3* estaria ocorrendo em indivíduos heterozigotos (*def3-def4*), enquanto que em insetos homozigotos (*def4-def4*) somente *def4* poderia ser detectado. Esta hipótese pode ser corroborada pelo fato de que também não foi possível amplificar gDNA de *def3* em *T. juazeirensis* e *T. b. macromelasoma*. Uma outra pergunta seria se a presença

ou ausência de determinadas isoformas de defensina estaria favorecendo ou não a infecção de triatomíneos por *T. cruzi*?

Até o presente momento, o que se sabe é que a expressão do gene *def1* em *T. brasiliensis* ocorre nas regiões cárdia e estômago deste vetor em função da alimentação, ou seja, o repasto sanguíneo estaria proporcionando um aumento da população de simbioses nestas localidades (Eichler & Schaub 2002), levando a um aumento da expressão deste gene (Araújo et al. 2006, Waniek et al. 2011). Com isso, as defensinas estariam exercendo um papel de “controle” na exacerbação da população de simbioses, o que poderia ser fatal para o inseto, caso não houvesse esse controle (Araújo et al. 2006, Waniek et al. 2009b, 2011). Ainda assim, em *T. brasiliensis* a expressão gênica de *def1* no intestino é elevada quando o vetor está infectado por *T. cruzi*, principalmente 20 dias após a infecção (Waniek et al. 2011), sugerindo que é exatamente este o período onde o parasita encontra-se em fase de multiplicação no vetor (Kollien & Schaub 2000), aumentando assim a população de *T. cruzi* e conseqüentemente a modulação da expressão de *def1*. Entretanto, *def3* e *def4* são isoformas majoritariamente expressas em corpo gorduroso, principalmente *def3*.

A literatura também nos evidencia a presença de bactérias intracelulares presentes na hemolinfa (hemócitos) de triatomíneos, embora sejam Gram-negativa (Wigglesworth 1936, Hypsa & Dale 1997). Essas bactérias também puderam ser visualizadas na hemolinfa de *T. brasiliensis* (observações feitas por Catarina Araújo). Possivelmente, uma vez o vetor submetido ao repasto sanguíneo, inúmeras reações ocorrem com relação à fisiologia do inseto (como por exemplo, um aumento de tecido gorduroso e população de simbioses) (Wigglesworth 1936, Eichler & Schaub 2002), e possivelmente uma delas é a expressão de defensinas (*def3* e *def4*) também no corpo gorduroso, controlando a população de bactérias simbióticas. De qualquer forma, em se tratando de triatomíneos infectados por *T. cruzi*, para sabermos até que ponto as defensinas estariam envolvidas nesta interação, estudos mais aprofundados serão necessários para responder a diferentes questões, ainda não esclarecidas.

6 CONCLUSÕES

1- Considerando somente Penedo, não houve diferença significativa entre os períodos seco e chuvoso em relação à taxa de infecção natural por *T. cruzi* em *T. b. brasiliensis*. Além disso, aparentemente, em Caicó circulam os genótipos TcI e TcII de *T. cruzi*, uma vez que em nossos estudos foram obtidos isolados desta localidade e caracterizados por duas metodologias moleculares: gene de min-exon e os genes 24S α e 18S ribossomais.

2- A sequência do gene que codifica defensina em *T. b. brasiliensis* oriundos de Caicó é exatamente igual à sequência de *T. brasiliensis* descrita por Araújo et al. (2006), não havendo indicação de polimorfismo.

3- O peptídeo maduro das isoformas de defensina apresentou estrutura bastante conservada em todas as espécies de triatomíneos estudadas.

4- Considerando as sequências de defensinas utilizadas para a construção das árvores filogenéticas (cDNA e aa), foi observada uma clara separação entre os gêneros *Rhodnius* e *Triatoma*. Observou-se também, uma clara separação entre as isoformas de defensinas: *def1* e *def3/def4*. A espécie *Panstrongylus megistus* ficou no mesmo clado que o gênero *Rhodnius*. Entretanto, foi observada uma distância genética entre estes gêneros.

5- Baseando-se na árvore construída utilizando as sequências de aa de defensina, observou-se que existe uma separação definida entre *def1*-DEFC (defensina presente em estômago e intestino de triatomíneos) e *def3/def4*-DEFA/DEFB (relacionadas à defensina encontrada em corpo gorduroso), mostrando que existe especificidade funcional das defensinas de acordo com o tecido. O gene que codifica *def3* foi somente amplificado para algumas espécies do complexo *T. brasiliensis*, sugerindo que nos indivíduos heterozigotos (*def3-def4*) houve a amplificação deste gene, enquanto que nos indivíduos homozigotos (*def4-def4*) o mesmo não ocorreu.

6- O gene que codifica defensina mostrou-se mais eficaz como marcador molecular filogenético quando espécies de triatomíneos possuem maior distância filogenética entre elas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alencar JE 1987. *História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará*. Imprensa Universitária da UFC. Fortaleza, Ceará, 341 pp.
- Almeida CE, Marcet PL, Gumiel M, Takiya DM, Cardozo-de-Almeida M, Pacheco RS, Lopes CM, Dotson EM, Costa J 2009. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavalloei* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. *J Vector Ecol* 34: 164-173.
- Araújo CAC, Mello CB, Jansen AM 2002. *Trypanosoma cruzi* I and *Trypanosoma cruzi* II: recognition of sugar structures by *Arachis hypogaeae* (Peanut agglutinin) lectin. *J Parasitol* 88: 582-586.
- Araújo CAC, Waniek PJ, Stock P, Mayer C, Jansen AM, Schaub GA 2006. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 547-560.
- Araújo CAC, Cabello PH, Jansen AM 2007. Growth behaviour of two *Trypanosoma cruzi* strains in single and mixed infections: *in vitro* and in the intestinal tract of the blood-sucking bug, *Triatoma brasiliensis*. *Acta Trop* 101: 225-231.
- Araújo CAC, Waniek PJ, Jansen AM 2008. Development of *Trypanosoma cruzi* (Tcl) isolate in the digestive tract of an unfamiliar vector, *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop* 107: 195-199.
- Araújo CAC, Waniek PJ, Jansen AM 2009. An overview of Chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 227-234.
- Araújo CAC, Waniek PJ, Xavier SCC, Jansen AM 2011. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. *Exp Parasitol* 127: 308-312.
- Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J 2008. *Doença de Chagas e seu principais vetores no Brasil*, 1ª ed., Imperial Novo Milênio, Rio de Janeiro, vol. 1, 64 pp.
- Assumpção TCF, Francischetti IMB, Andersen JF, Schwarz A, Santana JM, Ribeiro JMC 2008. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 213-232.

- Bajgar A, Jindra M, Dolezel D 2013. Autonomous regulation of the insect gut by circadian genes acting downstream of juvenile hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 4416-4421.
- Bao YY, Qu LY, Zhao D, Chen LB, Jin HY, Xu LM, Cheng JA, Zhang CX 2013. The genome- and transcriptome-wide analysis of innate immunity in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *BMC Genomics* 14: 160.
- Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Almeida de Souza JA, Sherlock IA 1980. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia states Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 84-90.
- Barretto MP 1979. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade Z (Eds.), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 89-151.
- Bartholomay LC, Fuchs JF, Cheng LL, Beck ET, Vizioli J, Lowenberger C, Christensen BM 2004. Reassessing the role of defensin in the innate immune response of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 13: 125-132.
- Batista TA, Gurgel-Gonçalves R 2009. Ecological niche modelling and differentiation between *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 and *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1165-1170.
- Bérenger JM, Blanchet D 2007. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 733-736.
- Bonmantin JM, Bonnat JL, Gallet X, Vovelle F, Ptak M, Reichhart JM, Hoffmann JA, Keppi E, Legrain M, Achstetter T 1992. Two-dimensional ¹H NMR study of recombinant insect defensin A in water: resonance assignments, secondary structure and global folding. *J Biomol NMR* 2: 235-256.
- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L 2005. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceará state, northeastern Brazil. *Acta Trop* 93: 119-126.
- Boulanger N, Bulet P, Lowenberger C 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. *Trends Parasitol* 22: 262-268.
- Brisse S, Dujardin JC, Tlibayrenc M 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages sequence-characterised amplified regions markers. *Mol Biochem Parasitol* 111: 95-105.

- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M 2001. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 31: 1218-1226.
- Bulet P, Cociancich S, Reuland M, Sauber F, Bischoff R, Hegy G, Van Dorsselaer A, Hetru C, Hoffmann JA 1992. A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragonfly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata). *Eur J Biochem* 209: 977-984.
- Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* 23: 329-344.
- Bulet P, Stöcklin R, Menin L 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* 198: 169-1684.
- Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 37: 1319-1327.
- Câmara ACJ, Varela-Freire AA, Valadares HMS, Macedo AM, D'Ávila DA, Machado CR, Lages-Silva E, Chiari E, Galvão LMC 2010. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop* 115: 205-211.
- Carcavallo RU, Rodríguez MF, Salvatella R, 1988. Hábitats and related fauna in *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*, Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H. Eds., vol. 2, 561-600 pp, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Cerqueira RL 1982. Estudos sobre populações de triatomíneos silvestres encontrados em Santo Inácio-Bahia. *PhD Thesis*, ICBUSP, São Paulo.
- Chagas C 1909. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chen JS, Reddy V, Chen JH, Shlykov MA, Zheng WH, Cho J, Yen MR, Jr. Saier M 2012. Phylogenetic characterization of transport protein superfamilies: superiority of superfamily tree programs over those based on multiple alignments. *J Mol Microbiol Biotechnol* 21: 83-96.

- Chiari E, Camargo EP 1984. Culture and cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: Morel, C.M. (Ed.), Genes and Antigens of Parasites, A Laboratory Manual. Fundação Oswaldo Cruz, World Health Organization, Rio de Janeiro, 23-26 pp.
- Correia NC, Almeida CE, Neiva VL, Gumiel, MXR, Lima MM, Medeiros LMO, Mendonça VJ, Rosa JÁ, Costa J 2013. Crossing experiments confirm *Triatoma sherlocki* as a member of the *Triatoma brasiliensis* species complex. *Acta Tropica*. (No prelo).
- Costa J 1997. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): estudos morfológicos, biológicos e isoenzimáticos sobre diferentes padrões cromáticos. *PhD Thesis*, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 100 pp.
- Costa J, Barth OM, Marchon-Silva V, Almeida CE, Freitas-Sibajev MGR, Panzera F 1997a. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) - genital structures and eggs of different chromatic forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 493-498.
- Costa J, Freitas-Sibajev MGR, Marchon-Silva V, Pires MQ, Pacheco RS 1997b. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 459-464.
- Costa J, Almeida JR, Britto C, Duarte R, Marchon-Silva V, Pacheco RS 1998. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 7-13.
- Costa J 1999. The synanthropic process of Chagas disease vectors in Brazil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population, genetical, ecological, and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 239-241.
- Costa J, Peterson AT, Beard CB 2002. Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most importante Chagas' disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg* 67: 516-520.
- Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, Beard CB 2003a. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 443-449.

- Costa J, Almeida CE, Dujardin JP, Beard CB 2003b. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 637-639.
- Costa J, Argolo AM, Félix 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: 87-90.
- Costa J, Lorenzo M 2009. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 46-51.
- Costa J, Peterson AT, Dujardin JP 2009. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). *Infect Genet Evol* 9: 263-270.
- Costa J, Correia NC, Neiva VL, Gonçalves TCM, Felix M 2013. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* (No prelo).
- Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18: 171-176.
- Coura JR 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 113-122.
- Coura JR, Dias JCP 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 31-40.
- Coura JR, Viñas PA 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465: S6-7.
- Cox PM, Betts RA, Collins M, Harris PP, Huntingford C, Jones CD 2004. Amazonian forest dieback under climate-carbon cycle projections for the 21st century. *Theor Appl Climatol* 78: 137-156.
- d'Alençon E, Bierne N, Girard PA, Magdelenat G, Gimenez S, Seninet I, Escoubas JM 2013. Evolutionary history of X-tox genes in three lepidopteran species: origin, evolution of primary and secondary structure and alternative splicing generating a repertoire of immune-related proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 43: 54-64.

- Dassanayake RS, Silva Gunawardene YIN, Tobe SS 2006. Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized a/b motifs. *Peptides* 28: 62-75.
- da Mota FF, Marinho LP, Moreira CJ, Lima MM, Mello CB, Garcia ES, Carels N, Azambuja P 2012. Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1631.
- de Paula AS, Diotaiuti L, Galvão C 2007. Systematics and biogeography of *Rhodnius* (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. *J Biogeogr* 34: 699-712.
- Dias E 1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 28: 1-110.
- Dias E 1953. Doença de Chagas nas Américas. *Rev Bras Mal D Trop* 5: 11-16.
- Dias JC 2000. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad Saúde Pública* 16: 43-59.
- Dias JC, Machado EMM, Fernandes AL, Vinhaes MC 2000. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cad Saúde Pública* 16: 13-34.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Dias JC 2006a. Chagas disease: successes and challenges. *Cad Saúde Pública* 22: 2020-2021.
- Dias JCP 2006b. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 370-375.
- Dias FB, Paula AS, Belisário CJ, Lorenzo MG, Bezerra CM, Harry M, Diotaiuti L 2011. Influence of the palm tree species on the variability of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Infect Genet Evol* 11: 869-77.
- Dimarcq JL, Bulet P, Hetru C, Hoffmann J 1998. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers* 47: 465-477.
- Diotaiuti L, Dias JCP 1987. Estudo comparativo do ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* alimentados em pombos ou camundongos. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 95-100.

- Diotaiuti L, Loliola CF, Falcão PL, Dias JC 1993. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 35: 37-45.
- Diotaiuti L, Borges EC, Lorosa ES, Andrade RE, Carneiro FFC, Faria Filho OF, Schofield CJ 1998. Current transmission of Chagas disease in the State of Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 65-66.
- Diotaiuti L, Filho OFF, Carneiro FCF, Dias JCP, Pires HHR, Schofield CJ 2000. Aspectos operacionais do controle do *Triatoma brasiliensis*. *Cad Saúde Pública* 16: 61-67.
- Diotaiuti L 2009. Triatomines vectors os *Trypanosoma cruzi* infections in *Emerging Chagas Disease*, A. Teixeira, M. Vinaud, and A. Maria Castro, Eds. pp. 24-39, Bentham Science Publishers.
- Duque JG 2004. O Nordeste e as lavouras xerófilas. *Banco do Nordeste do Brasil*, 4^a ed. Fortaleza, Ceará 330 pp.
- Dvorak, JA 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J Cell Biochem* 24: 357-371.
- Eichler S, Schaub GA 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp Parasitol* 100: 17-27.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 58: 807-811.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118: 161-166.
- Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira ACV, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR 2001. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 97-99.
- Forattini OP, Rocha e Silva EO, Ferreira OA, Rabello EX, Pattoli D 1971. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana: III - Dispersão local de triatomíneos, com especial referência a *Triatoma sordida*. *Rev Saúde Pública* 5: 193-205.

- Forattini OP, Ferreira OA, da Rocha e Silva EO, Rabello EX 1977. Ecological aspects of American Trypanosomiasis. VIII. The domicile of *Panstrongylus megistus* and its extradomiciliary presence. *Rev Saúde Pública* 11: 73-86.
- Forattini OP 1980. Biogeography, origin and distribution of Triatominae domicile dispersal in Brazil. *Rev Saúde Pública* 14: 265-299.
- Forattini OP 2006. Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliary in Brazil. *Rev Saúde Pública* 40: 964-998.
- Frías-Lasserre D 2010. A new species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frías et al (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. *Neotrop Entomol* 39: 572-583.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- Galvão C, Angulo VM 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241: 61-68.
- Ganz T 2003. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr Comp Biol* 43: 300-304.
- García ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* - *Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol* 53: 11-21.
- Gonçalves TCM, Teves-Neves SC, Santos-Mallet JR, Carbajal-de-la-Fuente AL, Lopes CM 2013. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 429-437.
- Guarneri A, Carvalho MG, Pereira MH, Diotaiuti L 2000. Potencial biológico do *Triatoma brasiliensis*. *Cad Saúde Publica* 16: 101-104.
- Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Townsend PA 2012. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J Trop Med* doi:10.1155/2012/705326.
- Hetru C, Hoffmann D, Bulet P 1998. Antimicrobial peptides from insects. In: Brey PT, Hultmark D (Eds.), *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. Chapman & Hall, London, pp. 40-66.

- Hypsa V, Dale C 1997. *In vitro* culture and phylogenetic analysis of *Candidatus Arsenophonus triatominarum*, an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1140-1144.
- Hypsa V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego RO, Galvão C, Jurberg J 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 23: 447-457.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage on the internet]. IBGE Cidades@: Rio Grande do Norte, Caicó [updated 2010; cited 2013]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>
- IDEMA - Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte [homepage on the internet]. Perfil do Seu município – Caicó [updated 2008; cited 2012]. Available from: http://www.idema.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/idema/socio_economicos/arquivos/Perfil%202008/Caic%C3%B3.pdf
- Ishibashi J, Saido-Sakanaka H, Yang J, Sagisaka A, Yamakawa M 1999. Purification, cDNA cloning and modification of a defensin from the coconut rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros*. *Eur J Biochem* 266: 616-623.
- Jansen AM, Pinho AP, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O 1999. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 203-204.
- Jurberg J, Galvão C 2006. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease and implications for human health. *Denisia* 19: 1096-1116.
- Juberg J, Rocha DS, Galvão C 2009. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guiton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop* 9: 123-128.
- Klink CA, Machado RB 2005. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv Biol* 19: 707-713.
- Kollien AH, Schaub GA 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today* 16: 381-387.
- Lamberty M, Ades S, Uttenweiler-Joseph S, Brookharts G, Bushey D, Hoffmann JA, Bulet P 1999. Insect immunity: isolation from the lepidopteran *Heliothis virescens* of a novel insect defensin with potent antifungal activity. *J Biol Chem* 274: 9320-9326.

- Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Amer Mus Natur Hist* 163: 123-520.
- Llewellyn M, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, Torrico F, Diosque P, Valente V, Valente SA, Gaunt MW 2009. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog* 5: e1000410.
- Lima MM, Sarquis O 2008. Is *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae) changing its habitat as a consequence of human activity? *Parasitol Res* 102: 797-800.
- Lopez L, Morales G, Ursic R, Wolff M, Lowenberger C 2003. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 439-447.
- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2001. 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* 18: 136-142.
- Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, Galvão C, Jurberg J, Miles MA, Dujardin JP, Mas-Coma S 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol* 1: 225-235.
- Martinez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Vargas B, Vidaurre P 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar to *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Bol Inst Invest Salud Desar* 3: 1-11.
- Martínez FH, Villalobos GC, Cevallos AM, Torre Pde L, Laclette JP, Alejandre-Aguilar R, Espinoza B 2006. 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. *Mol Phylogenet Evol* 41: 279-287.
- Mello CB, Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA 1996. Differential in vitro and in vivo behavior of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 82: 112-121.

- Mendonça VJ, da Silva MT, de Araújo RF, Júnior JM, Júnior MB, Almeida CE, Costa J, Graminha MA, Cicarelli RM, da Rosa JA 2009. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am J Trop Med Hyg* 81: 858-864.
- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 217-225.
- Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821.
- Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460-465.
- Monteiro FA, Escalante AA, Beard CB 2001. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends Parasitol* 17: 344-347.
- Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 32: 46-56.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM 2009. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res* 40: 26-48.
- Papa AR, Jurberg J, Carcavallo RU, Cerqueira RL, Barata JMS 2002. *Triatoma sherlocki* sp. n. coletada na Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 9: 133-146.
- Patterson JS, Barbosa SE, Feliciangeli MD 2009. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta Trop* 110: 187-199.
- Patterson JS, Gaunt MW 2010. Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. *Mol Phylogenet Evol* 56: 608-621.
- Pfeiler E, Bitler BG, Ramsey JM, Palacios-Cardiel C, Markow TA 2006. 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*. *Mol Phylogenet Evol* 41: 209-221.
- Pinho AP, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM 2000. *Trypanosoma cruzi* in the sylvatic environment: distinct transmission cycles involving two sympatric marsupials. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 509-514.
- Pinto AS, Bento DN 1986. The palm tree *Copernicia cerifera* (carnaúba) as an ecotope of *Rhodnius nasutus* in rural areas of the state of Piauí, northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 19: 243-245.
- Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA 2003. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Rev Saúde Pública* 37: 107-115
- Quisberth S, Waleckx E, Monje M, Chang B, Noireau F, Brenière SF 2011. "Andean" and "non-Andean" ITS-2 and mtCytB haplotypes of *Triatoma infestans* are observed in the Gran Chaco (Bolivia): population genetics and the origin of reinfestation. *Infect Genet Evol* 11: 1006-1014.
- Ramos CJ, Tavares KC, Komati LK, Miletti LC 2008. Colonization by *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) inside homes in São José do Cerrito, SC: first report. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 421-423.
- Rosa JA, Rocha CS, Gardim S, Pinto MC, Mendonça VJ, Ferreira Filho JCR, Carvalho EOC, Camargo LMA, Oliveira J, Nascimento JD, Cilense M, Almeida CE 2012. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa* 3478: 62-76.
- Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac Cord JR, Gomes TF, Cabello PH, Lima MM 2004. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 263-270.
- Sarquis O, Sposina R, de Oliveira TG, Mac Cord JR, Cabello PH, Borges-Pereira J, Lima MM 2006. Aspects of peridomiliary ecotopes in rural areas of northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 143-147.
- Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, D'Andrea OS, de Oliveira TG, Lima MM 2010. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. *J Vector Ecol* 35: 385-394.

- Schofield CJ 1989. American trypanosomiasis. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. *World Health Organization manual*, WHO/VBC/89.967: 81-92.
- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100.
- Seufi AE, Hafez EE, Galal FH 2011. Identification, phylogenetic analysis and expression. Profile of an anionic insect defensin gene, with antibacterial activity from bacterial-challenged cotton leafworm *Spodoptera littoralis*. *BCM Mol Biol* 12: 47.
- Silveira AC, Vinhaes MC 1999. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 405-411.
- Silveira AC, Vinhaes MC, Lira E, Araújo E 2001. O controle de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*. I. Estudo do tempo de reposição das condições de transmissão da doença de Chagas por *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* em áreas submetidas a tratamento químico domiciliar, e de variáveis ambientais relacionadas. Organização Pan-Americana de Saúde, Brasília, 86 pp.
- Silveira AC 2011. O inquérito triatomínico (1975–1983). *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 26-32.
- Sherlock IA 1979. Vetores. In: Brener Z, Andrade Z (Eds.), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 42-88.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152.
- Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60: 25-32.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.
- Tartarotti E, Ceron CR 2005. Ribosomal DNA ITS-1 intergenic spacer polymorphism in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Biochem Genet* 43: 365-373.
- Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MT, Ceron CR 2006. Phylogenetic approach to the study of Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz J Biol* 66: 703-708.

- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 115-119.
- Tibayrenc M, Ayala FJ 1988. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.
- Tibayrenc M, Barnabé C, Telleria J 2010. Reticulate evolution in *Trypanosoma cruzi*: medical and epidemiological implications. In: Telleria J, Tibayrenc M (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research*. Elsevier Inc.
- Thevissen K, Terras FR, Broekaert WF 1999. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol* 65: 5451-5458.
- Thevissen K, Warnecke DC, François IE, Leipelt M, Heinz E, Ott C, Zähringer U, Thomma BP, Ferket KK, Cammue BP 2004. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J Biol Chem* 279: 3900-3905.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res* 22: 4673-4680.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA 2009. Triatominae - *Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop* 110: 137-147.
- Villela MM, Souza JMB, Melo VP, Dias JCP 2009. Evaluation of the Chagas disease control program and presence of *Panstrongylus megistus* in central-western Minas Gerais state, Brazil. *Cad Saúde Pública* 25: 907-917.
- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, Pang X, Xu H, Zhu Y, Xiao P, Chen S 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One* 5: e13102.
- Waniek PJ, Mendonça-Lima L, Menezes GB, Jansen AM, Araújo CAC 2009a. Recombinant expression and characterization of a lysozyme from the midgut of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in comparison with intestinal muramidase activity. *Physiol Entomol* 34: 309-317.
- Waniek PJ, Castro HC, Sathler PC, Miceli L, Jansen AM, Araújo CAC 2009b. Two novel defensin-encoding genes of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): gene expression and peptide-structure modeling. *J Insect Physiol* 55: 840-848.

- Waniek PJ, Jansen AM, Araújo CAC 2011. *Trypanosoma cruzi* modulates the expression of *Triatoma brasiliensis def1* in the midgut. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 845-847.
- Waniek PJ, Costa JEP, Jansen AM, Costa J, Araújo CAC 2012. Cathepsin L of *Triatoma brasiliensis* (Reduviidae, Triatominae): sequence characterization, expression pattern and zymography. *J Insect Physiol* 58: 178-187.
- Weirauch C, Munro JB 2009. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Mol Phylogenet Evol* 53: 287-299.
- WHO – World Health Organization 2013. Media Centre: Chagas disease (American trypanosomiasis) [updated March 2013; cited 2013]. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html
- Wiesner J, Vilcinskas A 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1: 440-464.
- Wigglesworth VB 1936. Symbiotic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera, Triatominae). *Parasitology* 28: 284-289.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O 1998. Molecular epidemiology of American tripanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol* 28: 105-112.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051-1054.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240-253.

8 APÊNDICES E/OU ANEXOS

Anexo 1

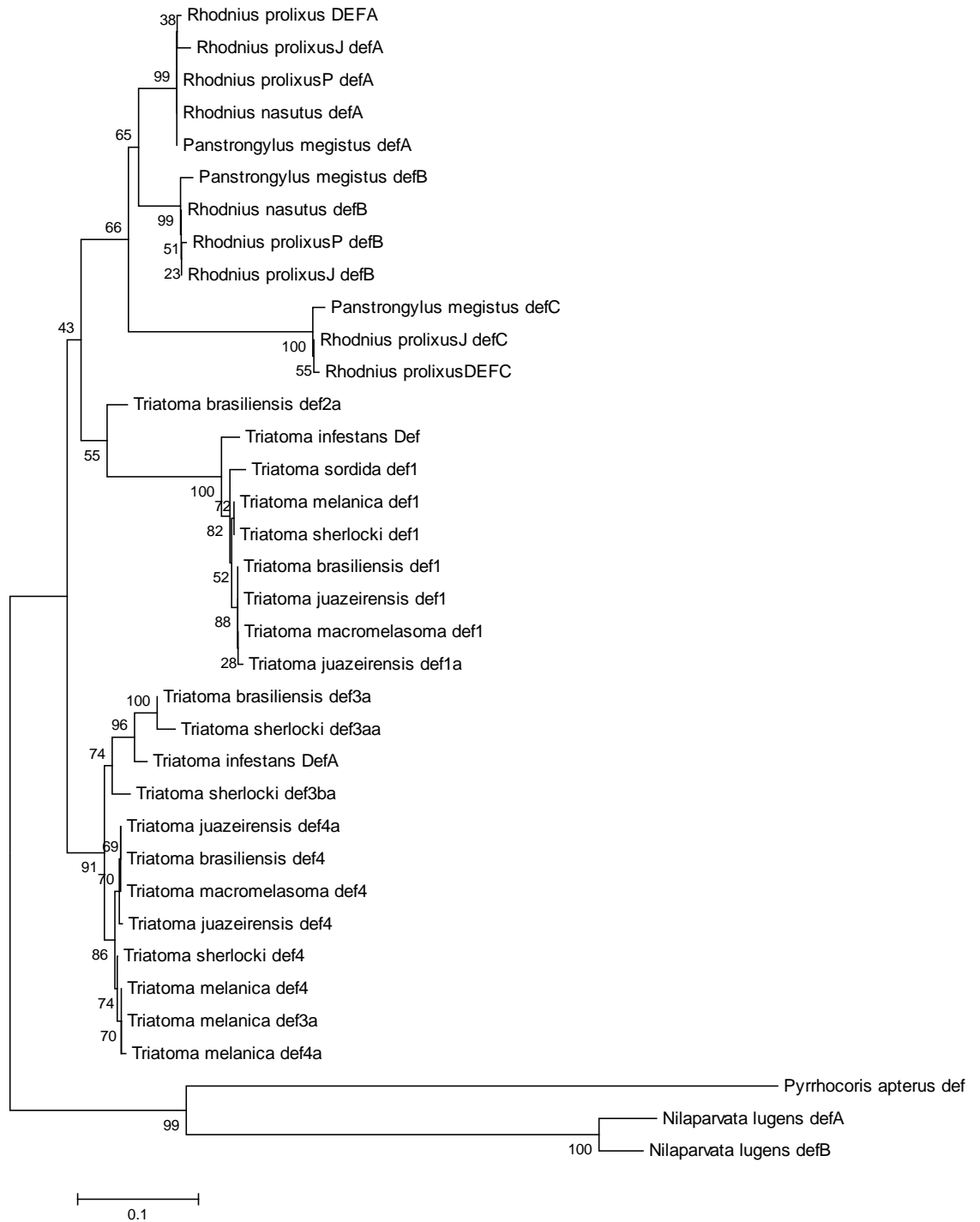
Alinhamento das sequências de aminoácidos referentes às isoformas de defensinas identificadas e caracterizadas em diferentes espécies de triatomíneos.

			Loop	-helix	-sheet		
			C ₁	C ₂	C ₃	C ₁ C ₂ C ₃	
<i>Panstrongylus megistus</i> defC	MKCILSLFTLFLVATLVY	----	SYPAEWNSQHQQLDDAQWE	-PAGELTEEHLS	---RMRRTCDLLSFTSKWFTPNHAGCAAH	IFLGNRGGRCVGTVCCHCRK 74, 54	
<i>Rhodnius prolixus</i> J defC	MKCILSLFTLFLVATLVY	----	SYPAEWNSQHQQLDDAQWE	-PAGELTEEHLS	---RMRRTCDLLSFTSKWFTPNHAGCAAH	IFLGNRGGRCVGTVCCHCRK 75, 74	
<i>Rhodnius prolixus</i> P defC	MKCILSLFTLFLVATLVY	----	SYPAEWNSQHQQLDDAQWE	-PAGELTEEHLS	---RMRRTCDLLSFTSKWFTPNHAGCAAH	IFLGNRGGRCVGTVCCHCRK 75, 74	
<i>Rhodnius prolixus</i> DEFC	MKCILSLFTLFLVATLVY	----	SYPAEWNSQHQQLDDAQWE	-PAGELTEEHLS	---RMRRTCDLLSFTSKWFTPNHAGCAAH	IFLGNRGGRCVGTVCCHCRK 74, 74	
<i>Panstrongylus megistus</i> defB	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTQQELDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLLSFSKQWVTPNHAGCAAH	LLRGNRGGHCNGTICCHCRK 74, 74	
<i>Rhodnius nasutus</i> defB	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTQQELDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLLSFSKQWVTPNHAGCAAH	LLRGNRGGHCNGTICCHCRK 74, 74	
<i>Rhodnius prolixus</i> J defB	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTQQELDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLLSFSKQWVTPNHAGCAAH	LLRGNRGGHCNGTICCHCRK 74, 74	
<i>Rhodnius prolixus</i> DEFB	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTQQELDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLLSFSKQWVTPNHAGCAAH	LLRGNRGGHCNGTICCHCRK 73, 64	
<i>Rhodnius prolixus</i> P defB	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTQQELDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLLSFSKQWVTPNHAGCAAH	LLRGNRGGHCNGTICCHCRK 73, 64	
<i>Panstrongylus megistus</i> defA	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTHQQQLDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 74, 74	
<i>Rhodnius nasutus</i> defA	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTHQQQLDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 74, 74	
<i>Rhodnius prolixus</i> J defA	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTHQQQLDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 73, 64	
<i>Rhodnius prolixus</i> P defA	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTHQQQLDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 74, 74	
<i>Rhodnius prolixus</i> DEFA	MKCILSLVTLFLVAVLVH	----	SHPAEWNTHQQQLDDALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 74, 74	
<i>Triatoma brasiliensis</i> def4a	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVT	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 78, 74	
<i>Triatoma jussieirensis</i> def4a	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVT	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 78, 74	
<i>Triatoma macromelasoma</i> def4a	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVT	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 78, 74	
<i>Triatoma macromelasoma</i> def4	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVT	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 78, 74	
<i>Triatoma brasiliensis</i> def4	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVT	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 78, 74	
<i>Triatoma jussieirensis</i> def4	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVT	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 78, 74	
<i>Triatoma sherlocki</i> def4	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 79, 74	
<i>Triatoma melanica</i> def4	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 79, 74	
<i>Triatoma melanica</i> def3a	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 79, 74	
<i>Triatoma sherlocki</i> def4a	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 79, 74	
<i>Triatoma sherlocki</i> def3ba	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 79, 74	
<i>Triatoma melanica</i> def4a	MKCALSIVTLFLVVALAY	----	SHPAEC-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 79, 74	
<i>Triatoma brasiliensis</i> def1	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHGA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK ID	
<i>Triatoma jussieirensis</i> def1	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHGA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 100%	
<i>Triatoma macromelasoma</i> def1	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHGA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 100%	
<i>Triatoma brasiliensis</i> def1a	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHGA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 100%	
<i>Triatoma macromelasoma</i> def1a	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHGA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 100%	
<i>Triatoma jussieirensis</i> def1a	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHGA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 100%	
<i>Triatoma melanica</i> def1	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHAA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 97, 84	
<i>Triatoma sherlocki</i> def1	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHAA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 97, 84	
<i>Triatoma sherlocki</i> def1a	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHAA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 97, 84	
<i>Triatoma melanica</i> def1a	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHAA	---RLMRATCDLFSFEKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 97, 84	
<i>Triatoma sordida</i> def1	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AEQPLDETEWEQPAGEI	TEEHAA	---RLMRATCDLFSFSKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 95, 74	
<i>Triatoma infestans</i> Def	MKCILSLVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEI	TEEHAA	---RLMRATCDLFSFSKQWVTPNHAA	CAAHILLGNRGGHCVGTVCCHCRK 94, 64	
<i>Triatoma brasiliensis</i> def3a	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SYPADL-AQQPLDETEWEQPAGEVTEEHVT	---	RLMRATCDLFSLQSKWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 88, 24	
<i>Triatoma brasiliensis</i> def3a	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SHPAEW-TEQQLEDIWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSQWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 78, 74	
<i>Triatoma sherlocki</i> def3aa	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SHPAEW-TEQQLEDIWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSQWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 79, 74	
<i>Triatoma infestans</i> Defa	MKCALSIVTLFLVAALAY	----	SHPAEW-TQQQLDEALWE	-PAGEVTEEHVA	---RLMRATCDLFSFQSQWVTPNHAA	CAAHLLRGNRGGRCNGTICCHCRK 78, 74	
<i>Pyrrhocoris apterus</i> def	MKFVV-LFIFTVVAMAS	----	HPYIP	----	VDEDADV-PDAIPEEYHSL	---RVBRATCDVLSFSKQWVTPNHSA	CAIHCILANGYKGGSCIKKAI
<i>Niloparvata lugens</i> defA	MNSBMTAVLLLVASV	----	LYVVHVNSLPTGMFVEDDLVLT	DELPAAVGRESAVATGSRARAT	CDLFSFEQWVTPNHAA	CAAHIVLGGKGGYC	
<i>Niloparvata lugens</i> defB	MHSBITAVLLLVASV	----	LYVVHVNSLPTGMFVEDDLVLT	DELPAAVGRESAVATGSRARAT	CDLLSFSKQWVTPNHAG	CAAHILIRGKGGSC	

*: : : * : * * * * * : : : * * * * * : * * * * * : * * * * *

Anexo 2

Árvore filogenética baseada nas sequências de cDNA do gene que codifica defensina em diferentes espécies de triatomíneos.



Anexo 3

Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos de defensina em diferentes espécies de triatomíneos.

