

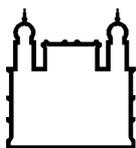
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
Mestrado em Biologia Parasitária

Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do  
gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil

SIMONE CALDAS TEVES NEVES

Rio de Janeiro

2012



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Simone Caldas Teves Neves*

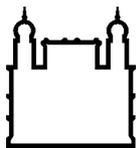
Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil

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

**Orientadora:** Prof. Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves

**RIO DE JANEIRO**

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AUTOR: Simone Caldas Teves Neves**

Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves**

**Aprovada em: 27/03/2012**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Cléber Galvão - Presidente

**Prof. Dra.** Jane Costa (Membro titular)

**Prof. Dr.** Carlos Eduardo Almeida (Membro titular)

**Prof. Dr.** Rubens Pinto de Mello (Membro suplente)

**Prof. Dra.** Suzete Araujo Oliveira Gomes (Membro suplente)

Rio de Janeiro, 27 de março de 2012.

Dedico este trabalho ao meu esposo  
Leandro Batista das Neves, meu amado,  
amigo e colega de profissão.

## **Agradecimentos**

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

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

Ao meu esposo Leandro Batista das Neves pela paciência e por não medir esforços para me ajudar mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos amigos Sabrina Lucena e Francisco Alves pela amizade, paciência e ajuda.

Em especial a minha orientadora Teresa Cristina Monte Gonçalves por todos os ensinamentos e dedicação para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa e concretização deste sonho. Essa vitória é nossa!

À Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet, chefe do Laboratório, primeiramente pela oportunidade de cursar o mestrado e melhor ainda pela chance de desenvolver pesquisa científica na área pela qual me apaixonei e em um grupo de excelência. Eu tenho orgulho de trabalhar no Laboratório de Transmissores de Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

À professora Catarina Macedo Lopes, pelo apoio técnico-científico, amizade e por estar presente, mesmo nos momentos mais difíceis, me ensinando todos os dias a combater o bom combate.

À pesquisadora visitante Dra Ana Laura Carbajal de La Fuente pela orientação científica nas análises de morfometria geométrica e pelas valiosas sugestões. Muchas gracias!

À pesquisadora Dra Simone Patrícia Carneiro de Freitas pelo auxílio na técnica de microscopia eletrônica de varredura e pelas valiosas sugestões.

À Dra Claudia Russo por permitir a elaboração de parte deste trabalho em seu laboratório e Silvia Andrade Justi por aceitar colaborar com as análises moleculares.

Às Dra Elizabeth Ferreira Rangel, Nataly de Souza e ao professor Maurício Vilella pelo apoio.

À Dra Ângela Junqueira pelas valiosas sugestões.

Aos amigos técnicos do LTL/IOC, Ana Paula Rufino, Adalberto José da Silva e Leandro Borges Ramos pelo apoio técnico e amizade.

Aos técnicos José Leonardo Nicolau e Leandro Batista das Neves e às doutoras Maria Regina Reis Amendoeira e Maíra C. Albuquerque Magalhães do Laboratório de Toxoplasmose, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ pelo apoio técnico.

À Dra Suzete Araujo Gomes e doutoranda Margareth Almeida pelo incentivo.

Às “irmãs científicas” Amanda Queiroz, Alice Helena, Maria Luiza, Simone Castro e Danielle Misael pelo apoio científico e amizade.

E aos colegas de laboratório e apoio laboratorial Cristina, Bento, Simone Kikuchi, Ariane, Agnes, Aline, Juliana, Nathanielly, Marcus, Luciana Reboredo, William, Renato, Adriana, Esther, Rogério e Carla por toda ajuda e momentos de descontração.

À ENERPEIXE SA, nas pessoas de Wagner Santiago, Fernanda Santiago, Cleber Carneiro, Fernando Abreu, e tantos outros que foram importantíssimos para realização deste trabalho.

Às Secretarias de Saúde do Estado do Tocantins e dos municípios pesquisados, que através de seus funcionários Sra. Anália Fagundes Gomes, Adriana Feitosa, Iza Alencar, Márcia Faria Silva, Elaine Dantas, Fernanda Santos Bordalo, Marciana Francisca Barbosa de Araujo, Edílson de Santana Pereira, Doralice Alberto Veloso, Raimundo Nunes da Silva, Dílson da Rocha Oliveira, Joseane de Campos Ribeiro, Juarez Lopes de Oliveira, José Fernandes pelo apoio incondicional devotado nas ações de nossa pesquisa na área.

Ao Laboratório de Biologia Evolutiva Teórica e Aplicada do departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro e plataforma de sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ pelo suporte técnico para elaboração dos experimentos em Biologia Molecular.

À plataforma de microscopia eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz pelo suporte técnico.

## *Ser ou não Ser Si*

Não é a questão;

Nem mesmo está em questão;

É preciso *Ser Si* com paixão;

É preciso ter, compaixão, nobreza e muito amor no coração;

*Ser Si* é preciso sabedoria;

Sabedoria que não se restringe a Biologia;

Saber, que mistura Ciência da Biologia com sentimentos sustentados pelos princípios da Teologia;

Questão óbvia é que para atingir a Sabedoria é preciso ser Sábio;

E para ser Sábio, eis a questão: ouvir ou falar?!

Mas para *Ser Si* já temos a resposta da questão: ouça mais e somente fale com precisão;

*Simone*, aquela que ouve, significado que a resume com exatidão;

*Simone*, aquela que ouve e faz da Ciência, uma oportunidade de misturar conhecimento e paixão, sem perder em momento algum, a nobreza presente em seu coração;

Nobreza esta que ciência alguma conseguirá explicar como construir em seu coração;

*Ser Si*, confesso, tentei mas é difícil conseguir uma tradução!

Francisco Alves

25/02/2012

*“A paciência é uma virtude revolucionária”.*

**Mao Tsé Tung**

## INDICE

1. Introdução.....	1
1.1 Os Triatomíneos.....	1
1.2 Aspectos fisiogeográficos do Estado do Tocantins.....	3
1.3 Fauna triatomínica do Tocantins.....	6
1.4 Epidemiologia da doença de Chagas.....	7
1.5 Taxonomia de triatomíneos.....	12
2. Justificativa.....	17
3. Objetivos.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. Materiais e métodos.....	20
4.1 Obtenção e manutenção dos espécimes .....	20
4.2 Caracterização morfológica e morfométrica.....	25
4.2.1 Morfologia externa.....	25
4.2.2 Morfologia da genitália externa das fêmeas em microscopia eletrônica de varredura.....	25
4.2.3 Análise morfométrica das asas.....	27
4.3 Filogenia molecular.....	28
5. Resultados.....	33
5.1 Morfologia geral externa e morfometria.....	33
5.2 Morfologia da genitália externa de fêmeas.....	41
5.3 Morfometria geométrica das asas.....	46
5.4 Filogenia molecular.....	50
6. Discussão.....	52
7. Conclusões.....	59
8. Perspectivas.....	60
9. Referências bibliográficas.....	61

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Mapa de monitoramento por satélite da vegetação potencial do Estado do Tocantins. Fonte Embrapa, 1999. 4
- Figura 1.2: Vegetação típica de cerrado no município de Aurora do Tocantins, região Sudeste do Estado do Tocantins. 5
- Figura 1.3: Afloramentos rochosos no município de Paranã-TO, região Sul do Estado do Tocantins 5
- Figura 1.4: Aproveitamento hidrelétrico Peixe Angical (ENERPEIXE SA) no Rio Tocantins – TO. 6
- Figura 1.5: Número de casos de doença de Chagas aguda, por município, no Brasil, período de 2000 a 2010. 11
- Figura 1.6: Casa construída com recursos do programa de melhorias habitacionais para a doença de Chagas, município de Combinado - TO. 11
- Figura 1.7: Moradias de pau-a-pique construídas em beira de estrada no município de Paranã -TO. 12
- Figura 4.1: A - Localização do Estado do Tocantins; B – Municípios trabalhados: a – Paranã, b – Aurora do Tocantins. 20

Figura 4.2: Colocação de armadilhas Noireau em afloramentos rochosos.	21
Figura 4.3: Busca ativa de triatomíneos no peridomicílio.	22
Figura 4.4: Captura de ninfas e macho de <i>T. costalimai</i> com armadilha Noireau.	22
Figura 4.5: Captura de macho de <i>Triatoma</i> sp. com armadilha Noireau.	23
Figura 4.6: Retirada de ninfa de triatomíneo da armadilha Noireau.	23
Figura 4.7: Parâmetros usados na morfometria. A – <i>Triatoma</i> sp. vista dorsal, a – comprimento total do corpo, b – largura do abdômen; B – Cabeça vista dorsal, c – largura da cabeça, d – distância interocular, e – largura do olho; C – pronoto em vista dorsal, f – largura do pronoto, g – comprimento do pronoto; D – cabeça em vista lateral, h – 1º segmento rostral, i – 2º segmento rostral, j – 3º segmento rostral	26
Figura 4.8: Asa direita de fêmea de <i>Triatoma</i> sp. com marcação dos pontos anatômicos de referência, identificação do espécime e escala.	28
Figura 5.1: Espécimes de <i>Triatoma</i> sp.: A – Fêmea, B – Macho	33
Figura 5.2: Cabeça de <i>Triatoma</i> sp. em vista dorsal	34
Figura 5.3: Pronoto e escutelo de <i>Triatoma</i> sp. em vista dorsal	35

Figura 5.4: Macho de *Triatoma* sp., detalhe da fosseta esponjosa no primeiro par de pernas 35

Figura 5.5: Abdômen de *Triatoma* sp. em vista ventral evidenciando os espiráculos 36

Figura 5.6: Asa esquerda de macho de *Triatoma* sp. com nervura mediana incompleta. 40

Figura 5.7: Asa direita de fêmea de *Triatoma* sp. com nervuras irregulares. 40

Figura 5.8: Asa direita de fêmea de *Triatoma costalimai* sem nervura mediana. 40

Figura 5.9: Eletromicrografia de urotergitos de fêmeas por microscopia eletrônica de varredura: A - *Triatoma* sp., B – *Triatoma costalimai* e C – *Triatoma williami*. VII – 7º urotergito, VIII – 8º urotergito, IX – 9º urotergito. 42

Figura 5.10: Eletromicrografia de uroesternitos de fêmeas por microscopia eletrônica de varredura: A - *Triatoma* sp., B – *Triatoma costalimai* e C – *Triatoma williami*. VII – 7º uroesternito, Gc – gonocoxito, Gp– gonapófise. 43

Figura 5.11: Espinhos no gonocoxito 8 (Gc8) e região mediana da gonapófise 8 (Gp8) de *Triatoma* sp. 44

Figura 5.12: Detalhe dos espinhos unifurcado (a), bifurcado (b) e trifurcado (c) da região mediana da gonapófise 8 de *Triatoma* sp. 44

Figura 5.13: Região mediana da gonapófise 8 de *Triatoma costalimai*, mostrando cerdas e espinhos. 45

Figura 5.14: Detalhe dos espinhos unifurcado (a), bifurcado (b) e trifurcado (c) da região mediana da gonapófise 8 de *Triatoma costalimai*. 45

Figura 5.15: Detalhe dos espinhos unifurcados da região mediana da gonapófise 8 de *Triatoma williami*. 46

Figura 5.16: Médias de tamanho do centróide de machos e fêmeas de *Triatoma costalimai* (Tc), *Triatoma williami* (Tw), *Triatoma* sp. (Tsp) e *Triatoma sordida* (Ts) 46

Figura 5.17: Média de tamanho do centróide de fêmeas e machos de *Triatoma costalimai*. 47

Figura 5.18: Média de tamanho do centróide de fêmeas e machos de *Triatoma williami*. 47

Figura 5.19: Média de tamanho do centróide de fêmeas e machos de *Triatoma* sp. 48

Figura 5.20: Média de tamanho do centróide de fêmeas e machos de *Triatoma sordida*. 48

Figura 5.21: Mapa fatorial mostrando uma discreta separação entre *Triatoma* sp. e *Triatoma costalimai* e um solapamento entre *Triatoma williami* e *Triatoma sordida* 49

Figura 5.22: Árvore UPGMA a partir das distâncias de Mahalanobis mostrando a relação entre as espécies de estudo 49

Figura 5.23: Árvore filogenética constituída a partir de sequências 16S (neighbor-joining, distância Jukes-Cantor e 1000 replicatas de bootstrap) mostrando o relacionamento genético dos espécimes de *Triatoma* sp. e *Triatoma costalimai* e dos espécimes de *Triatoma williami* e *Triatoma sordida*. Um espécime de *T. costalimai* de Paranã agrupou-se com *Triatoma* sp. As diferentes cores indicam as localidades de captura dos espécimes de *T. costalimai*: Verde – Aurora do Tocantins – TO; Ciano – Lavandeira – TO; Azul – Taguatinga – TO; Amarelo – São Desidério – BA; Vermelho – Paranã – TO. As siglas ITA e PAR são referentes as localidades de origem dos espécimes de *T. sordida*: ITA – Itaobim – MG, Par – Paranaíba – MS. 51

## Lista de quadros

Quadro 4.1: Relação das espécies de triatomíneos analisadas, com as respectivas procedências. 24

Quadro 4.2: Espécimes de estudo, código de identificação e localidade de origem 29

Quadro 5.1: Diferenças morfológicas entre *Triatoma* sp., *Triatoma costalimai* e *Triatoma williami*. 37

## Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Espécies analisadas, localidades de origem e número de espécimes fêmeas e machos. 27

Tabela 4.2: Protocolo de reação de PCR para amplificação de fragmento de gene 16S.	30
Tabela 4.3: Protocolo para a reação de sequenciamento.	31
Tabela 5.1: Medidas de fêmeas de <i>Triatoma</i> sp. e <i>Triatoma costalimai</i> capturados nos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins – TO, respectivamente.	38
Tabela 5.2: Medidas de machos de <i>Triatoma</i> sp. e <i>Triatoma costalimai</i> capturados nos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins – TO, respectivamente.	39
Tabela 5.3: Distância genética de Jukes Cantor dentro dos grupos	50
Tabela 5.4: Distância genética entre os grupos	50

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – adenina

BA – Bahia

C – citosina

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

COI – citocromo oxidase I

Cytb – citocromo b

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNAmt – DNA mitocondrial

EDTA – ácido etilenoamino tetra-acético

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ENERPEIXE SA – Aproveitamento Hidrelétrico Peixe Angical

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

*g* – gravidade

G – guanina

Gc – gonocoxito

Gp – gonapófise

GPS – sistema de posicionamento global

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

ITA - Itaobim

LACEN / TO – Laboratório Central do Tocantins

L - litro

LTL – Laboratório de Transmissores de Leishmanioses

K - Potássio

Máx – máximo

MG – Minas Gerais

mM – micromolar

mm - milímetro

Mín – mínimo

MS – Mato Grosso do Sul

NaCl – cloreto de sódio

PAR - Paranaíba

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

pmol – picomol ( $10^{-12}$ )

qsp – quantidade suficiente para

RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso

RFLP – polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição

*RPM* – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

Seg. rostral – segmento rostral

SESAU/TO – Secretaria de Estado da Saúde do Tocantins

S – desvio padrão

$S^2$  – variância

SVS /MS – Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

T – timina

Tc – *Triatoma costalimai*

TO – Tocantins

Ts – *Triatoma sordida*

Tsp – *Triatoma* sp.

Tw – *Triatoma williami*

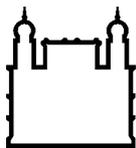
WHO – Organização Mundial de Saúde

UPGMA – Algoritmo de Média Aritmética Não Ponderada

$\bar{X}$  - média

$\mu$  – micro ( $10^{-6}$ )

°C – graus Celsius



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

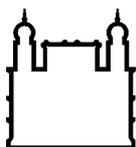
Análises morfológicas, morfométricas e moleculares revelam uma nova espécie do gênero *Triatoma* do Estado do Tocantins, Brasil

### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Simone Caldas Teves Neves**

O estado do Tocantins, endêmico para a doença de Chagas, carece de estudos sobre a fauna triatomínica silvestre presente em seu bioma predominante, o Cerrado, que, ao lado da mata Atlântica, constitui um dos biomas de maior biodiversidade do planeta. No estudo de monitoramento entomológico realizado no município de Paranã –TO, em parceria entre o Laboratório de Transmissores de Leishmanioses IOC – FIOCRUZ e a ENERPEIXE SA foram capturados espécimes de triatomíneos do gênero *Triatoma* não passíveis de identificação taxonômica específica pela morfologia clássica sugerindo um novo morfotipo. Uma abordagem multidisciplinar, abrangendo caracterização morfológica e molecular foi realizada para verificar se estes espécimes sustentam a hipótese de um novo status específico. Os espécimes de estudo juntamente com *T. costalimai* foram capturados em afloramentos rochosos nos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins – TO, respectivamente. A morfologia foi estudada por morfometria clássica de estruturas de valor taxonômico, abrangendo a genitália externa de fêmeas por microscopia eletrônica de varredura e a morfometria geométrica das asas. A filogenia molecular foi estabelecida com base em sequências de DNA mitocondrial. Para fins de comparação foram utilizados espécimes de *Triatoma williami*, espécie afim de *T. costalimai*, e de *Triatoma sordida*, assim como seqüências *Rhodnius stali* e *Rhodnius prolixus*, utilizados como grupo externo, obtidas no Genbank. *Triatoma* sp. diferenciou-se de *T. costalimai* e *T. williami* quanto ao tamanho, coloração geral do corpo e mancha do conexivo. A morfometria clássica mostrou que machos e fêmeas de *Triatoma* sp. são menores que os de *T. costalimai*. O estudo da genitália externa de fêmeas mostrou diferenças de *Triatoma* sp. em relação a *T. costalimai* e *T. williami* e possibilitou a descrição de cerdas e espinhos nunca estudados nestes grupos. Pela morfometria geométrica das asas tanto o tamanho quanto a conformação, separou os espécimes de estudo das demais espécies. As relações morfométricas não foram de encontro com as filogenéticas. A variação de tamanho de *Triatoma* sp. pode ser uma expressão da plasticidade gênica, diante das variações ambientais. Entretanto, as variações morfológicas observadas nas diferentes abordagens estão associadas à composição gênica de cada inseto. Apesar das semelhanças morfológicas, verificou-se a separação de *Triatoma* sp. e *T. costalimai* no estudo filogenético. Os resultados são consistentes para inferir que *Triatoma* sp. trata-se de uma nova espécie. O encontro recente de *Triatoma* sp. em domicílio no município de Paranã ressalta a importância de mais estudos sobre a biologia desta nova espécie.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Morphological, morphometric and molecular analysis reveal a new species of genus  
*Triatoma* of Tocantins State, Brazil

### ABSTRACT

### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Simone Caldas Teves Neves

### ABSTRACT

The state of Tocantins, endemic for Chagas disease, lacks studies of wild triatomine fauna in its predominant biome, Cerrado, which, together with the Atlantic rainforest biomes is one of the most biodiverse on the planet. In an entomological monitoring study conducted in the city of Paranã -TO, a co-operation between the Laboratório de Transmissores de Leishmanioses IOC - FIOCRUZ and Enerpeixe SA, specimens of *Triatoma* were captured but not identified by specific taxonomic identification, classical morphology, suggesting a new morphotype. A multidisciplinary approach, including morphological and molecular characterization was performed to verify if these specimens support the hypothesis of a new specific status. These specimens with *T. costalimai* morphologically similar species, were captured in rocky outcrops in the municipalities of Aurora Tocantins and Paranã - TO. The morphology was studied by morphometric approach classical structures of taxonomic value, including the external genitalia of females, by scanning electron microscopy, and geometric morphometry of wings. The molecular phylogeny was based on mitochondrial DNA sequences. Specimens of *Triatoma williami*, similar to *T. costalimai*, and *Triatoma sordida*, as well as sequences of *Rhodnius stali* and *Rhodnius prolixus* from Genbank were used with outgroup for comparison. *Triatoma* sp. differentiated itself from *T. costalimai* and *T. williami* by size, overall color and connexivum stain. By classical morphometry males and females of *Triatoma* sp. are smaller than those of *T. costalimai*. The study of the external genitalia of females showed differences between *T. sp.*, *T. costalimai* and *T. williami* and also allowed the description of bristles and thorns never studied in these groups. By geometric morphometry of wings both size and shape of the wings, separated the specimens of study from the other species. The morphometric relationships were not meeting with the phylogenetic. The size variation of *Triatoma* sp. may be an expression of the genetic plasticity, due to environmental variations. However, morphological variations observed in the different approaches are associated with the genetic composition of each insect. Despite morphological similarities, *T. sp.* was separated from *T. costalimai* allowing the phylogenetic study. The results are consistent to say that *Triatoma* sp. is a new species. The recent meeting of *Triatoma* sp. at home in the city of Paranã-TO shows the importance of further studies on the biology of this new species.

## 1. Introdução

### 1.1 Os Triatomíneos

Os triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à Ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, que até o ano de 2010 estava composta por 143 espécies e 15 gêneros agrupados em cinco tribos: Rhodniini Pinto, 1926; Triatomini Jeannel, 1919; Cavernicolini Usinger, 1944; Bolboderini Usinger, 1944 e Alberproseniini Martínez & Carcavallo, 1997 (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão et al, 2003; Schofield & Galvão, 2009; Poinar, 2005; Frias-Lasserre, 2010). Recentemente, Caranha et al (2011) reconsideraram os gêneros *Mepraia*, *Nesotriatoma* e *Meccus*, contabilizando 18 gêneros.

Apesar da descrição da subfamília Triatominae preconizar o conceito de hematofagia obrigatória (Jeannel, 1919; Usinger, 1943) sabe-se atualmente que os triatomíneos podem se alimentar da hemolinfa de outros insetos (Lent & Wygodzinsky, 1979; Dujardin et al, 2000), fato que corrobora a hipótese de que esta subfamília evoluiu de outros reduviídeos, predadores ou fitófagos, a partir de mudanças morfológicas, fisiológicas, comportamentais e demográficas para adaptação a hematofagia sobre os vertebrados e dependência dele para se dispersar passivamente (Schofield, 2000a).

A origem evolutiva dos triatomíneos pode ter sido monofilética ou polifilética de acordo com hipóteses baseadas em diferentes evidências. A origem monofilética do grupo foi proposta com base no hábito alimentar estritamente hematófago e segundo os seguintes caracteres apomórficos: rostro reto e fino apoiado na gula com terceiro segmento capaz de fletir para cima durante a alimentação, presença da conexão membranosa entre o segundo e terceiro segmento do rostro, antenas filiformes inseridas lateralmente e ausência de glândulas abdominais dorsais nas ninfas (Lent & Wygodzinsky, 1979). Esta hipótese monofilética foi confirmada a partir de estudos de proteínas salivares e em estudo filogenético de Rhodniini, Triatomini e Linshcosteini realizado com base na análise de seqüências de DNA mitocondrial (DNAMt) (Soares et al, 1998; Gaunt & Miles, 2000; Hypsa et al, 2002).

No entanto, segundo Schofield (1988) de acordo com as características ecológicas e biogeográficas a origem do grupo seria polifilética. Neste caso, a evolução do grupo teria ocorrido a partir de reduviídeos predadores originados a partir de diferentes linhagens resultando em um grupo polifilético, o que explicaria

determinados comportamentos e hábito alimentar bem como a relação estreita com determinados hospedeiros vertebrados. As características compartilhadas seriam devidas às mudanças convergentes do hábito alimentar predador para a hematofagia (Dujardin et al, 1999a; Lyman et al, 1999; Bargues et al, 2000; Schofield, 2000a; Marcilla et al, 2001; Schaefer, 2003; Paula et al, 2005). Estudos morfológicos, bioquímicos e moleculares entre as tribos Rhodniini e Triatomini corroboraram essa hipótese (Schofield & Dolling, 1993; Catalá, 1997; Barata, 1998; Carcavallo et al, 1999; Gorla et al, 1997; Garcia et al, 1998; Dujardin et al, 1999b; Schofield & Dujardin, 1999; Bargues et al, 2000; Monteiro et al, 2000; Schofield, 2000b; Paula et al, 2005). Schaefer (2003), no entanto, afirmava que as diferenças entre os grupos não indicariam origens distintas sendo necessária a realização de novos estudos para definição dessa origem evolutiva dos triatomíneos.

A relevante importância epidemiológica deste grupo de insetos na transmissão da doença de Chagas advém da susceptibilidade de se infectarem e transmitirem o parasito *Trypanosoma cruzi* aliado ao hábito alimentar hematófago em todos os estágios de seu ciclo de vida sobre os vertebrados nos mais variados habitats (Lent & Wygodzinsky, 1979). E, uma vez que a transmissão vetorial se dá pela penetração das formas infectantes do parasita, eliminadas nas fezes do triatomíneo durante o repasto sanguíneo, quanto maior o número de repastos e mais rápida a digestão e defecação maior será a capacidade vetorial destes insetos (Coura, 2005).

Os três gêneros de maior importância epidemiológica são *Rhodnius*, *Panstrongylus* e *Triatoma*. No ambiente silvestre, as espécies de *Rhodnius* são associadas a palmeiras, as de *Panstrongylus* são predominantemente encontradas em tocas ou cavidades de árvores e as do gênero *Triatoma* estão associadas com rochas e tocas de roedores, com espécies exclusivamente encontradas em cavidades das árvores ou em ninhos, enquanto outras em rochas e cavernas (Gaunt & Miles, 2000).

A distribuição geográfica das espécies, essencialmente silvestres ou que se encontram em processo de domiciliação, bem como a superposição e as distâncias geográficas existentes entre populações de uma mesma espécie, são consequências de mecanismos de dispersão e das alterações antrópicas ocorridas em comunidades naturais estáveis, ocasionados pela redução da flora e fauna silvestres (Forattini 1980).

A dispersão passiva de triatomíneos pode ocorrer por meio do transporte de materiais de construção e do deslocamento de animais (Forattini et al 1971), o que demonstra a importância do conhecimento e controle da fauna triatomínica com tendências de domiciliação

As oscilações dos fatores climáticos também atuam nos processos seletivos e de distribuição geográfica, determinando a abundância latitudinal de alguns gêneros e espécies da Tribo Triatomini (Galvão et al, 1998; Bahrndorff et al, 2006). Associados a esses parâmetros está a plasticidade gênica que determina o grau de tolerância e conseqüentemente a adaptação aos diferentes ambientes (Dujardin et al, 1999b).

As variações morfológicas em triatomíneos, com a formação de morfotipos, podem estar associadas aos processos ecológicos e, a diferenciação morfológica dentro de um processo de especiação, pode ser mais rápida que o isolamento reprodutivo ou o estabelecimento de barreiras genéticas (Usinger et al, 1966; Gorla et al, 1997; Dujardin et al, 1999a; Mas-Coma & Bargues, 2009). Espécies com diferenças morfológicas consistentes teriam surgido de adaptações ecológicas divergentes e neste caso poderiam também ser definidas como espécies ecológicas e ou morfotipos (Dujardin et al, 1999b; Mas-Coma & Bargues, 2009).

O conhecimento da distribuição, ecologia e comportamento dos triatomíneos em ambiente silvestres, potenciais vetores do agente etiológico da doença de Chagas, são parâmetros importantes e servem de suporte para os programas de vigilância entomológica.

## 1.2 Aspectos fisiogeográficos do Estado do Tocantins

Localizado na região Norte do Brasil, o Tocantins é área endêmica para a doença de Chagas e encontra-se em zona de transição geográfica entre o cerrado e a floresta amazônica, apresentando os biomas Amazônia, restrito a região Norte do Estado, e Cerrado que está presente em cerca de 91% do território (IBGE, 2004; Silva, 2007), com áreas de tensão ecológica ou de contato entre os tipos de vegetação e formações pioneiras (figura 1.1).

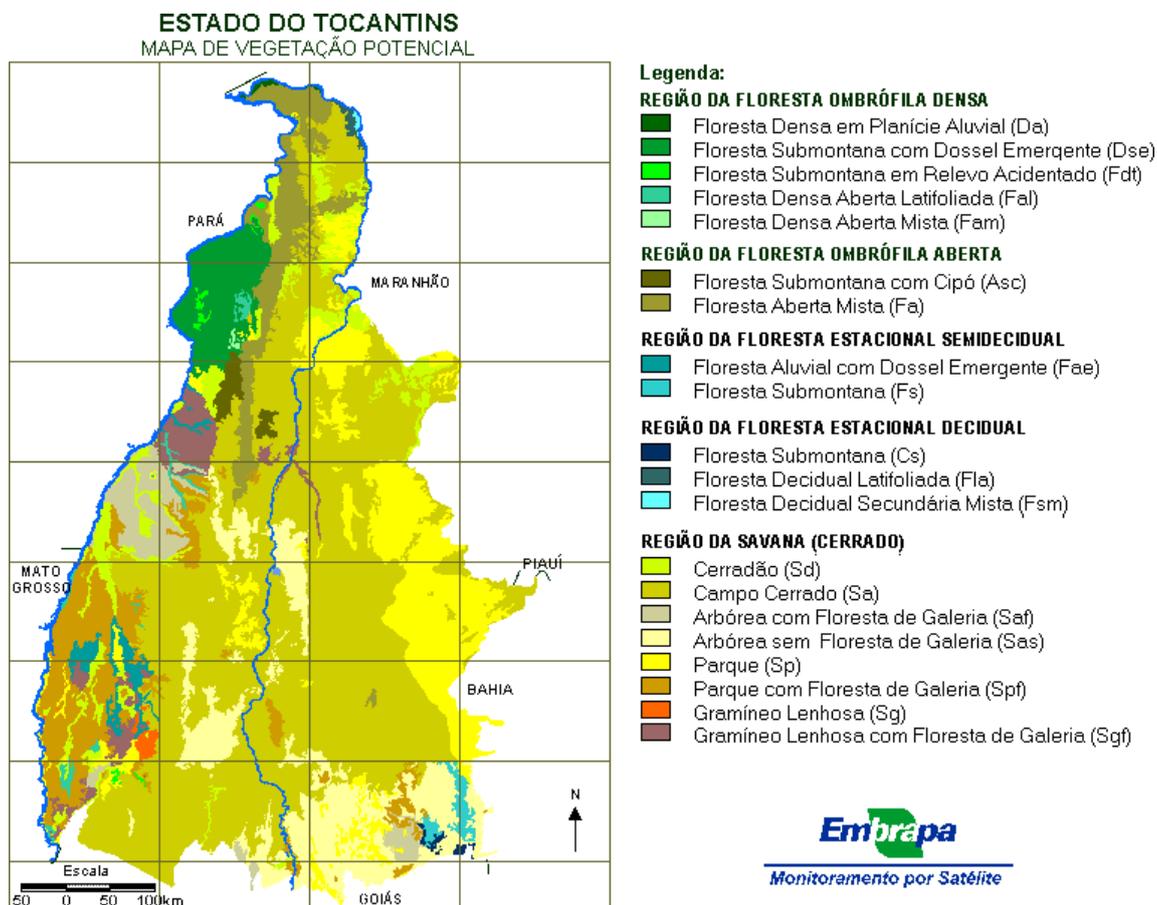


Figura 1.1: Mapa de monitoramento por satélite da vegetação potencial do Estado do Tocantins. Fonte: Embrapa, 1999.

As regiões Sul e Sudeste do Tocantins apresentam vegetação composta por árvores baixas, inclinadas, tortuosas com ramificações irregulares típicas do cerrado (figura 1.2). Em alguns trechos, observa-se a presença de afloramentos rochosos calcários (figura 1.3). Nos últimos anos estas regiões foram sítio de instalação de hidrelétricas como o Aproveitamento Hidrelétrico Peixe Angical, ENERPEIXE SA (figura 1.4) e São Salvador.

A manutenção e expansão do cerrado são muito influenciadas pela dinâmica do fogo, que ao longo dos anos tem propiciado processos de sucessão ecológica e mudanças na fitofisionomia natural. Estima-se que neste bioma existam mais de 6000 espécies de árvores, 800 espécies de aves além de uma grande variedade de peixes e outras formas de vida sendo o Cerrado, portanto, ao lado da mata Atlântica, considerado um dos biomas mais ricos do planeta (Franco & Uzunian, 2004; Silva, 2007). Este tipo de ambiente abriga a fauna de triatomíneos e suas fontes alimentares.



Foto: Catarina Macedo

Figura 1.2: Vegetação típica de cerrado no município de Aurora do Tocantins, região Sudeste do Estado do Tocantins.



Foto: Catarina Macedo

Figura 1.3: Afloramentos rochosos no município de Paranã-TO, região Sul do Estado do Tocantins.



Foto: Banco de dados da Enerpeixe SA

Figura 1.4: Aproveitamento hidrelétrico Peixe Angical (ENERPEIXE SA) no Rio Tocantins – TO.

### 1.3 Fauna triatomínica do Estado do Tocantins

Dados fornecidos pela secretaria de saúde do Estado do Tocantins sobre a fauna triatomínica coletada no peri e intradomicílio nos anos de 1994 e 1995 mostram uma diversidade composta por 12 espécies: *Panstrongylus diasi*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida*, e *Triatoma williami* (Valdir, comunicação pessoal).

A espécie *T. infestans* teve seu último registro domiciliar no município de Combinado, Sudeste do Estado do Tocantins em 2002 (LACEN/TO 2002) e em março de 2003 o Estado recebeu a certificação da interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas por *Triatoma infestans* (Macedo et al, 2011).

Um estudo realizado no período de 2004 a 2006 mostrou que a fauna triatomínica do estado era constituída de 11 espécies abrangendo os três gêneros de importância médica: *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma*

*costalimai*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus lignarius*, *Panstrongylus diasi* e *Panstrongylus lenti* (Oliveira et al, 2008).

Macedo et al (2011), analisando os bancos de dados de informação entomológica e de casos da doença de Chagas no Tocantins no período de 2005 a 2011, verificaram que 18.532 triatomíneos de 16 espécies foram capturados em 126 dos 139 municípios que compõem o estado, com predominância das espécies *Triatoma sordida* (61,6%), *Rhodnius pictipes* (13,6%), *Panstrongylus geniculatus* (9,3%) e *Rhodnius neglectus* (8,6%) com média estadual de infectividade total dos triatomíneos de 6,3%.

Desta forma, ações de vigilância entomológica devem ser realizadas para monitoramento dessas espécies de triatomíneos cujos habitats naturais estão sob constantes ações antrópicas onde podem se estabelecer focos de transmissão da doença de Chagas.

#### 1.4 Epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana, infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, foi revelada pelo médico brasileiro Carlos Chagas que apresentou pela primeira vez este parasito, os seus reservatórios naturais e o agente transmissor (Chagas, 1909; 1912).

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas atinge 10 milhões de pessoas, principalmente na América Latina, e 25 milhões estão em área de risco de contrair a infecção, levando-se em conta a distribuição geográfica dos insetos vetores e múltiplos reservatórios envolvidos nos ciclos de transmissão. Neste cenário, milhões de pessoas podem ter se infectado, desenvolvido a doença e até mesmo morrido sem o diagnóstico e assistência médica adequados, sendo a estimativa de mortes somente para o ano de 2008 de 10.000 pessoas (Moncayo & Silveira, 2009; Coura & Viñas, 2010; WHO, 2010).

No Brasil estima-se que aproximadamente 3 milhões de indivíduos estejam infectados com predominância dos casos crônicos da doença decorrentes de infecção adquiridas no passado (SVS/MS, 2011).

A disseminação da doença de Chagas está associada aos fatores sociais e econômicos como colonização de áreas rurais muitas vezes associada às condições de moradia, crescimento populacional e desenvolvimento industrial que atuam no

desequilíbrio ecológico proporcionando condições favoráveis para o estabelecimento da doença com a aproximação do homem ao ciclo silvestre do *T. cruzi* (Barreto, 1967; Ávila-Pires, 1976; Vinhaes & Dias, 2000; Coura, 2007; Coura & Vinãs, 2010).

Cerca de uma dezena de espécies de triatomíneos apresenta capacidade de se adaptar ao ambiente domiciliar, o que torna a transmissão vetorial o mecanismo primário de difusão da doença (Vinhaes & Dias, 2000).

A transmissão também pode ocorrer por via oral, pela ingestão de alimentos contaminados a partir de triatomíneos ou suas dejeções, congênita, de mãe para filho através da placenta, ou transfusional, no caso de doadores infectados com o parasito, principalmente caso a triagem sorológica não seja realizada corretamente (Vinhaes & Dias, 2000; Dias, 2006a, b; Dias & Neto, 2011; Moraes-Souza & Ferreira-Silva 2011).

Outros mecanismos apontados como secundários também podem acontecer como acidentes de laboratório, manipulação de animais infectados, transplante de órgãos, sexuais (feridas, esperma e fluidos menstruais) ou infecção induzida criminalmente por inoculação ou oralmente (Coura, 2007; Dias & Neto, 2011). Estas vias de transmissão são menos frequentes e correspondem a menos que 1% da incidência total (Schofield, 1994; WHO, 2002).

Os processos migratórios e a ausência de triagem sorológica em bancos de sangue assim como de transplante de órgãos de países não endêmicos da América do Norte e da Europa, bem como no Japão e na Austrália, permitem a expansão da área de ocorrência da doença de Chagas transformando-a num problema de saúde global (Dias & Neto, 2011; Moraes-Souza & Ferreira-Silva, 2011).

O controle vetorial por tratamento químico, com a utilização de inseticidas, pode ser dificultado devido à complexidade do peridomicílio, inacessibilidade de possíveis abrigos e capacidade de jejum dos triatomíneos (Silveira & Dias 2011). No entanto, os triatomíneos apresentam desenvolvimento lento, baixa capacidade de dispersão e variabilidade genética, assim como são suscetíveis a inseticidas em todos os estágios do ciclo de vida com exceção dos ovos, o que favorece as medidas de controle da doença voltadas para a eliminação domiciliar do vetor (Noireau et al, 2005).

Estudos apontam como prioridades no monitoramento e controle da doença de Chagas a realização de estudos de biologia, comportamento e diversidade dos triatomíneos de modo a fornecer dados para o controle e vigilância entomológica. O monitoramento, em longo prazo, em áreas endêmicas com o acompanhamento da

colonização e reinfestação de espécies nos domicílios e possível invasão de espécies silvestres; bem como a implementação de programas de ensino sobre a doença de Chagas para moradores de locais com alto risco de transmissão e para a capacitação dos técnicos de saúde que atuam nas ações de controle vetorial (Costa & Lorenzo, 2009; Gonçalves et al, 2009a, 2010).

No Brasil, até o final dos anos 70, a área com risco de transmissão vetorial da doença de Chagas incluía 18 estados com mais de 2.200 municípios com confirmação de presença de triatomíneos, e destes, 711 com presença de *Triatoma infestans*, na época apontado como principal vetor estritamente domiciliar (SVS/MS, 2011).

Com o estabelecimento de medidas de controle vetorial baseados na borrifação de unidades domiciliares rurais com inseticida para eliminação dos triatomíneos, localidades consideradas endêmicas tiveram a diminuição da presença de triatomíneos nos domicílios assim como a porcentagem de municípios com ocorrência de *T. infestans* reduziu de 30,4% em 1983 para 7,6% em 1993 (Silveira & Vinhaes, 1998). Por conseguinte, em junho de 2006, o Brasil recebeu da Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul a certificação de livre da transmissão vetorial por *T. infestans*. Os índices de transmissão vetorial caíram mais de 95% da área endêmica. No entanto, a certificação de livre de transmissão por *T. infestans*, segundo Silveira (2011), criou a falsa crença de que a doença de Chagas no país estava controlada devido ao mau entendimento do significado da diferença entre erradicação, eliminação e interrupção da transmissão, o que comprometeu a importância atribuída à enfermidade assim como sua vigilância e controle. Da mesma forma, também a transmissão transfusional sofreu enorme redução com o estabelecimento de programas de triagem sorológica em bancos de sangue (Schmunis, 1997; Schofield et al, 2006; Dias 2006b, 2007; Villela et al, 2009; Silveira, 2011).

Em alguns estados (Rio Grande do Sul e Bahia) ainda são encontrados raros focos residuais de *T. infestans* no peridomicílio o que reforça a necessidade da manutenção do estado de vigilância (Dias 2007). Nos estados de Tocantins, Maranhão e Mato Grosso embora a interrupção tenha sido confirmada, foi recomendada a necessidade de adoção de estratégias de vigilância, pelo fato de aí coexistirem áreas em que a transmissão era já conhecida, com características eco-epidemiológicas próprias da região amazônica, bem como casos recentes de surtos causados por via oral.

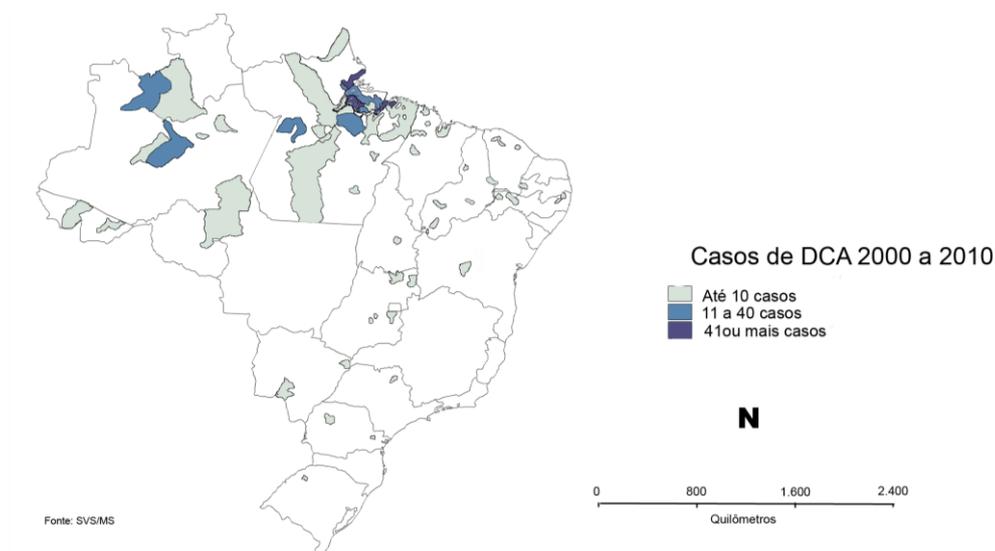
Atualmente, a ocorrência da doença de Chagas no Brasil está relacionada a regiões com risco de transmissão vetorial, onde segundo o Consenso de Chagas (SVS/MS 2005) deve concentrar ações de vigilância entomológica para manutenção da interrupção da transmissão da doença de Chagas por *T. infestans* e para prevenção da domiciliação de outras espécies vetoras, que podem passar a ocupar esses nichos deixados vagos, e na região da Amazônia Legal, onde vem ocorrendo surtos de doença de Chagas aguda relacionados à ingestão de alimentos contaminado (exemplo, açaí, caldo de cana e bacaba) bem como casos isolados por transmissão vetorial extradomiciliar (Valente et al. 2001; Pérez–Gutiérrez et al. 2006; Valente SAS, 2008; SVS/ MS, 2011).

Os últimos dados da secretaria de vigilância em saúde do Brasil apontam a importância da via de transmissão oral tendo em vista que, dos 1086 casos da doença de Chagas aguda no período de 2000 a 2010, 70% (765/1086) ocorreram por transmissão oral, 7% (80/1086) por transmissão vetorial e 22% (234/1086) sem forma de transmissão identificada (SVS/MS, 2011). A figura 1.5 mostra o número de casos agudos por município neste período.

No Estado do Tocantins, a epidemiologia da doença de Chagas está associada à transmissão oral e aos fatores sociais como condições precárias de moradia incrementados pelas as ações antrópicas sobre o meio ambiente, que favorecem a domiciliação de triatomíneos, como ocupação humana de áreas originalmente silvestres, por meio de queimadas e desmatamentos, assim como pela instalação recente de hidrelétricas que levam à fragmentação do ambiente, alteram a dinâmica da fauna natural e aproximam o homem de espécies vetoras silvestres, incluindo os triatomíneos e conseqüentemente o ciclo silvestre do parasito *T. cruzi* (Vaz et al. 2007). Estas localidades impactadas carecem de estudos sobre a biodiversidade (Machado et al. 2008), bem como a respeito da fauna triatomínica silvestre.

Segundo Oliveira (2008), a vigilância epidemiológica no Estado está centrada no controle da transmissão vetorial em ações de vigilância entomológica. Estas têm como objetivo a detecção da presença do vetor e prevenção da colonização de forma pró-ativa e de acordo com o grau de risco existente para a transmissão da doença em determinada localidade, baseado em indicadores de morbidade (casos agudos ou crônicos autóctones da doença), entomológicos (espécie do vetor, infestação e dispersão) e ambientais (domiciliar e extra-domiciliar) (SVS/MS, 2005).

Apesar de políticas públicas terem sido instituídas para melhoria das unidades habitacionais (figura 1.6) em municípios do Tocantins, ainda são encontradas neste Estado, não somente em beira de estrada, moradias de pau a pique (figura 1.7), construídas em áreas originalmente silvestres, favoráveis a domiciliação de triatomíneos e ao estabelecimento de novos focos da doença de Chagas.



Fonte: SVS/MS. Dados sujeitos à modificação.

Figura 1.5: Número de casos de doença de Chagas aguda, por município, no Brasil, período de 2000 a 2010.



Foto: Teresa Cristina M. Gonçalves

Figura 1.6: Casa construída com recursos do programa de melhorias habitacionais para a doença de Chagas, município de Combinado - TO.



Foto: Catarina Macedo

Figura 1.7: Moradias de pau-a-pique construídas em beira de estrada no município de Paranã -TO.

No período entre 2005 e 2011 no Estado do Tocantins foram registrados casos agudos da doença em municípios das regiões de saúde de Porto Nacional (1 caso no município de Pindorama do Tocantins – 2007) e Bico do Papagaio ( 1 caso no municípios de Esperantina – 2008, 1 em Augustinópolis – 2008 e 4 casos, por via oral, em Axixá do Tocantins – 2008) (Macedo et al, 2011). E, recentemente, em novembro de 2011, 7 casos foram confirmados no município de Ananás, localizado no Norte do Estado, em surto atribuído ao consumo de suco de juçara contaminado. Este suco, bastante apreciado na região, é extraído de forma artesanal da palmeira juçara (Tum, 2011).

### 1.5 Taxonomia de triatomíneos

A identificação específica de triatomíneos tem sido baseada nos caracteres morfológicos resumidos nas chaves dicotômicas de Lent & Wygodzinsky (1979) que compreende 111 espécies e 15 gêneros, distribuídos em 5 tribos.

Descrições de novas espécies assim como a revalidação de espécies e gêneros encontram-se listadas nos trabalhos de revisão taxonômica de Carcavallo (2000) e Galvão et al (2003).

Hypsa et al (2002) estudaram 57 espécies de Triatominae e, a partir de sequenciamento de DNA e análises filogenéticas, separaram as espécies em três grupos: *Rhodnius*, *Triatomini* norte andinas e espécies da América do Sul.

Schofield & Galvão (2009) em proposta mais recente, dividem as espécies do gênero *Triatoma* em três grupos:

1 - Rubrofasciata, que inclui a maioria das espécies da América do Norte e do Velho Mundo e apresenta os complexos Phyllosoma, Flavida (=Nesotriatoma), Rubrofasciata, Protracta e Lenticularia;

2 - Dispar, com as espécies dos Andes, que inclui o complexo Dispar;

3 - e Infestans que compreende as espécies da América do Sul e apresenta os complexos Infestans e Spinolai (Mepraia). O complexo infestans por sua vez é dividido em seis subcomplexos: *brasiliensis* (*T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrochiae*, *T. lenti*, *T. sherlock*), *infestans* (*T. delpontei*, *T. infestans*, *T. platensis*), *maculata* (*T. arthurneivai*, *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. wygodzinskyi*), *matogrossensis* (*T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. guazu*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vandae*, *T. william*), *rubrovaria* (*T. carcavallo*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. limai*, *T. oliveirai*, *T. rubrovaria*) e *sordida* (*T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. patagonica*, *T. sordida*).

A reorganização desses novos agrupamentos taxonômicos bem como a descoberta de novas espécies revelam a necessidade de atualização constante de chaves dicotômicas, devidamente ilustradas, que devem ser amplamente divulgadas no meio científico e nas instituições de saúde de modo a facilitar a identificação taxonômica específica tanto em trabalhos de pesquisas sobre os triatomíneos quanto pelos programas de vigilância entomológica para o controle da doença de Chagas.

O estudo para a validação de novas espécies aborda características fenotípicas cuja divergência contribui direta ou indiretamente para a redução do fluxo gênico entre populações. Da mesma forma, o levantamento dos traços de evolução rápida como as diferenças fenotípicas, bioquímicas ou comportamentais entre espécies próximas (“irmãs”), e não somente o isolamento reprodutivo, pode gerar hipóteses sobre as causas fenotípicas da diferenciação ou possível processo de especiação (Barraclough, 2010; Shaw & Mullen, 2011).

O conceito morfológico de espécie, amplamente utilizado na taxonomia de triatomíneos, considera essas variações fenotípicas relativas à morfologia destes insetos.

Porém, segundo conceito biológico de espécie, espécies são grupos de populações naturais que estão ou tem potencial de se inter cruzar, ocupam um nicho específico na natureza e estão reprodutivamente isoladas de outros grupos (Mayr, 1942). Neste sentido, Ryckman (1962) afirma que o isolamento reprodutivo seria o melhor critério para acessar o status taxonômico de uma determinada população.

No entanto, estudos sugerem que o isolamento reprodutivo seria a perda da compatibilidade reprodutiva sendo, portanto, uma consequência do processo de especiação e não a causa (Patterson 1985; Harrison, 1998; Shaw, 2001; Via & West 2008; Mallet, 2010; Shaw & Mullen, 2011).

O uso dos experimentos de cruzamentos com fins taxonômicos foi revisado por Usinger et al (1966) que consideraram o conceito biológico para a definição das espécies em Triatominae, atualmente visto como difícil de ser aplicado uma vez que muitas espécies podem formar híbridos em condições artificiais ou naturais (Monteiro et al, 2004; Pérez et al, 2005).

Barret (1996) realizou cruzamentos entre colônias mantidas em laboratório de *Rhodnius* e levantou dúvidas quanto a validade do status taxonômico específico de *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927. Outros experimentos realizados em laboratório para avaliar a compatibilidade reprodutiva e genética de quatro populações geográficas de *T. brasiliensis* mostraram que apesar de geneticamente heterogêneas as populações reproduziam-se entre si (Costa et al, 2003). Costa et al (2009), porém, afirmaram que neste caso a compatibilidade reprodutiva não seria prova de que as populações pertencem a mesma espécie e, baseados no aparente processo de especiação, verificado pelo estudo da variação morfológica, bioquímica e molecular (Costa et al. 1997; 2001), assim como na conhecida possibilidade de hibridização em Triatominae em condições artificiais, consideraram que uma das populações (melânica) poderia ser elevado a um nível específico. Outros experimentos realizados em laboratório por Costa et al (2009) verificaram através de estudos geográficos, morfométricos, morfológicos e ecológicos a possibilidade da subespécie *T. brasiliensis macromelasoma* ser produto de hibridização entre duas outras (*T. brasiliensis brasiliensis* e *T. juazeirensis*) e aventam a hipótese de que a hibridização pode constituir um mecanismo de especiação em espécies afins de triatomíneos.

Neste sentido, Jurberg (2003) afirma que a definição de uma espécie de triatomíneo consiste em “tarefa complexa” que, atualmente, pressupõe também

construir a árvore evolutiva dos grupos estabelecendo a filogenia, o uso de múltiplas ferramentas e de uma coleção de referência.

No caso de populações de morfologia próximas, quando não é possível identificar a espécie somente com os critérios morfológicos clássicos, é necessária, portanto, a utilização de outras abordagens morfológicas e moleculares como, por exemplo, o estudo das estruturas fálicas, da ultraestrutura de caracteres de valor taxonômico, a análise comparativa de estruturas por morfometria geométrica e análises moleculares para identificação destas espécies.

As estruturas fálicas foram utilizadas para a comprovação de diferenças específicas nos complexos: *Triatoma wygodzinsky* (*T. pseudomaculata* e *T. wygodzinsky*) e *Triatoma sordida* (*T. sordida* e *T. guasayana*) e no estudo de outras espécies do gênero *Triatoma* e dos gêneros *Psammolestes*, *Rhodnius*, *Paratriatoma*, *Eratyrus*, *Cavernicola* e *Panstrongylus* (Lent et al, 1996; Lent & Jurberg 1965; 1969a; 1969b; 1970; 1971; 1972; 1975; Jurberg 1977; 1996; Lent & Juberg 1978; 1980; Costa et al 1997; Jurberg & Galvão 1997; Carbajal de La Fuente 2007).

A genitália externa das fêmeas, cujo valor taxonômico foi questionado na década de 60, foi recentemente estudada com a utilização da técnica de microscopia eletrônica de varredura, sugerindo sua importância na taxonomia e diferenciação das espécies *Panstrongylus herreri*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius colombiensis*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* e *Triatoma vitticeps* (Rosa et al, 2010). Esta mesma abordagem foi utilizada para o gênero *Rhodnius*, que apresenta maiores dificuldades para a identificação específica (Neiva & Pinto, 1923) e possibilitou a separação de 12 espécies por meio das estrias cuticulares, forma dos segmentos abdominais e das estruturas das genitálias externas de fêmeas observadas por vista dorsal, posterior e ventral (Rosa et al, 2011).

A morfometria geométrica das asas também tem sido utilizada para identificação taxonômica específica em Triatominae de espécimes dos gêneros *Rhodnius* (Matias et al, 2001; Villegas et al, 2002), *Triatoma* (Gumiel et al, 2003; Carbajal de La Fuente, 2007; Carbajal de La Fuente et al, 2011; Gurgel-Gonçalves et al, 2011) e *Mepraia* (Campos et al, 2011). Dujardin (2008) afirma que a morfometria auxilia a responder questões inerentes às características biológicas e epidemiológicas das espécies. Porque esta técnica, que consiste no estudo de conformação e tamanho das asas a partir da comparação de pontos homólogos, também permite inferir sobre a influência dos fatores ambientais como temperatura,

ecótopo e alimentação na variação morfológica intra-específica (Schachter-Broide et al, 2009).

O sequenciamento de DNA mitocondrial, que é herdado maternalmente, não sofre recombinação e apresenta uma taxa de evolução de até dez vezes maior que o DNA nuclear, transformando-se numa excelente técnica para a separação de espécies crípticas e estudos de filogenia de triatomíneos. Os marcadores do mtDNA mais utilizados no estudo da filogenia de triatomíneos são os fragmentos que originam as subunidades ribossomais 12S e 16S, citocromo oxidase I (COI) e citocromo b (Cytb) para os quais já foram depositadas inúmeras sequências no banco de dados de DNA - GenBank (Garcia & Powell, 1998; Monteiro et al, 1998; Lyman et al, 1999; García et al, 2001; Monteiro et al, 2000; García et al, 2001; Hypsa et al, 2002; Abad-Franch et al, 2003; Monteiro et al, 2004; Sainz et al, 2004; Abad-Franch, 2005; Martinez et al, 2006; Pfeiler et al, 2006; Almeida et al, 2009; Gardim, 2010).

Outras técnicas de análise do DNA como o RFLP (Naegele et al, 2006), RAPD (Garcia et al, 1998; Pacheco et al, 2003) e sequenciamento de genes nucleares (Monteiro et al, 2000; Bargues et al, 2002; Marcilla et al, 2002) também tem sido utilizadas para auxiliar na definição taxonômica de espécies, bem como para estabelecer a filogenia entre as espécies de triatomíneos.

A combinação, portanto, da análise de DNA mitocondrial e nuclear com a caracterização fenotípica e da compatibilidade reprodutiva obtida em experimentos de cruzamentos permite reunir os conceitos morfológico, biológico e filogenético de espécie, resultando em classificação que refletiria um agrupamento natural destes insetos e diminuindo, portanto, as chances da formação de classificação artificial por não levar em consideração a origem evolutiva de cada grupo taxonômico.

Neste estudo, será utilizada uma abordagem sistemática multidisciplinar, incluindo análise morfológica e molecular, para definição do status específico de espécimes cujas características analisadas pela morfologia clássica, resumidas na chave dicotômica de Lent & Wygodzinsky (1979), não permitiram a identificação taxonômica dos mesmos.

## 2. Justificativa

Em 2006, os 139 municípios que compõem o estado do Tocantins foram classificados como de alto, médio ou baixo grau de risco de transmissão vetorial da doença de Chagas. Aqueles de alto risco, como Paranã e Aurora do Tocantins, incluíam 24,47% dos municípios, os de médio risco 52,51% e os de baixo 23,02% (Oliveira, 2008).

Nos municípios da região sudeste do estado de Tocantins, durante muitos anos, foi registrada a ocorrência no intradomicílio do principal vetor do agente etiológico da doença de Chagas, *T. infestans*. Após sucessivas campanhas de combate a este inseto no ambiente domiciliar e peridomiciliar, outras espécies, como *T. costalimai*, passaram a ocupar os nichos que foram deixados vagos por *T. infestans* podendo, desta forma, vir a exercer um papel importante na transmissão da doença de Chagas nesta região.

Favorecendo o comportamento de ocupação destes nichos, as ações antrópicas em busca de melhorias de vias terrestre de comunicação, de vias de abastecimento de água e esgoto para as áreas de assentamentos de populações humanas e de construção de usinas hidrelétricas produzem efeitos impactantes na flora e fauna locais. Como consequência, os animais buscam de forma ativa novos habitats, e no caso dos triatomíneos, aumenta a possibilidade de invasões domiciliares e formação de novos focos da doença de Chagas (Forattini et al, 1971, Ferrete et al, 2004).

O estudo taxonômico dos triatomíneos capturados em regiões impactadas e endêmicas para a doença de Chagas, possibilita conhecer a biodiversidade destes insetos vetores, que podem vir a colonizar ambientes artificiais e participar do ciclo de transmissão do parasito *T. cruzi*. Da mesma forma, a correta identificação taxonômica é importante para o estabelecimento de programas de controle por permitir acesso a informações como o habitat de adultos e formas jovens, possíveis hospedeiros, ecologia, competência vetorial, histórico de epidemias e medidas de controle apropriadas para cada espécie.

No intuito de realizar um levantamento da fauna de insetos envolvidos na transmissão de agentes patógenos aos homens e animais por decorrência da construção da Usina de Aproveitamento Hidrelétrico de Peixe Angical, em 2004, através de um convênio firmado entre o Instituto Oswaldo Cruz e a empresa ENERPEIXE S.A., foram iniciados estudos de monitoramento da entomofauna da

área impactada. Este projeto envolveu os municípios de Peixe, São Salvador e Paranã, no sudoeste do Tocantins, e confirmou a presença no ambiente silvestre das espécies *T. sordida*, *T. pseudomaculata*, *T. costalimai* e *R. neglectus* (Gonçalves et al. 2009b). Além dessas espécies, alguns espécimes não se enquadraram nos padrões morfológicos característicos descritos na chave dicotômica de Lent & Wygodzinsky (1979) podendo somente ser classificados até a categoria de gênero (*Triatoma*) com características morfológicas afins de *T. costalimai* e *T. williami*.

Em agosto de 2011, três exemplares deste novo morfotipo, duas fêmeas e um macho, até então somente encontrado em ambiente silvestre, foram coletados no domicílio, distante 200m do ambiente silvestre, de uma fazenda no município de Paranã (Adriana Feitosa, SESAU -TO, comunicação pessoal).

No presente trabalho abordagens morfológicas e moleculares foram utilizadas para verificar se este morfotipo de *Triatoma* sp. pode ser classificado como uma nova espécie de modo a contribuir para o conhecimento da biodiversidade e fornecer dados que poderão ser utilizados em ações de vigilância entomológica.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

Definir se espécimes de triatomíneos capturados na região Sul do Estado do Tocantins constituem uma nova espécie.

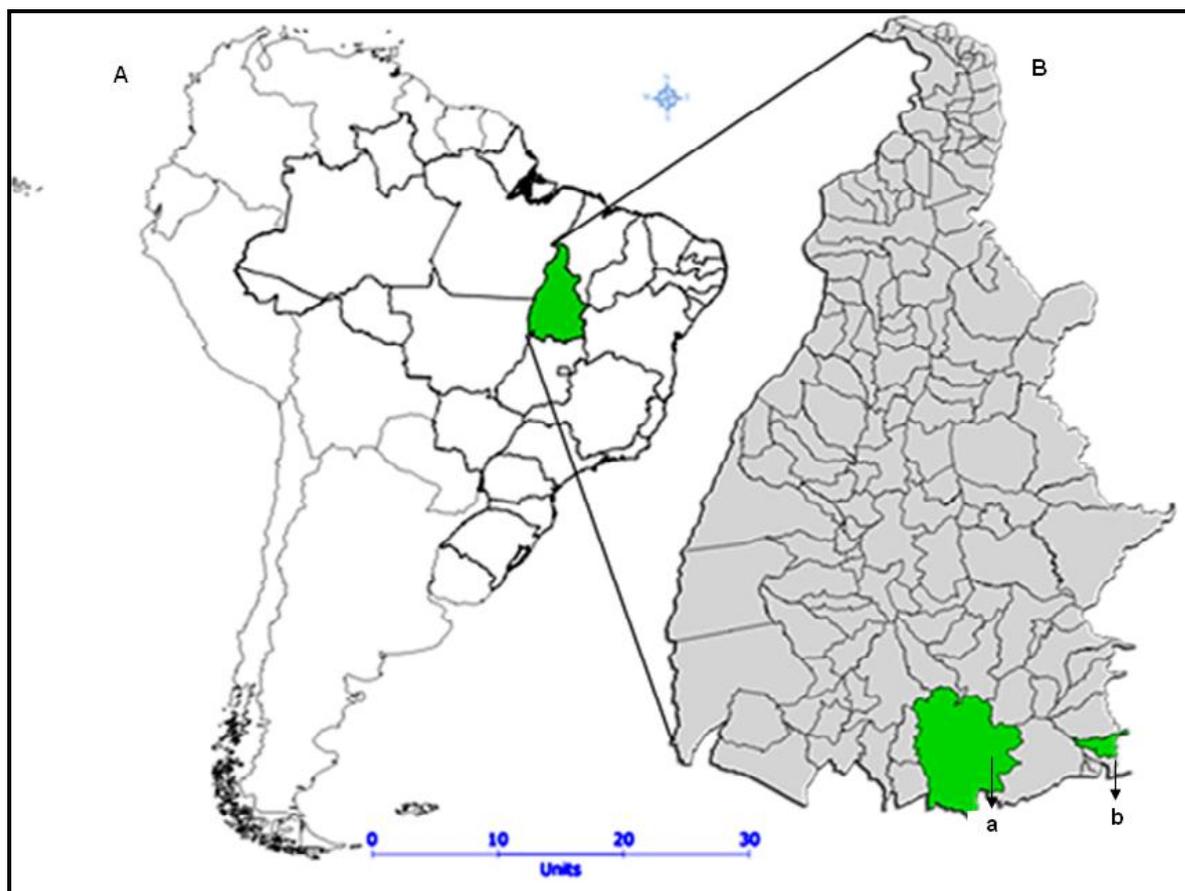
#### 3.2 Objetivos Específicos

- Identificar os espécimes coletados de acordo com a chave dicotômica de Lent & Wygodzinsky (1979);
- Analisar as estruturas externas de valor taxonômico dos espécimes coletados, utilizando morfometria clássica e comparar com *T. costalimai*;
- Descrever a morfologia da genitália externa de fêmeas e comparar com as espécies próximas *T. costalimai* e *T. williami*;
- Verificar a proximidade fenotípica entre estes espécimes e as espécies de morfologia semelhantes, *T. costalimai* e *T. williami*, por morfometria geométrica das asas;
- Verificar a distância genética entre os espécimes de status específico não definido e as espécies *T. costalimai* e *T. williami* bem como desenvolver a reconstrução filogenética utilizando seqüências de um fragmento de gene mitocondrial.

## 4. Material e métodos

### 4.1. Obtenção e manutenção dos espécimes

Os insetos a serem identificados, aqui denominados *Triatoma* sp. assim como espécimes de *Triatoma costalimai* foram capturados no período de 2005-2007 e em Abril de 2011 nos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins – Tocantins (figura 4.1).



Elaborado por Catarina Macedo

Figura 4.1: A - Localização do Estado do Tocantins; B – Municípios trabalhados: a – Paranã, b – Aurora do Tocantins.

As capturas foram realizadas no ambiente silvestre em afloramentos rochosos (figura 4.2) e no peridomicílio, em amontoados de madeiras (figura 4.3) por busca ativa e passiva com armadilhas do tipo Noireau (Noireau et al, 1999). Os insetos capturados foram cuidadosamente retirados das armadilhas (figuras 4.4, 4.5 e 4.6) e acondicionados em tubos contendo papel filtro dobrado “em sanfona” e tampas com

pequenos orifícios. Cada tubo foi identificado com o número do ponto de captura que foi georeferenciado com a utilização de um GPS modelo Etrex Garmin.

No município de Paranã-TO foram estabelecidos 3 pontos de captura (A, B e C). A distância entre A e B corresponde a 5,8Km, entre A e C 4,79Km e B e C 1,15Km. No município de Aurora do Tocantins, as capturas foram realizadas em 4 pontos (D, E, F, e G). A distância entre D e E corresponde a 6,26Km, D e F 5,85Km, D e G 5,78Km, E e F 0,39Km, E e G 3,81Km e F e G 3,64Km.

No laboratório estes insetos foram mantidos em condições estáveis de temperatura (25-28°C) e umidade (78-82%) com alimentação a cada 15 dias em camundongos suíços segundo protocolo CEUA LW 14/10.



Foto: Catarina Macedo

Figura 4.2: Colocação de armadilhas Noireau em afloramentos rochosos.



Foto: Catarina Macedo

Figura 4.3: Busca ativa de triatomíneos no peridomicílio.



Foto: Catarina Macedo

Figura 4.4 Captura de ninfas e macho de *T. costalimai* com armadilha Noireau.



Foto: Catarina Macedo

Figura 4.5: Captura de macho de *Triatoma* sp. com armadilha Noireau.



Foto: Catarina Macedo

Figura 4.6: Retirada de ninfa de triatomíneo da armadilha Noireau.

Nas análises, tanto morfológicas quanto moleculares, para o estudo de *Triatoma* sp. também foram utilizados espécimes das espécies morfológicamente próximas *T. costalimai* e *T. williami* assim como da espécie *T. sordida* cujas procedências encontram-se resumidas no quadro 4.1.

Quadro 4.1: Relação das espécies de triatomíneos analisadas, com as respectivas procedências .

Espécie	Localidades	Total de espécimes utilizados	
		Fêmeas	Machos
<i>Triatoma</i> sp.	Paraná / TO*	63	50
<i>Triatoma costalimai</i>	Aurora do Tocantins / TO*	36	28
	Paraná / TO*	6	3
	Lavandeira / TO*	-	1
	Taguatinga / TO*	1	-
	São Desidério / BA*	3	1
<i>Triatoma sordida</i>	Itaobim / MG*	2	2
	Paranaíba / MS*	2	1
	São Valério / TO*	7	3
<i>Triatoma williami</i>	Barra das Garças / MT**	5	5

\* Espécimes silvestres, capturados em expedições de campo realizadas pelo Setor de Entomologia Médica e Forense do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – IOC / FIOCRUZ

\*\* Espécimes de colônia cedidos pelo Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

## 4.2 Caracterização morfológica e morfométrica

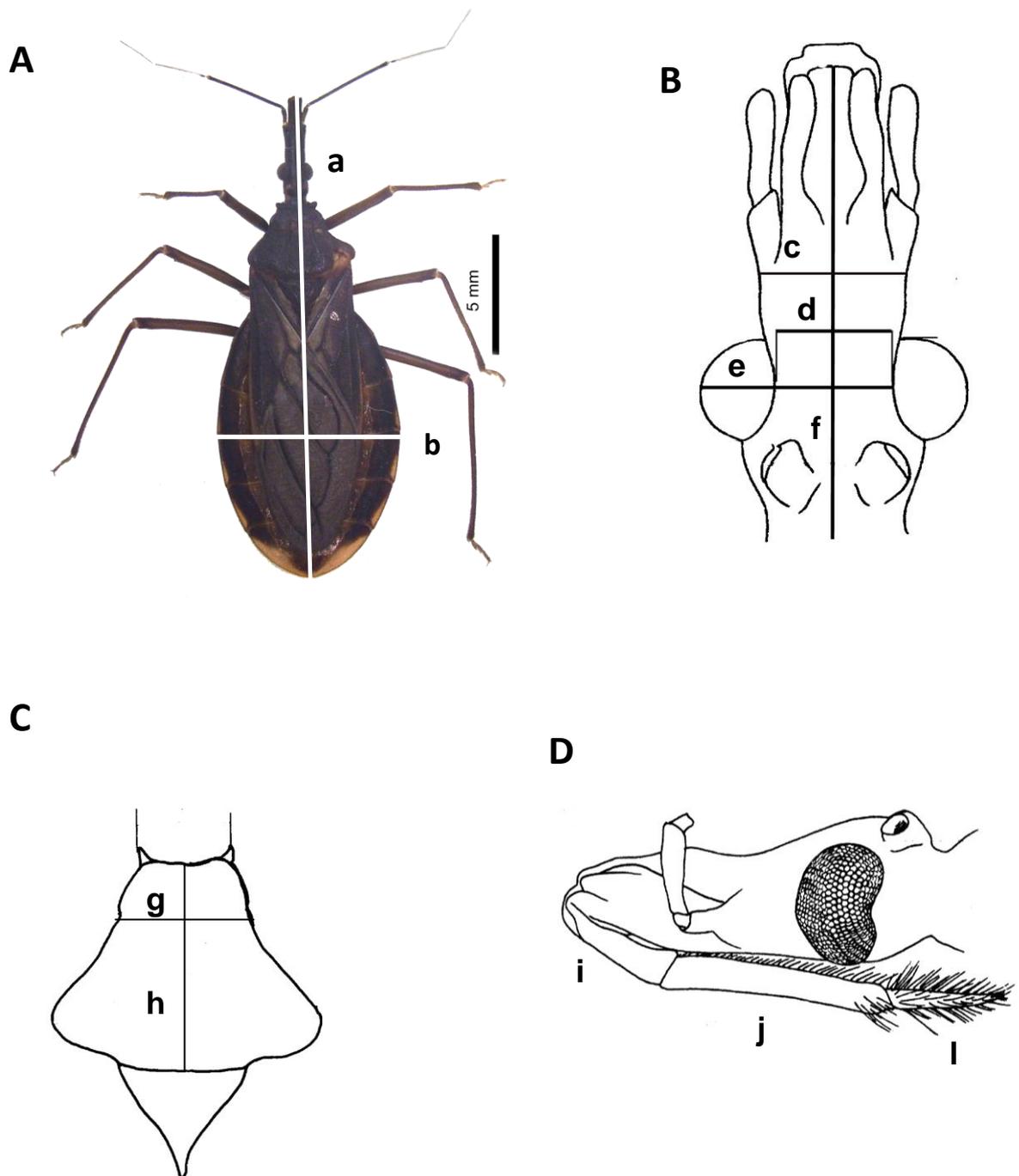
### 4.2.1 Morfologia externa

A identificação taxonômica foi baseada nos critérios estabelecidos por Lent & Wygodzinsky (1979). Para as análises morfológicas e morfométricas do comprimento total do corpo, da cabeça, do pronoto e do 1º, 2º e 3º segmentos rostrais bem como a largura da cabeça, dos olhos, do pronoto, do abdômen, e distância interocular (figura 4.8) foi utilizado o microscópio estereoscópio com ocular milimetrada. Um total de 60 espécimes de *Triatoma* sp. (30 machos e 30 fêmeas) e 37 de *Triatoma costalimai* (23 machos e 14 fêmeas) foram analisados.

Os espécimes capturados foram montados com alfinetes entomológicos conforme metodologia preconizada por Almeida et al (1998), e serão depositados na Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

### 4.2.2 Morfologia da genitália externa das fêmeas em microscopia eletrônica de varredura

O estudo da morfologia da genitália externa de fêmeas foi realizado com 10 espécimes de *Triatoma* sp., 10 de *Triatoma costalimai* e 5 de *T. williami*. Os triatomíneos foram seccionados, no sentido transversal, na altura do sexto segmento abdominal. A porção terminal do abdômen foi lavada, desidratada em série alcoólica crescente nas concentrações de 7,5%, 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes em 100%, por imersão durante 10 minutos em cada concentração. As estruturas foram montadas em suporte sobre fita adesiva nas posições ventral ou dorsal, formando um ângulo de 90º e deixada em estufa a 50ºC para secagem por 24 horas e em dessecador contendo sílica gel até a metalização (Santos-Mallet et al, 2012). Posteriormente foram metalizadas com ouro e examinadas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM 6390 LV da Plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ.



Esquemas adaptados de (Macedo, 2001).

Figura 4.7: Caracteres usados na morfometria. A – *Triatoma* sp. vista dorsal, a – comprimento total do corpo, b – largura do abdômen; B – Cabeça vista dorsal, c – largura da cabeça, d – distância interocular, e – largura do olho, f – comprimento da cabeça; C –pronoto em vista dorsal, g – largura do pronoto, h – comprimento do pronoto; D – cabeça em vista lateral, i – 1º segmento rostral, j – 2º segmento rostral, l – 3º segmento rostral.

#### 4.2.3 Análise morfométrica das asas

Foram fotografadas asas direita e esquerda de machos e fêmeas de *Triatoma* sp., *T. costalimai*, *T. williami* e de *T. sordida* (o último escolhido como grupo externo), conforme tabela 4.1. Asas com falta de nervuras, incompletas, deformadas ou ausentes foram descartadas pela impossibilidade de marcação dos pontos anatômicos.

Tabela 4.1: Espécies analisadas, localidades de origem e número de espécimes fêmeas e machos.

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Machos</b>
<i>Triatoma</i> sp.	Paraná - TO	85	67
<i>T. costalimai</i>	Aurora do Tocantins - TO	54	67
<i>T. williami</i>	Barra das Garças - MT	5	10
<i>T. sordida</i>	São Valério - TO	14	6

As asas foram removidas na base da articulação com o tórax, montadas entre lâmina e lamínula com álcool a 70%, número de identificação do espécime e escala (figura 4.8), e fotografadas com câmara fotográfica digital (Sony D SC – S70) acoplada ao microscópio estereoscópico (Zeiss – SV6®).

Seguindo a metodologia definida por Bookstein (1991), sete pontos anatômicos de referência (Landmarks) foram selecionados, unidos e analisados a partir da arquitetura geométrica formada (Fig. 4.8). Esses pontos foram convertidos em matrizes de coordenadas bidimensionais. Realizaram-se comparações do tamanho (utilizando como estimador isométrico o tamanho do centróide) e de conformação (usando o método de Procrustes). Para analisar o tamanho isométrico, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis previamente corrigido pelo método de Bonferroni. A proximidade entre a origem dos ambientes (ou sub-regiões biogeográficas) foi analisada usando as distâncias de Mahalanobis. As mesmas foram derivadas das variáveis de conformação e sua significância estatística foi computada pelo teste de permutação. As análises foram executadas com CLIC v45 e JMP v4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, U.S.A.).

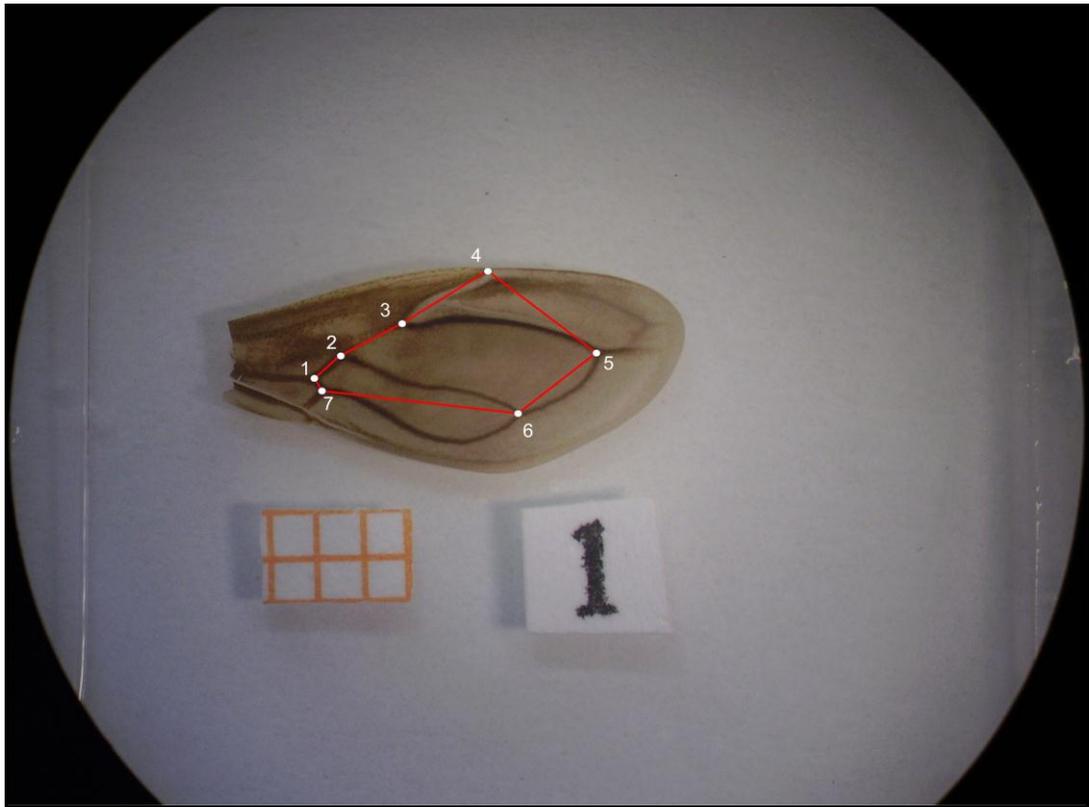


Foto: Simone Caldas Teves Neves

Figura 4.8: Asa direita de fêmea de *Triatoma* sp. com marcação dos pontos anatômicos de referência, identificação do espécime e escala.

### 4.3 Filogenia molecular

O DNA total foi extraído a partir de 3 pernas de 4 espécimes de *Triatoma* sp., 10 de *Triatoma costalimai*, (incluindo 1 de Lavandeira –TO, 1 de Taguatinga-TO, 1 de Paranã – TO, 3 de Aurora do Tocantins e 4 de São Desidério-BA, provenientes de colônias do LTL – IOC/FIOCRUZ) , 5 de *Triatoma williami* e 7 de *Triatoma sordida*, daqueles utilizados nas análises morfológicas e morfométricas. Como grupo externo foram incluídas duas sequências do gênero *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) (AY035437 e AF324519) obtidas no banco de dados de DNA (genbank) (quadro 4.2).

Quadro 4.2: Espécimes de estudo, código de identificação e localidade de origem.

<b>Espécie</b>	<b>Código do espécime</b>	<b>Localidade</b>
<i>Triatoma</i> sp.	T sp 04	Paraná – TO
<i>Triatoma</i> sp.	T sp 16	Paraná – TO
<i>Triatoma</i> sp.	T sp 03	Paraná – TO
<i>Triatoma</i> sp.	T sp 05	Paraná – TO
<i>T. costalimai</i>	TC 04	Lavandeira – TO
<i>T. costalimai</i>	TC 06	Aurora do Tocantins - TO
<i>T. costalimai</i>	TC 08	Taguatinga – TO
<i>T. costalimai</i>	TC 09	Aurora do Tocantins – TO
<i>T. costalimai</i>	TC 11	Aurora do Tocantins - TO
<i>T. costalimai</i>	TC 20	Paraná - TO
<i>T. costalimia</i>	TC 141	São Desidério – BA
<i>T. costalimai</i>	TC 142	São Desidério – BA
<i>T. costalimai</i>	TC 145	São Desidério – BA
<i>T. costalimai</i>	TC 146	São Desidério – BA
<i>T. williami</i>	TW 01	Barra das Garças – MT
<i>T. williami</i>	TW 02	Barra das Garças – MT
<i>T. williami</i>	TW 03	Barra das Garças – MT
<i>T. williami</i>	TW 04	Barra das Garças – MT
<i>T. williami</i>	TW 05	Barra das Garças – MT
<i>T. sordida</i>	ITA 22	Itaobim – MG
<i>T. sordida</i>	ITA 24	Itaobim – MG
<i>T. sordida</i>	ITA 25	Itaobim – MG
<i>T. sordida</i>	ITA 26	Itaobim – MG
<i>T. sordida</i>	Par 03	Paranaíba – MS
<i>T. sordida</i>	Par 04	Paranaíba – MS
<i>T. sordida</i>	Par 05	Paranaíba – MS
<i>R. stali</i>	GenBank AY035437	---
<i>R. prolixus</i>	GenBank AF324519	---

As pernas de cada espécime foram acondicionadas em microtubos de 1,5mL. Cada microtubo foi submerso em nitrogênio líquido e as amostras foram maceradas até a obtenção do aspecto de pó. Em seguida, foram adicionados 300 µL de tampão de extração (0,4M NaCl, 10mM tampão tris pH 8,0, 2mM EDTA pH8,0), passando por outra maceração. Foram adicionados SDS 20% (concentração final de 2%) e proteinase K 20mg/ml (concentração final de 400µg/mL). O conteúdo foi homogeneizado com leves batidas e incubado a 65°C em banho-maria durante a noite (aproximadamente 16 horas). Após incubação, adicionou-se NaCl 6M (na proporção 4:3 na relação tampão de extração: NaCl 6M) e homogeneizou-se por 30 segundos com a utilização de um vortex. Em seguida o conteúdo foi centrifugado por 30 minutos a 10000g, o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde adicionou-se igual volume de isopropanol. Este material foi incubado a -20°C por 1 hora e

novamente centrifugado por 20 minutos a 10000g (4°C). Por fim, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se etanol 70% em cada microtubo, que foi posteriormente descartado. O material foi ressuspendido em água mili-Q e armazenado a -20°C (Aljanabi & Martinez, 1997).

A amplificação por PCR e sequenciamento do fragmento do gene 16S, de aproximadamente 530 pares de bases, foi realizada com a utilização dos iniciadores 16sa (senso) 5' – CGT CTG TTT ATC AAA AAC AT 3' e 16sb (antisenso) 5' – CTC CGG TTT GAA CTC AGA TCA 3' (Weirauch & Munro, 2009). A reação foi realizada em termociclador eppendorf *Master-cycle Gradient* com desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos com extensão final por 7 minutos a 72°C. Foram utilizados 0,5µL da solução de DNA genômico para um volume final de reação de 50µL cujo protocolo da reação segue resumido na tabela 4.2. Como controle negativo foi utilizada uma alíquota de água.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com Syber® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™).

Cada amostra amplificada foi purificada utilizando a enzima Exosap – IT (Prodinol). O volume de 5 µL do produto de PCR e 2 µL de exosap foram incubados a 37°C por 15 minutos seguidos de mais 15 minutos a 80°C para inativação da enzima.

Tabela 4.2: Protocolo de reação de PCR para amplificação de fragmento de gene 16S.

Reagentes (concentração)	Quantidade (µL)	Concentração final em 50 µL de reação
Tampão 10x	5,0	1x
MgCl 25mM	4,0	2 mM
dntp 2mM	5,0	0,2 mM
Primer 16sa 5µM	2,0	10 pmol
Primer 16sb 5µM	2,0	10 pmol
Taq polimerase 5U/ µl	0,25	1,25U

\* Completar com 0,5 µL de DNA e água mili-Q qsp 50 µL.

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados 3,5 µL do purificado para cada uma das fitas senso e anti-senso e os mesmos iniciadores da reação de PCR segundo protocolo apresentado na tabela 4.3. Foram utilizados 30 ciclos nas seguintes temperaturas: 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 48°C e 4 minutos a 60°C.

Tabela 4.3: Protocolo para a reação de seqüenciamento

Reagentes (concentração)	Quantidade (µL)	Concentração final
ABI Prism ® Big Dye ® Terminator v3.1 cycle sequencing	1	-
Tampão para reação de seqüenciamento 5X	2	1X
Primer senso ou antisenso 5 µM	1	5pmol
Total	10*	-

\* Completar a reação com água mili-Q e com o material amplificado (3 a 5 µL) dependendo da quantidade.

Os di-deoxinucleotídeos excedentes dos produtos da reação de seqüenciamento foram removidos com a adição, em cada amostra de 40µL de isopropanol a 65% à temperatura ambiente, seguida de incubação por 15 minutos ao abrigo da luz e centrifugação durante 45 minutos a 4000RPM em temperatura ambiente (22-25°C), sendo o sobrenadante resultante descartado. Adicionou-se em cada amostra 80 µL de etanol a 60% (em temperatura ambiente), que foi centrifugada durante 15 minutos a 4000 RPM; esses dois últimos procedimentos foram repetidos; e em seguida, deixou-se o etanol secar por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas a 4°C por até 2 meses.

O DNA marcado durante a reação de sequenciamento foi ressuspendido em Formamida Hi-Di (*Applied Biosystem*) e incubado a 95°C por 10 minutos para estabilização da fita simples de DNA. As análises foram realizadas nos sequenciadores ABI 3730 da Plataforma PDTIS – FIOCRUZ e ABI 3130 do departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro, ambos da *Applied Biosystem*.

A edição e obtenção da sequência consenso a partir da comparação das fitas senso e anti-senso para cada espécime foi realizada com a utilização dos programas SeqMan Lasergene versão 7.0 (DNASar, Inc.) e MEGA versão 5.0 (Tamura et al, 2011).

A análise da distância genética foi realizada segundo Jukes- Cantor (Nei & Kumar, 2000) e a reconstrução filogenética pelo método *neighbor-joining* com a utilização do programa MEGA 5.0 (Tamura et al, 2011). A confiabilidade do clado foi estimada a partir de 1000 replicatas de bootstrap.

## 5. Resultados

### 5.1 Morfologia geral externa e morfometria

Foram capturados, em afloramentos rochosos, no período de 2005 a 2007 um total de 190 espécimes de triatomíneos, 122 no município de Paranã e 68 no município de Aurora do Tocantins.

Em Abril de 2011 foram capturados 1 espécime (ninha de 3º estágio) em Paranã e 28 espécimes em Aurora do Tocantins sendo 19 ninfas (1N1, 3N2, 6N3, 1N4, 8N5) e 5 adultos (4 machos e 1 fêmea) em ambiente silvestre e 4 ninfas de 5º estágio no peridomicílio.

Do total de 69 espécimes, 36 fêmeas e 28 machos capturados em Aurora do Tocantins todos foram classificados como *T. costalimai* segundo Verano & Galvão (1959) e utilizando-se a chave dicotômica de Lent & Wygodzinsky (1979).

Dos 122 espécimes capturados em Paranã, 9 apresentaram-se semelhantes a *T. costalimai* procedentes de Aurora do Tocantins, porém diferenciando-se quanto ao padrão de coloração do corpo, marrom mais claro, e do conexivo com manchas menores. Os 113 restantes (50 machos e 63 fêmeas) não puderam ser identificados em nível específico, agrupando-se em *Triatoma* sp. (figura 5.1) e apresentaram as seguintes características morfológicas externas:



Figura 5.1: Espécimes de *Triatoma* sp.: A – Fêmea, B – Macho.

**Comprimento total** Macho – 20,15mm Fêmea – 18,64mm

**Cabeça** (figura 5.2) - Marrom, alongada, ligeiramente rugosa, de comprimento cerca de quatro vezes maior que a largura (1:0,23), e maior que o pronoto (1:0,7) ou tão longa quanto o pronoto mais o escutelo sem o processo apical, revestida por pelos curtos, com 1+1 área glabra que se estende da base do tubérculo antenífero até os ocelos. Região ante-ocular cerca de quatro vezes mais longa que a pós-ocular (1:0,22). Clípeo estreito alargando-se gradualmente a partir da região mediana. Genas pontiagudas ultrapassando nitidamente o ápice do clípeo. Jugas angulares apicalmente. Olho em vista lateral atingindo o nível inferior da cabeça, porém distante da margem superior. Distância interocular duas vezes maior que a largura do olho em vista dorsal (1:0,5). Tubérculo antenífero inserido no meio da região anteocular. Primeiro segmento antenal marrom, atingindo a metade do clípeo, com raras cerdas dispostas em fileiras. Segundo segmento marrom, piloso com cerdas mais longas do que o diâmetro do segmento. Terceiro segmento com base escura e restante claro, e quarto segmento de tonalidade clara, ambos recobertos por cerdas curtas e cerdas longas e esparsas dispostas perpendicularmente ao segmento. Proporção dos segmentos antenais (1:4,5:2,7:2,4). Rostro de mesma tonalidade da cabeça atingindo o proesterno. Primeiro e segundo segmentos com cerdas curtas e esparsas, e terceiro segmento piloso, com cerdas finas e raras cerdas longas. Proporção dos segmentos antenais (1:3:1).

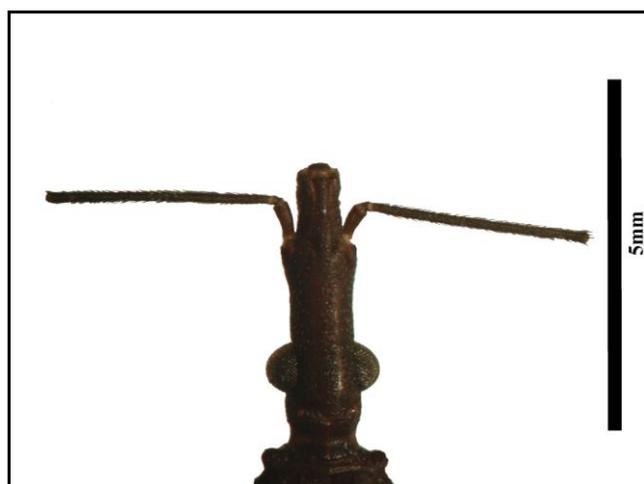


Figura 5.2: Cabeça de *Triatoma* sp. em vista dorsal.

**Pronoto** (figura 5.3) - Marrom, de aspecto rugoso, comprimento aproximadamente igual à largura. Lobo anterior com esboço de 1+1 tubérculos

discais, lobo posterior rugoso com carenas sub-medianas quase atingindo a margem posterior, ângulo humeral arredondado.

**Escutelo** (figura 5.3) - Inteiramente marrom, rugoso com uma depressão central em forma de V. Processo apical do escutelo cilíndrico, de comprimento igual ao do corpo do escutelo, com o ápice truncado e voltado para cima.



Figura 5.3: Pronoto e escutelo de *Triatoma* sp.

**Pernas** - De colorido geral marrom uniforme com pequenas cerdas em fileiras. Fêmur anterior e mediano com um par de dentículos ventrais subapicais. Fosseta esponjosa presente nos machos no primeiro par de pernas (figura 5.4).



Figura 5.4: Macho de *Triatoma* sp., detalhe da fosseta esponjosa no primeiro par de patas.

**Hemélitros** - Nos machos atingindo ou quase atingindo o bordo posterior do sétimo urotergito (figura 5.1). Nas fêmeas curtos atingindo o terço basal ou a metade do sétimo urotergito. Cório e clavo castanhos, veia subcostal com bordo claro. Cório com 2+2 manchas alaranjadas localizadas nas regiões basal e apical. Membrana cinza com veias negras.

**Abdômen** - Convexo ventralmente, polido, coberto por cerdas curtas, parecendo glabro. Espiráculos claros próximos a sutura conexival (figura 5.5). Uroesternito marrom. Conexivo predominantemente marrom com mancha clara subtriangular de largura variável, situado na região apical, próximo a sutura intersegmentar. Fêmeas com abdômen mais largo do que os machos (1:0,8) (figura 5.1).

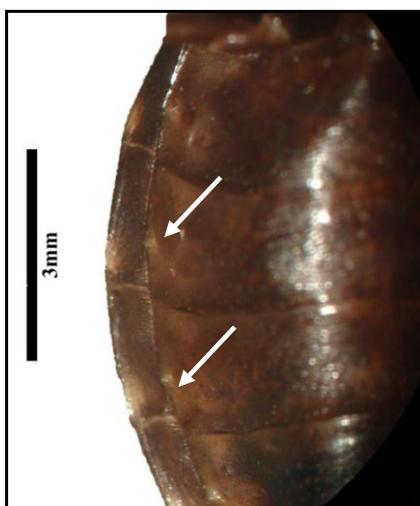


Figura 5.5: Abdômen *Triatoma* sp. em vista ventral de evidenciando os espiráculos.

As diferenças morfológicas entre *T. sp* e as espécies *T. costalimai* e *T. williami*, próximas segundo chave dicotômica de Lent & Wygodzinsky (1979), encontram-se resumidas no quadro 5.1.

As tabelas 5.1 e 5.2 apresentam as medidas das principais estruturas morfológicas utilizadas na taxonomia de fêmeas e machos de *Triatoma* sp. e *Triatoma costalimai* procedentes dos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins, respectivamente.

Quadro 5.1: Diferenças morfológicas entre *Triatoma* sp., *Triatoma costalimai* e *Triatoma williami*.

<b>Espécie</b>	<i>Triatoma</i> sp.	<i>Triatoma costalimai</i>	<i>Triatoma williami</i>
<b>Coloração geral</b>	Castanha	Negra	Castanho claro
<b>Conexivo</b>	Manchas amarelo claras acima das suturas intersegmentares	Manchas vermelho claras cortadas em bisel em triângulo de vértice anterior	Totalmente amarelo com pequena mancha preta na margem externa
<b>Suturas intersegmentares</b>	Castanhas	Pretas envolvidas por porção escura	Pretas envolvidas pela coloração amarelada do conexivo
<b>Asas</b>	Com mancha castanho clara, atingindo o início do 8º urotergito nos ♂ e a metade do 7º urotergito nas ♀.	Com mancha vermelha, atingindo mais da metade do 8º urotergito nos ♂ e cobrindo o 8º urotergito nas ♀.	Cório quase totalmente amarelado com nervuras salientes e negras, asa atingindo mais da metade do 8º urotergito.

Tabela 5.1: Medidas (em mm) de fêmeas de *Triatoma* sp. e *Triatoma costalimai* capturados nos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins – TO, respectivamente.

Espécies	<i>Triatoma</i> sp.					<i>Triatoma costalimai</i>				
	Variáveis	Mín.	Máx.	$\bar{X}$	S	S <sup>2</sup>	Mín.	Máx.	$\bar{X}$	S
Comprimento total	17,2	28,5	20,15	2,027	4,252	22,5	25,9	24,87	1,162	1,352
Largura do abdômen	6,3	9,4	8,15	0,698	0,504	8,4	10,7	9,55	0,879	0,772
Comprimento do pronoto	2,3	3,2	2,79	0,208	0,044	3,1	3,5	3,27	0,160	0,025
Largura do pronoto	2,3	3,1	2,62	0,260	0,069	2,6	3,2	2,95	0,207	0,042
Comprimento da cabeça	3,9	4,4	4,06	0,145	0,021	4,1	5,1	4,81	0,376	0,141
Largura da cabeça	0,8	1,0	0,90	0,047	0,002	1,0	1,1	1,08	0,037	0,001
Distância interocular	0,8	1,0	0,85	0,056	0,003	0,9	1,1	0,97	0,075	0,005
Largura do olho	0,4	0,5	0,40	0,017	0,000	0,5	0,5	0,50	0,000	0,000
Comprimento do 1º seg. rostral	0,8	1,1	0,94	0,080	0,006	1	1,2	1,07	0,075	0,005
Comprimento do 2º seg. rostral	2	3,0	2,54	0,223	0,051	3	3,3	3,14	0,127	0,016
Comprimento do 3º seg. rostral	0,8	1,0	0,92	0,071	0,005	1	1,2	1,08	0,089	0,008

Tabela 5.2: Medidas (em mm) de machos de *Triatoma* sp. e *Triatoma costalimai* capturados nos municípios de Paranã e Aurora do Tocantins – TO, respectivamente.

Espécies	<i>Triatoma</i> sp.					<i>Triatoma costalimai</i>				
	Variáveis	Mín.	Máx.	$\bar{X}$	S	S <sup>2</sup>	Mín.	Máx.	$\bar{X}$	S
Comprimento total	16,6	21,9	18,64	1,249	1,561	19,9	22,8	21,47	0,784	0,615
Largura do abdômen	6,0	7,9	6,94	0,486	0,236	5,6	8,4	6,99	0,834	0,696
Comprimento do pronoto	2,6	3,2	2,88	0,179	0,032	2,2	3,6	3,08	0,303	0,092
Largura do pronoto	2,2	3,0	2,55	0,188	0,035	2,5	3	2,77	0,176	0,031
Comprimento da cabeça	3,6	4,2	3,91	0,131	0,017	4,1	4,8	4,51	0,152	0,023
Largura da cabeça	0,7	0,9	0,84	0,056	0,003	0,9	1,0	0,96	0,047	0,002
Distância interocular	0,7	0,8	0,76	0,049	0,002	0,8	1,0	0,87	0,073	0,005
Largura do olho	0,4	0,5	0,40	0,017	0,000	0,4	0,5	0,47	0,043	0,002
Comprimento do 1º seg. rostral	0,5	1,0	0,90	0,116	0,013	0,8	1,2	1,00	0,090	0,008
Comprimento do 2º seg. rostral	2,0	2,9	2,45	0,214	0,046	2,7	3,2	2,94	0,124	0,016
Comprimento do 3º seg. rostral	0,7	1,0	0,88	0,077	0,005	0,6	1,0	0,98	0,099	0,010

Mín. – mínima; Max – máxima;  $\bar{X}$  – média; S – desvio padrão e S<sup>2</sup> – variância.

Vale ressaltar que um total de 9 espécimes (6 fêmeas e 3 machos) de *Triatoma* sp. assim como 8 de *T. costalimai* (3 fêmeas e 5 machos) apresentaram asas com nervura incompleta, deformada ou ausente conforme figuras 5.6, 5.7 e 5.8.



Figura 5.6: Asa esquerda de macho de *Triatoma* sp. com nervura mediana incompleta.



Figura 5.7: Asa direita de fêmea de *Triatoma* sp. com nervuras irregulares.



Figura 5.8: Asa direita de fêmea de *Triatoma costalimai* sem nervura mediana.

## 5.2 Morfologia da genitália externa de fêmeas

A genitália externa de fêmeas de *Triatoma* sp., em vista dorsal, apresenta o bordo posterior do VII tergito em forma de W, com 1 + 1 depressão lateral elevando-se na região mediana; o bordo posterior do VIII tergito é retilíneo decaindo lateralmente terminando na metade da sutura do conexivo de ápice arredondado; o IX tergito trapezoidal com paredes abauladas e recoberto por pelos grossos, curtos e esparsos terminando junto ao tubo anal (figura 5.9A). Os espécimes de *T. costalimai* apresentaram bordo posterior do VII tergito não retilíneo, terminando junto a sutura do conexivo; o bordo posterior do VIII tergito é convexo e termina na metade da sutura do conexivo de ápice pontiagudo; e o IX tergito é trapezoidal, com paredes laterais retas e 1+1 reentrância apical próxima ao tubo anal; revestido por pelos grossos e longos (figura 5.9B). Em *T. williami* o bordo posterior do VII tergito mostrou-se retilíneo na região mediana elevando-se nas margens laterais em direção a sutura do conexivo; o bordo posterior do VIII tergito é retilíneo terminando na linha mediana do conexivo; o IX tergito é trapezoidal, com paredes laterais abauladas, apresentando 1+1 depressão acentuada próxima ao tubo anal, revestido com pelos grossos e curtos (figura 5.9C).

Ventralmente a linha do bordo posterior do VIII esternito é proeminente na região mediana em *Triatoma* sp., e os gonocoxitos do 8º segmento são longos e largos (figura 5.10A). Nos exemplares de *T. costalimai* a linha do bordo posterior do VII esternito é convexa e os gonocoxitos do 8º segmento longos e estreitos (figura 5.10B). Em *T. williami* verificou-se que o bordo posterior do VII esternito apresenta o mesmo formato que em *Triatoma* sp. porém pouco proeminente e que os gonocoxitos do 8º segmento são triangulares e próximos a linha mediana do VII esternito (figura 5.10C).

Na região mediana da gonapófise 8 e na base do gonocoxito 8 de *Triatoma* sp. verificou-se a presença de espinhos curtos de ápice pontiagudo unifurcado, bifurcado ou trifurcado (figuras 5.11 e 5.12). Espinhos da mesma forma foram observados somente na região mediana da gonapófise 8 de *T. costalimai* (figuras 5.13 e 5.14). Em *T. williami* observou-se somente espinhos curtos de ápice pontiagudo unifurcado na região mediana da gonapófise 8 (figura 5.15).

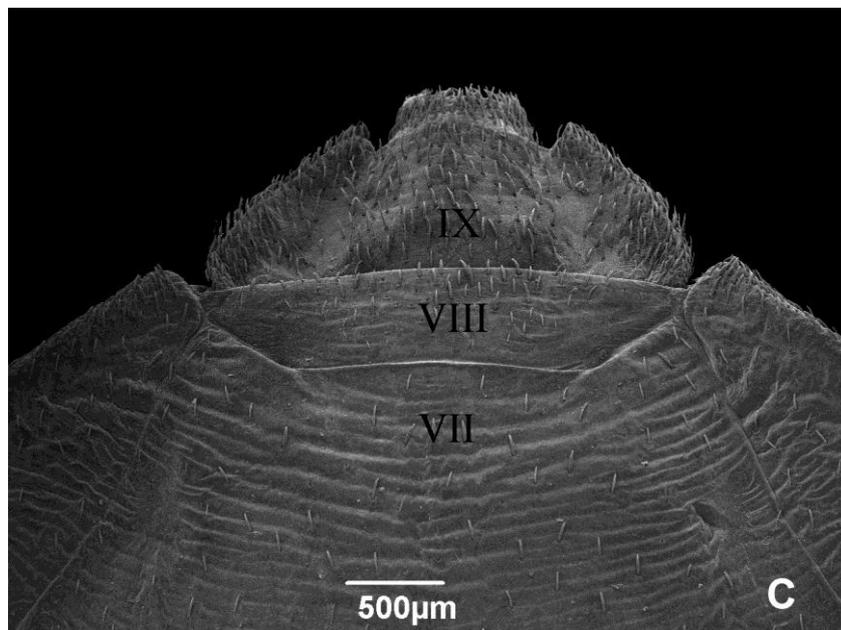
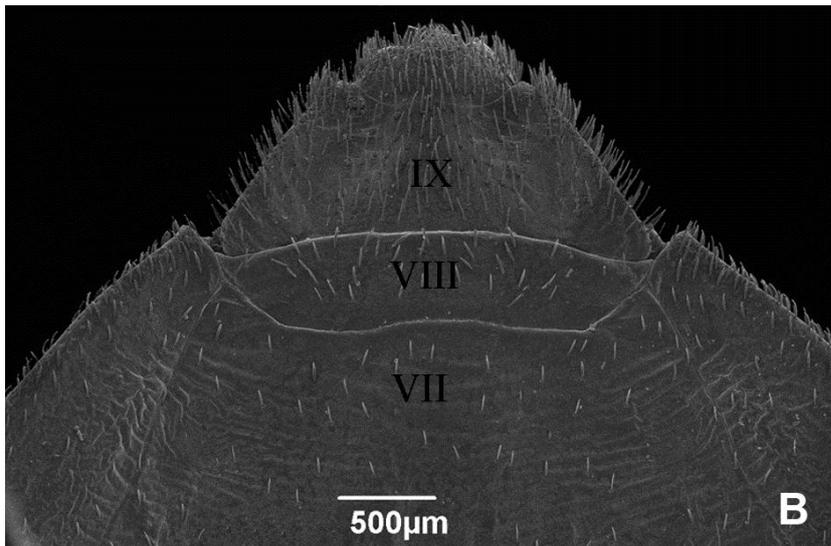
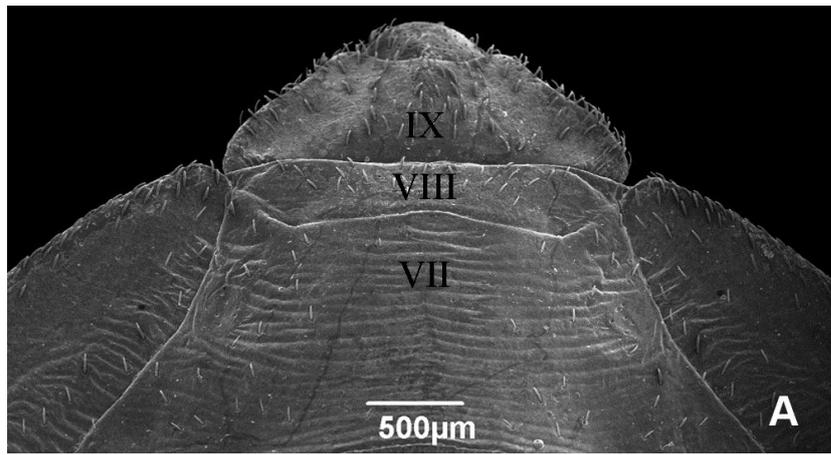


Figura 5.9: Eletromicrografia de urotergitos de fêmeas por microscopia eletrônica de varredura: A - *Triatoma* sp., B - *Triatoma costalimai* e C - *Triatoma williamsi*. VII - 7º urotergito, VIII - 8º urotergito, IX - 9º urotergito.

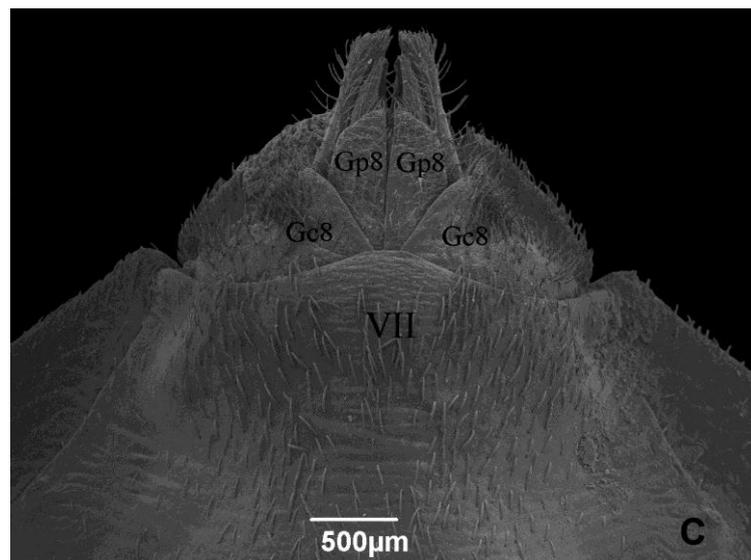
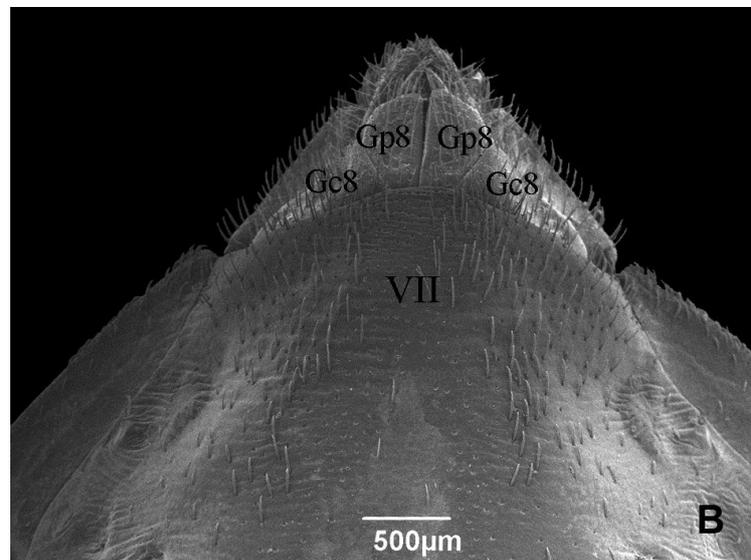
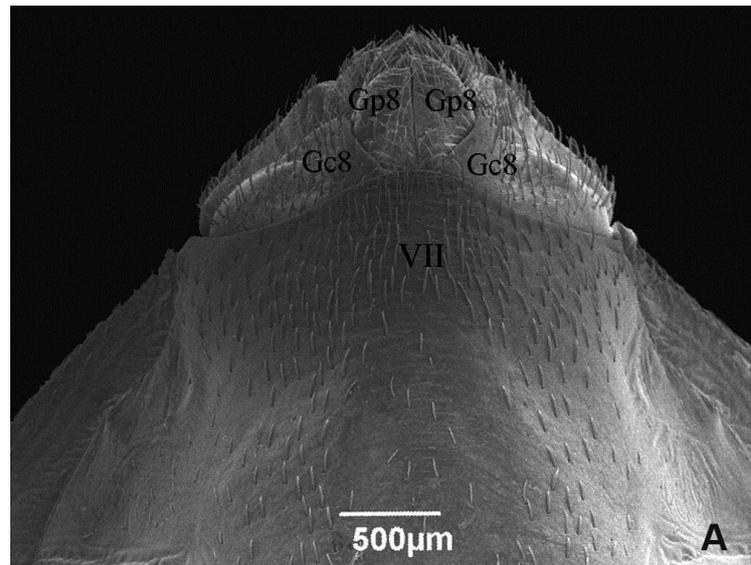


Figura 5.10: Eletromicrografia de uroesternitos de fêmeas por microscopia eletrônica de varredura: A - *Triatoma* sp., B - *Triatoma costalimai* e C - *Triatoma williamsi*. VII - 7º uroesternito, Gc - gonocoxito, Gp - gonapófise.

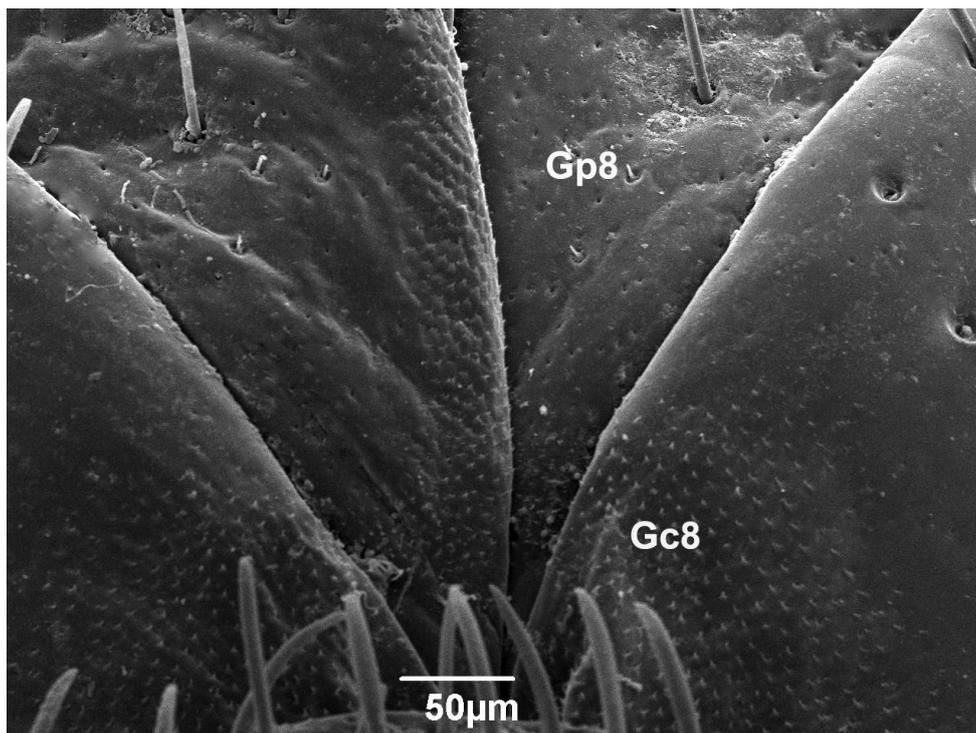


Figura 5.11: Espinhos no gonocoxito 8 (Gc8) e região mediana da gonapófise 8 (Gp8) de *Triatoma* sp.

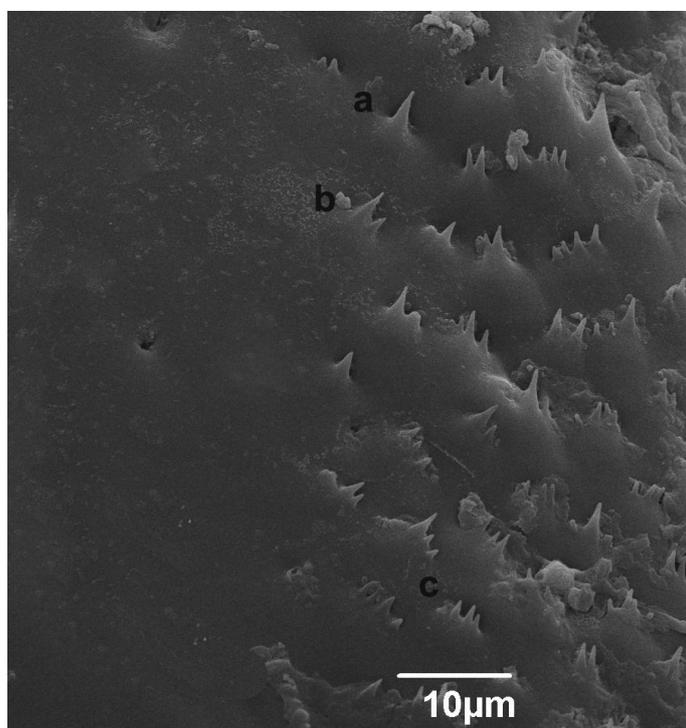


Figura 5.12: Detalhe dos espinhos unifurcado (a), bifurcado (b) e trifurcado (c) da região mediana da gonapófise 8 de *Triatoma* sp.

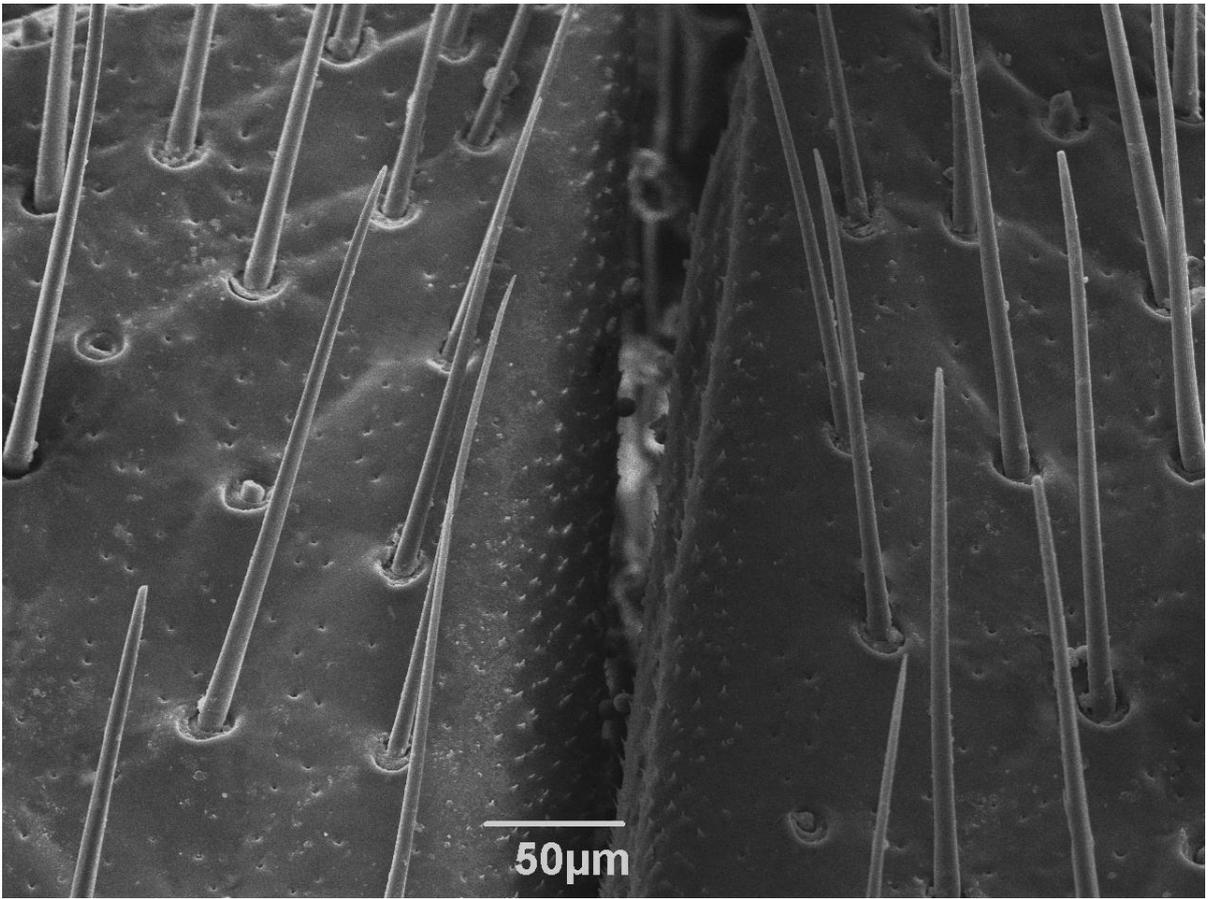


Figura 5.13: Região mediana da gonapófise 8 de *Triatoma costalimai*, mostrando cerdas e espinhos.

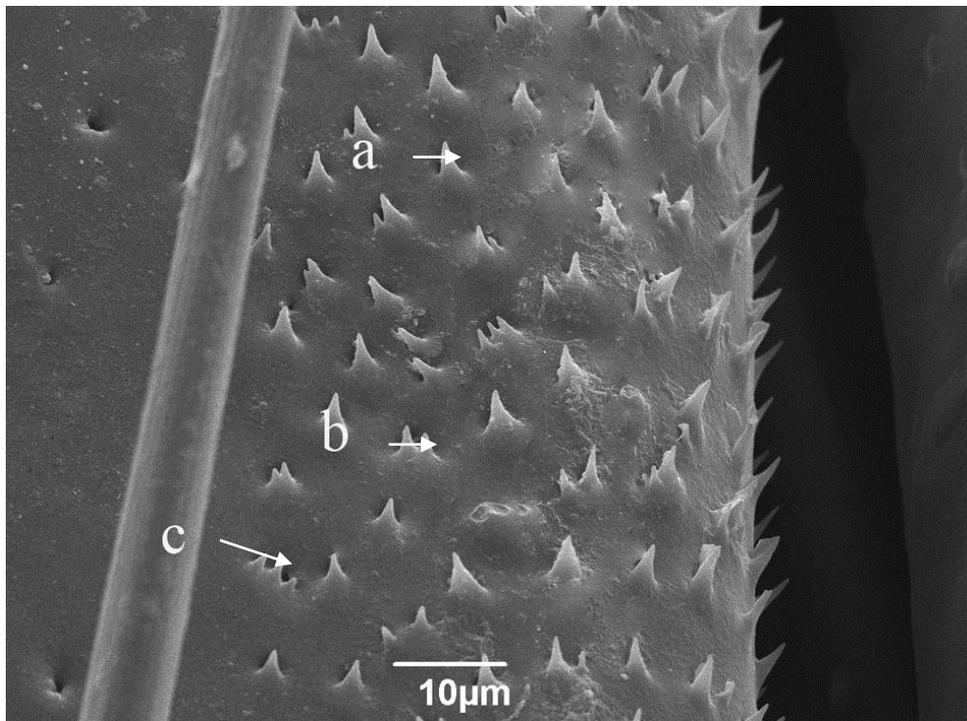


Figura 5.14: Detalhe dos espinhos unifurcado (a), bifurcado (b) e trifurcado (c) da região mediana da gonapófise 8 de *Triatoma costalimai*.

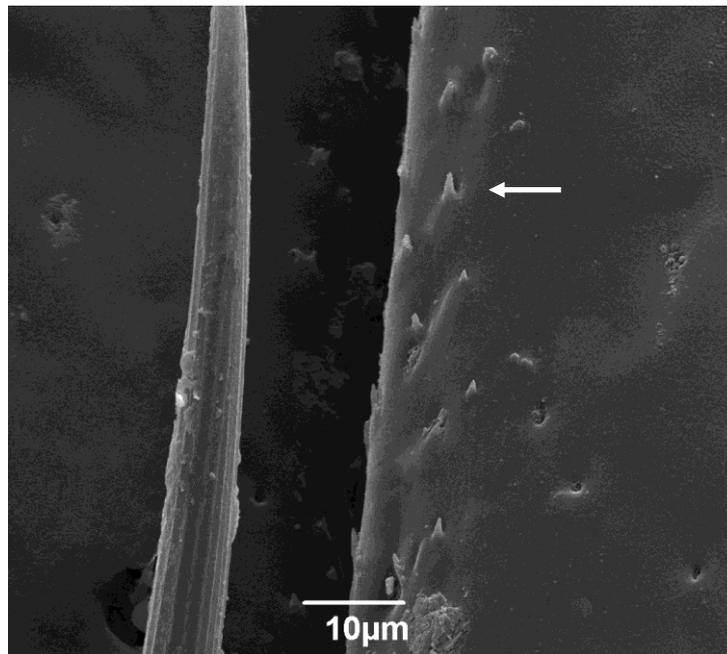


Figura 5.15: Detalhe dos espinhos unifurcados da região mediana da gonapófise 8 de *Triatoma williami*.

### 5.3 Morfometria geométrica das asas

Na análise da variação de tamanho das asas, o teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) entre *T. costalimai*, *T. williami*, *T. sp.* e *T. sordida* sendo marcadamente menores as asas de *Triatoma sp.* (figura 5.16).

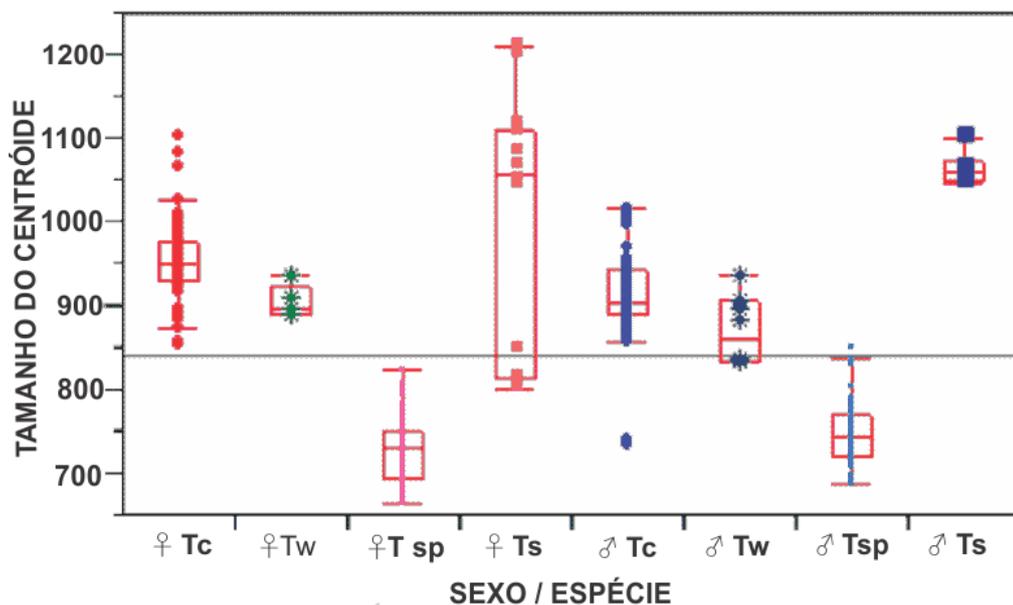


Figura 5.16: Médias de tamanho do centróide de machos e fêmeas de *Triatoma costalimai* (Tc), *Triatoma williami* (Tw), *Triatoma sp.* (T sp) e *Triatoma sordida* (Ts).

As asas das fêmeas de *T. costalimai* e *T. williami* são significativamente maiores que os machos, porém as de fêmeas de *Triatoma* sp. são significativamente menores que os machos da sua espécie ( $p < 0,001$ ) (figuras 5.17, 5.18 e 5.19).

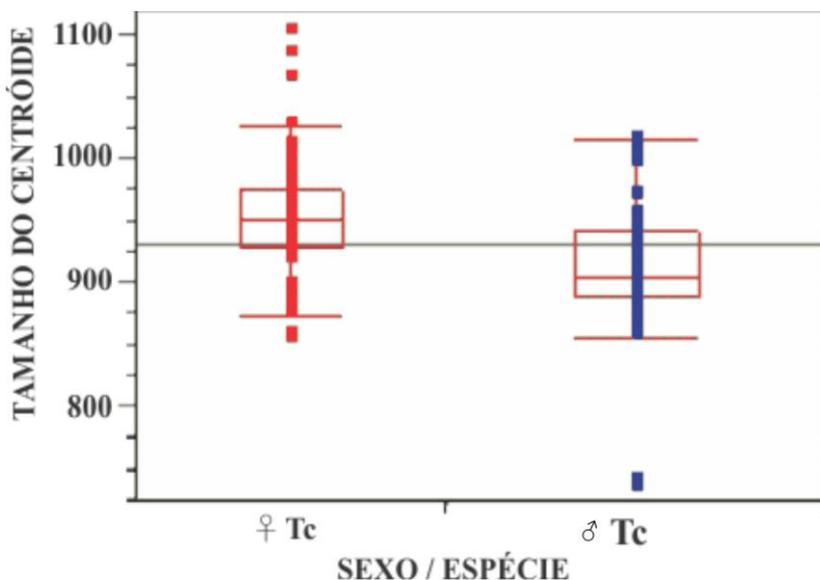


Figura 5.17: Média de tamanho do centróide de fêmeas e machos de *Triatoma costalimai*.

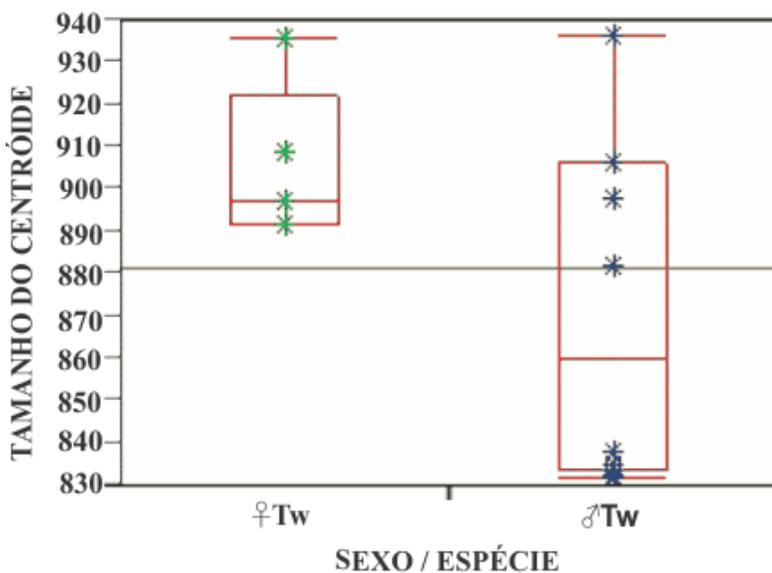


Figura 5.18: Média de tamanho do centróide de fêmeas e machos de *Triatoma williami*.

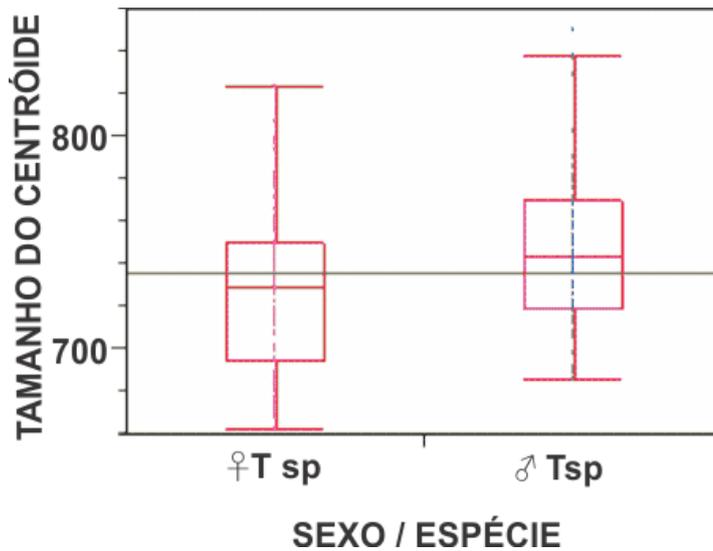


Figura 5.19: Média de tamanho do centróide de fêmeas e machos de *Triatoma* sp.

Para *T. sordida* não foram observadas diferenças significativas do tamanho das asas entre os sexos (figura 5.20).

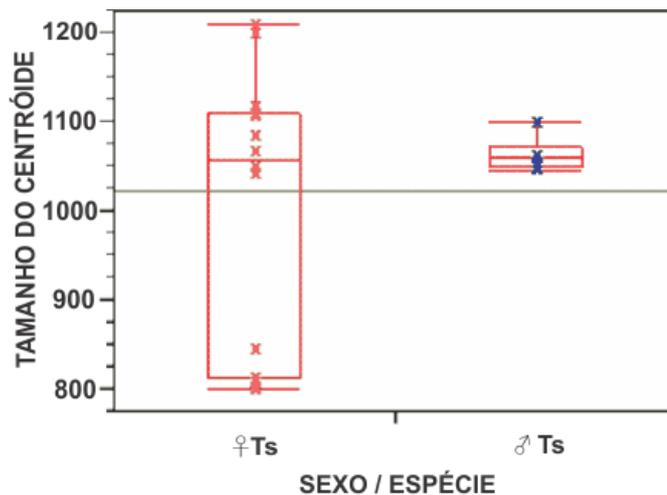


Figura 5.20: Média de tamanho do centróide de fêmeas e machos de *Triatoma sordida*.

O mapa fatorial elaborado a partir de uma análise canônica, mostrou uma discreta separação entre *Triatoma* sp. e *T. costalimai*. Entretanto, entre *T. williami* e *T. sordida* foi observado um solapamento, e ocorreu a separação destas duas espécies de *Triatoma* sp. e *T. costalimai* ( figuras 5.21 e 5.22).

Os níveis de reclassificação dos indivíduos de *Triatoma* sp. e *T. costalimai* foram considerados moderados (48- 64%); para *T. williami* foram aceitáveis (70 e

80%), baixos para as fêmeas de *T. sordida* (35%) e altos para os machos (82%). A contribuição dos fatores canônicos resultou de 59%, 30% e 6% para os três primeiros fatores. O teste de permutação corrigido por Bonferroni mostrou que *Triatoma* sp. é significativamente diferente das outras espécies ( $P < 0,001$ ), porém a análise discriminante mostra um solapamento entre *Triatoma* sp. e *T. costalimai*.

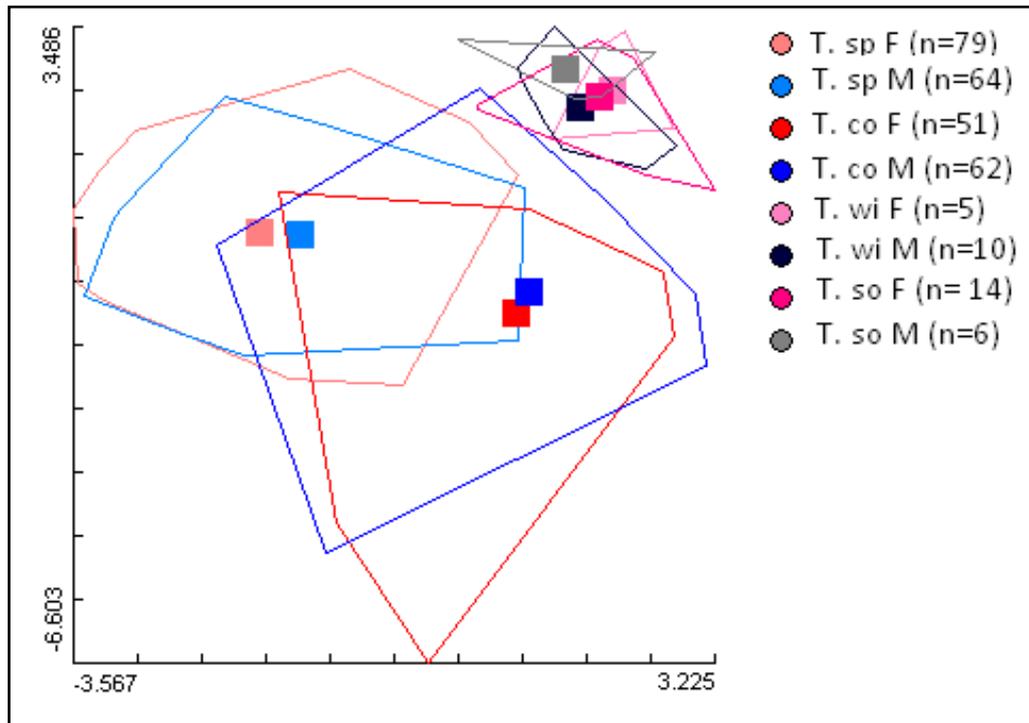


Figura 5.21: Mapa fatorial mostrando uma discreta separação entre *Triatoma* sp. e *Triatoma costalimai* e um solapamento entre *Triatoma williami* e *Triatoma sordida*.

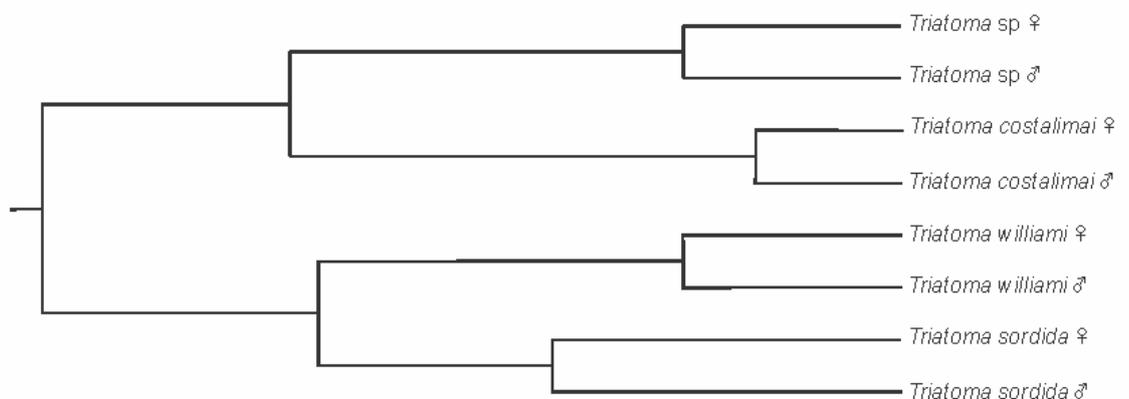


Figura 5.22: Árvore UPGMA a partir das distâncias de Mahalanobis mostrando a separação de *Triatoma* sp. e *Triatoma costalimai* em diferentes clados irmãos porém separados de *Triatoma williami* e *Triatoma sordida* também agrupados em clados irmãos.

#### 5.4 Filogenia molecular

As distâncias genéticas foram calculadas entre os espécimes da mesma espécie e entre as espécies. As distâncias intraespecíficas obtidas são menores que as interespecíficas (tabelas 5.1 e 5.2).

Tabela 5.3: Distância genética de Jukes Cantor dentro dos grupos

Espécie	Distância genética
<i>Triatoma</i> sp.	0
<i>Triatoma costalimai</i>	0,01
<i>Triatoma williami</i>	0,0008
<i>Triatoma sordida</i>	0,0136

Tabela 5.4: Distância genética entre os grupos

	Distâncias		
<i>Triatoma</i> sp.			
<i>Triatoma costalimai</i>	0,024		
<i>Triatoma williami</i>	0,051	0,034	
<i>Triatoma sordida</i>	0,054	0,044	0,044

Na filogenia obtida observou-se o seguinte relacionamento entre as espécies: [(*T. costalimai* + *Triatoma* sp.) + (*T. williami* + *T. sordida*)]. Os espécimes de *Triatoma* sp., portanto, formaram um grupo distinto de *T. costalimai* e a espécie *T. sordida* formou grupo irmão de *T. williami*. Um espécime capturado no município de Paranã (TC20), inicialmente classificado, pela morfologia como *T. costalimai*, que apresentou características morfológicas compartilhadas com o novo morfotipo, agrupou-se com *Triatoma* sp. (figura 5.23).

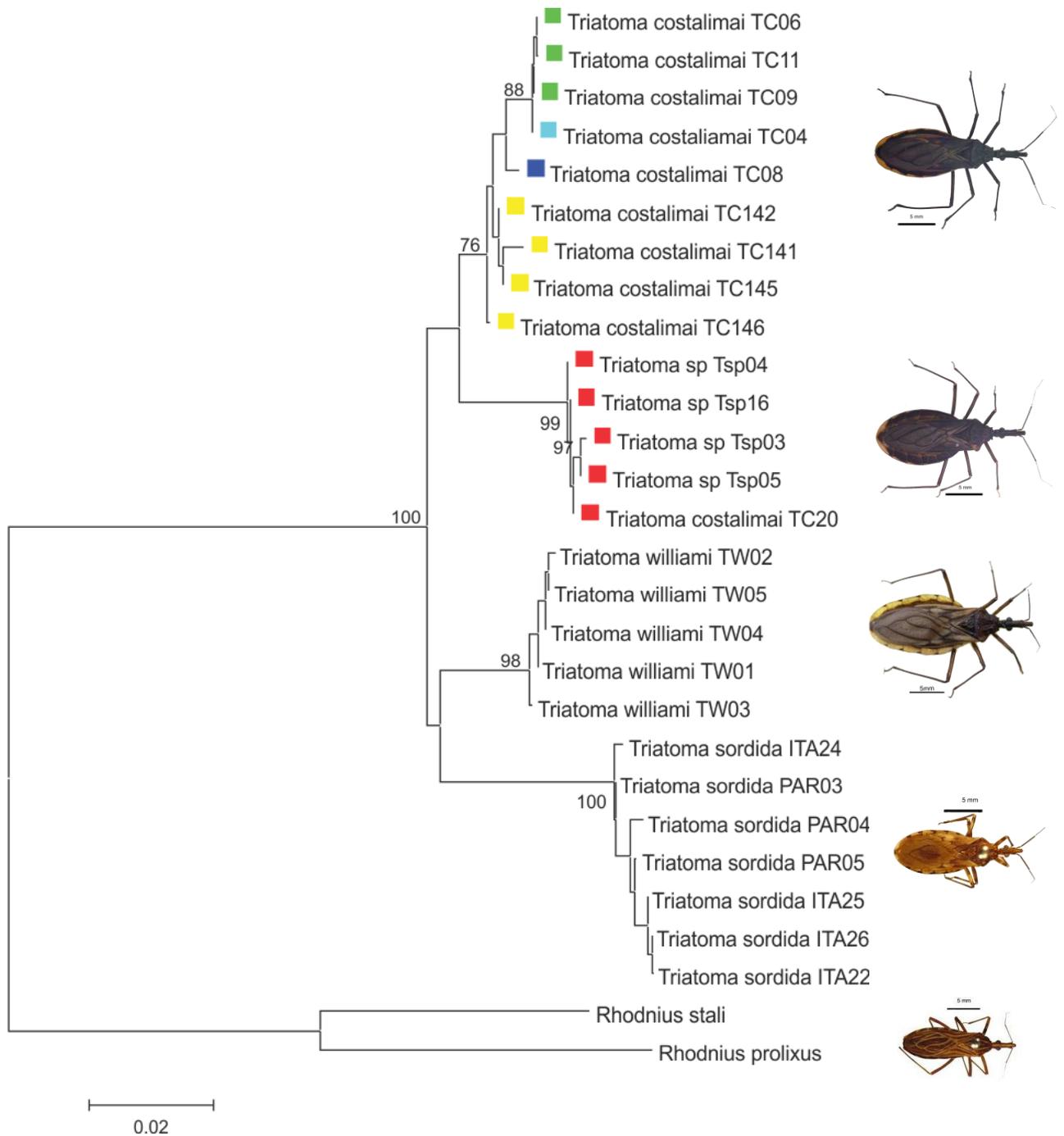


Figura 5.23: Árvore filogenética constituída a partir de seqüências 16S (neighbor – joining, distância Jukes – Cantor e 1000 replicatas de bootstrap) mostrando o relacionamento genético dos espécimes de *Triatoma* sp. e *Triatoma costalimai* e dos espécimes de *Triatoma williami* e *Triatoma sordida*. Um espécime de *T. costalimai* de Paranã agrupou-se com *Triatoma* sp. As diferentes cores indicam as localidades de captura dos espécimes de *T. costalimai*: Verde – Aurora do Tocantins – TO; Ciano – Lavandeira – TO; Azul – Taguatinga – TO; Amarelo – São Desidério – BA; Vermelho – Paranã – TO. As siglas ITA e PAR são referentes as localidades de origem dos espécimes de *T. sordida*: ITA – Itaobim – MG, Par – Paranaíba – MS.

## 6. Discussão

*Triatoma* sp., apesar de compartilhar com *T. costalimai* características morfológicas como a relação entre o tamanho da cabeça e pronoto, tamanho do terceiro segmento rostral, local de inserção do tubérculo antenífero, tamanho do primeiro segmento antenal e coloração escura das pernas (Verano & Galvão, 1958), diferenciou-se quanto ao comprimento total, apresentando-se menores, tanto para machos quanto fêmeas, padrão de coloração assim como o desenho e coloração do conexivo e suturas intersegmentares impedindo sua inclusão neste grupo taxonômico específico.

A segunda espécie de morfologia semelhante à *Triatoma* sp. segundo Lent & Wygodzinsky (1979) seria *T. williami*. Porém, esta espécie apresenta o cório dos hemélitros quase totalmente amarelado, excetuando o relevo das nervuras que são pretas, conexivo também quase totalmente amarelo, exceto pela mancha lateral externa preta sobre as suturas intersegmentares e hemélitros atingindo mais da metade do 8º urotergito, o que não permite a inclusão dos espécimes de *T. sp* nesta espécie.

No município de Paranã, em pontos de coleta com ausência de barreira geográfica, separados somente por uma rodovia, triatomíneos identificados inicialmente como *T. costalimai*, apresentaram diferenças desta espécie quanto ao tamanho corporal, apresentando-se menores, padrão de coloração do corpo marrom mais claro e do conexivo com manchas menores, o que gerou dúvidas quanto a identificação taxonômica. Estes espécimes não foram utilizados nas análises morfométricas, contudo a análise filogenética possibilitou a identificação como *Triatoma* sp.

Questionou-se, portanto, se as diferenças morfológicas observadas neste estudo poderiam ou não constituir fenótipos de especiação e se, somente por estudos morfológicos, seria possível afirmar que essas populações são isoladas reprodutivamente ou que estas características estariam contribuindo para o estabelecimento de barreiras genéticas entre elas.

No entanto, a variação cromática observada entre *Triatoma* sp. e *T. costalimai* capturados em ambiente silvestre permaneceram constantes na criação mantida em

laboratório até a segunda geração, na qual se encontra, o que pode sugerir que estas características são devidas a composição gênica.

A utilização de abordagem com base em modelos de nichos ecológicos permitiria avaliar a relação entre as variações ecológicas e o possível processo de especiação conforme verificado por Costa et al (2002) para quatro variações cromáticas de *T. brasiliensis*.

Noireau et al (1997) descreveram um morfotipo de coloração mais escura de *T. infestans*, encontrado em ocos de árvores associado a roedores silvestres no Chaco Boliviano, cujo padrão cromático era intermediário entre *T. infestans* e *T. melanosoma* e que, apesar de se separar destas duas espécies, morfologicamente, não apresentava diferenças isoenzimáticas ou isolamento reprodutivo, o que confirma a importância da utilização de uma caracterização baseada em diferentes métodos, e não somente na morfologia para definição de uma espécie. Segundo Dujardin et al (1999b) a morfologia por si só não pode ser utilizada para a definição de espécie devido a plasticidade fenotípica diante de diferentes fatores associados às modificações ambientais e segundo Githeko et al (2009), alterações climáticas.

Costa (1997) diante de populações de *Triatoma brasiliensis*, de quatro padrões cromáticos distintos, realizou estudos multidisciplinares com análises morfológicas, biológicas e bioquímicas para definição destas populações.

Diante deste quadro, optou-se pela utilização de uma abordagem multidisciplinar, cuja importância para definição de espécies de triatomíneos foi apresentada por Jurberg (2003), com maior detalhamento morfológico e morfométrico, bem como com o estudo da filogenia, com o objetivo de ajudar a elucidar a questão: *T. sp* constitui uma nova espécie ou é uma população de *T. costalima*?

O estudo da morfologia da genitália externa de fêmeas em triatomíneos, desconsiderado desde a década de 60, foi retomado por Rosa et al (2010) que, com a utilização da técnica de microscopia eletrônica de varredura, verificou diferenças taxonômicas relevantes na genitália das fêmeas as quais permitiram a diferenciação das espécies dos gênero *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* assim como a identificação taxonômica de 12 espécies de *Rhodnius*, cuja identificação pela morfologia geral externa gerava dúvidas (Neiva & Pinto, 1923; Rosa et al, 2011).

Neste trabalho, a utilização desta mesma metodologia também possibilitou a separação entre o novo morfotipo e as espécies *T. costalimai* e *T. williami*. Foram visualizadas diferenças em vista dorsal com relação ao bordo posterior do VII e VIII urotergitos assim como o formato e padrão das cerdas do IX urotergito. Ventralmente observaram-se diferenças com relação a linha do bordo do VIII uroesternito e formato do gonocoxito 8 sendo que, neste caso, *T. sp* apresentou formato do bordo posterior do VII uroesternito semelhante ao de *T. williami* porém não tão proeminente, o que poderia ser mais uma característica morfológica que aproxima os dois grupos. Nos três grupos estudados, foi descrita a presença de espinhos pontiagudos unifurcados, bifurcados e trifurcados na região mediana da gonapófise 8 e, somente em *Triatoma sp.*, na base do gonocoxito 8. Estruturas semelhantes foram observadas por Pereira-Lourenço et al (2011) no estudo de morfologia da genitália interna de *Rhodnius neglectus*, pela microscopia eletrônica de varredura, no qual verificou-se a presença destes espinhos na bolsa copulatória, possivelmente para a compressão do espermatóforo e liberação dos espermatozoides.

Desta forma, utilizando a MEV como ferramenta foi possível diferenciar as espécies colocando *Triatoma sp.* como uma nova espécie. Entretanto, apesar dos resultados obtidos optou-se pela utilização de mais uma metodologia visando esta confirmação.

A morfometria geométrica que segundo Dujardin et al. (2010) permite observar mudanças de conformação indetectáveis pelos métodos morfológicos tradicionais, tem sido utilizada na identificação de espécies crípticas, como é o caso deste estudo. A utilização desta técnica em estudos taxonômicos permitiu a classificação da espécie *T. melanosoma* como sinônima de *T. infestans* (Gumiel et al, 2003); a diferenciação entre espécimes de *T. arthurneivai* e *T. wygodzinkyi* bem como a correção na identificação de populações de *T. arthurneivai* de São Paulo para *T. wygodzinkyi* (Carbajal de La Fuente et al, 2011); e a separação de dois grupos distintos das espécies *M. gajardoi* e *M. spinolai* bem como a descoberta de asas vestigiais em algumas áreas da parte norte do Chile o que pode indicar a existência de uma zona híbrida (Campos et al, 2011). Recentemente, Gurgel-Gonçalves et al (2011) em estudo da morfometria de asas e cabeça das espécies *T. sordida* e *T. garciabesi* também verificaram que a variação morfométrica e diferenciação de nichos ecológicos podem ser utilizados na delimitação de espécies

de triatomíneos fenotipicamente semelhantes. Também na taxonomia do gênero *Rhodnius*, de difícil classificação, a utilização desta técnica permitiu a identificação taxonômica específica de um espécime de *Rhodnius robustus* de Alto Beni – Bolívia por Matias et al (2001). Da mesma forma, a diferenciação entre *R. robustus* de Mérida – Venezuela e *R. prolixus* Codejes – Venezuela em unidades evolutivas distintas, apesar de morfologicamente e geneticamente muito semelhantes (Villegas et al, 2002). A variável tamanho, porém, segundo estudos de morfometria geométrica já realizados, é resultado da expressão gênica e biologia dos espécimes diante das condições ambientais como temperatura e condição nutricional, fartura ou não das fontes alimentares, enquanto que a variação de conformação é devida principalmente a componentes genéticos (Dujardin & Slice, 2007).

Diante dessas evidências de sucesso na utilização da morfometria geométrica na taxonomia, optou-se por utilizá-la para verificar se também entre *Triatoma* sp. e *T. costalimai* esta abordagem permitiria a separação taxonômica destas espécies.

O estudo da morfometria geométrica das asas mostrou diferenças significativas, tanto com relação ao tamanho como na conformação, entre *Triatoma* sp. e a espécie de morfologia próxima *T. costalimai*, assim como a separação destas de *T. williami* e *T. sordida*, esta última inicialmente escolhida como grupo externo por apresentar grande diferença morfológica e por ser proveniente de ecótopo diferente (peridomicílio).

A análise do tamanho das asas também permitiu observar o dimorfismo sexual nas espécies de estudo, porém, vale ressaltar diferentemente do que é observado para a maioria dos triatomíneos, as fêmeas *Triatoma* sp. apresentaram asas menores que os machos e, para a espécie *T. sordida* não foi possível verificar diferenças significativas entre o tamanho das asas de machos e fêmeas. Esta plasticidade fenotípica observada entre estes grupos (machos e fêmeas) bem como entre as espécies pode ser resultado da diferença de atividade biológica entre os sexos ou entre as espécies, provenientes de localidades distintas e, conseqüentemente, expostas a diferentes fatores ambientais.

Corroborando estes resultados está o parâmetro morfologia da asa do complexo matogrossensis, constituído pelas espécies: *T. baratai*, *T. costalimai*, *T. deaneorum*, *T. guazu*, *T. jurbergi*, *T. matogrossensis*, *T. vandae* e *T. williami* (Schofield & Galvão, 2009). De um modo geral todas apresentam o hemélitro

atingindo a margem do 7º ou 8º urotergito, diferente de *Triatoma* sp., cujas fêmeas apresentam o primeiro par de asas atingindo a metade do 7º urotergito, deixando as laterais do abdômen totalmente descobertos.

A variável conformação da asa permitiu observar a separação entre *Triatoma* sp. e *T. costalimai* e o solapamento entre *T. williami* e *T. sordida*, que se separam dos dois anteriores. Desta forma, a árvore UPGMA construída a partir das distâncias de Mahalanobis, mostrou que *Triatoma* sp. e *T. costalimai* se agruparam em clados diferentes, sendo este resultado mais uma indicação de que trata-se realmente de uma nova espécie, mostrando mais uma vez a importância desta técnica no esclarecimento de divergências taxonômicas.

Nos últimos anos, a utilização da taxonomia molecular como forma de contribuir para a definição de status taxonômicos, tem sido amplamente utilizada.

Desta forma, as análises de distância genética e filogenia de um fragmento de gene de DNA mitocondrial 16S corroboraram os resultados visualizados pela morfologia e morfometria geométrica, ou seja, a separação em diferentes clados, de *Triatoma* sp. de *T. costalimai*, assim como a relação entre as espécies *T. williami* e *T. sordida*, confirmando assim tratar-se de uma nova espécie.

Estudos de morfometria geométrica e filogenia que auxiliaram na taxonomia foram realizados para outras espécies de triatomíneos como *T. melanosoma* e as espécies do complexo *T. brasiliensis* assim como para espécies de dípteros *Mansonia dives* e *Mansonia bonneae* (Dujardin & Slice, 2007; Costa et al, 2009).

As variações morfológicas observadas em *Triatoma* sp. em relação a espécie próxima *T. costalimai*, podem representar fenótipos de especiação que de alguma forma já estão permitindo a separação genética, provavelmente recente, entre estes grupos, ainda a ser comprovada em termos biológicos.

As alterações morfológicas das venações observadas em 09 espécimes de *T.sp* e em 08 de *T.costalimai* também podem ser interpretadas como efeitos do processo de especiação, uma vez que segundo Klingenberg (2010) a variação da forma está diretamente relacionada as mudanças genéticas no processo de desenvolvimento de estruturas morfológicas.

Ainda que o isolamento reprodutivo, base do conceito biológico de espécie, não tenha sido testado, a apresentação deste novo morfotipo como nova espécie

pode ser realizada com base nos conceitos morfológicos e filogenético, bem como pela hipótese de que o isolamento reprodutivo seria a perda da capacidade reprodutiva, ou seja, consequência da especiação e não causa (Paterson 1985; Harrison, 1998; Shaw, 2001, Via & West, 2008; Mallet, 2010; Shaw & Mullen, 2011).

Em setembro de 2011, período de seca, três espécimes de *Triatoma* sp. (2 fêmeas e 1 macho) foram coletados no domicílio, cerca de 200m do ambiente silvestre, no município de Paranã. Este período se caracteriza pela escassez de recursos tróficos e alta temperatura, fatores que favorecem a atividade de vôo possibilitando o efeito da atração luminosa conforme observado por Carbajal de La Fuente et al. (2008) para as espécies também do cerrado *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*.

Este achado torna-se importante, uma vez que os impactos ambientais gerados pela instalação da hidrelétrica e construção de assentamentos para remanejamento das famílias das áreas inundadas, tendem a desestabilizar os ecótopos naturais. Paralelamente, os anexos construídos pelo homem, na nova moradia, para a manutenção de animais domésticos, podem vir a fornecer um ambiente estável para *Triatoma* sp. possibilitando num futuro a invasão domiciliar, conforme observado por Forattini et al. (1971) para *T. sordida*.

Essa capacidade de dispersão dos triatomíneos para o ambiente peridoméstico e doméstico também pode estar associada a fatores atrativos como luz e cheiro de hospedeiros (Barbu et al, 2010).

Além deste fato, a presença de atividade pecuária assim como de anexos para criação de animais no peridomicílio permitem levantar a hipótese de dispersão passiva de *Triatoma* sp. por meio de animais que se aproximam dos afloramentos rochosos e voltam para os currais no peridomicílio conforme já relatado para a espécie rupícola *T. juazeirensis* por Carbajal de La Fuente et al (2008) que verificaram a capacidade de adaptação desta espécie a madeiras do peridomicílio.

No entanto, a comprovação destas hipóteses relativas a capacidade de dispersão e adaptação ao ambiente artificial carecem de estudos, embora pareça estar associada à plasticidade comportamental de *Triatoma* sp. Da mesma forma, poderia se verificar a capacidade de colonização, ou infestação a longo prazo, destes insetos nas casas, ambiente artificial, após o gasto energético da dispersão, principalmente no caso das fêmeas que apresentam asas curtas. Segundo Barbu et

al (2010) esse gasto de energia poderia limitar atividades para a sobrevivência destes insetos como alimentação e oviposição.

Abordagem similar também seria de grande valia para a vigilância entomológica da espécie *T. costalimai*, capturada no município de Aurora do Tocantins, onde observa-se a presença dos afloramentos rochosos na zona rural bem como no entorno da cidade, próximo as casas.

Além disso, o município de Aurora do Tocantins possui grutas e áreas de alto potencial para o turismo de aventura, com paredões e pequenos abismos para a prática de esportes verticais, como o abismo da Umburaninha, os paredões de pedra da fazenda do Sr Vitorino e da região do Freitas, assim como as grutas da região do morro da pedra e das Guarirobas, e a gruta do Sabiá, que se localiza próximo a cidade no entorno dos pontos de coleta de *T. costalimai* explorados neste trabalho (Pedro et al, 2007).

Sob o ponto de vista epidemiológico é sabido que os fatores como a sazonalidade, situação sócio-econômica, programas de controle e alterações ambientais favorecem a ocorrência da enfermidade o que pode ser influenciado também pela variabilidade climática (Githeko et al 2009). Ao contrário de Aurora do Tocantins, onde *T. costalimai* passou a colonizar o peridomicílio e invadir o domicílio, em Paranã, apesar da proximidade da usina, esta espécie mantém-se no ambiente silvestre. Entretanto, *Triatoma* sp., embora com notificação recente no domicílio alerta para a necessidade de uma vigilância além de uma correta identificação taxonômica.

E, uma vez que seja descrita a nova espécie em questão, uma atualização das chaves dicotômicas do gênero *Triatoma*, assim como do subcomplexo matogrossensis, no qual *Triatoma* sp. deve ser inserido, se faz necessária para a correta identificação taxonômica destes insetos tanto nas pesquisas quanto nas ações de vigilância entomológica.

## 7. Conclusões

- A morfologia clássica não foi robusta o suficiente para sustentar a hipótese da existência do clado representado pelo espécime *Triatoma* sp.
- O estudo da morfologia da genitália externa das fêmeas por MEV permitiu a separação de *Triatoma* sp e as espécies próximas *T costalimai* e *T williami*, evidenciando a importância de não negligenciar estes caracteres na diagnose das espécies.
- A variação da conformação das estruturas alares, analisada através da morfometria geométrica das asas comprova e sustenta a hipótese de um novo clado.
- Os estudos realizados com base no DNAmT evidenciaram cladogramas diferentes com distâncias genéticas compatíveis a hipótese de uma nova espécie.
- A abordagem multidisciplinar na caracterização taxonômica dos espécimes avaliados foi imprescindível para inferir o *status* específico destes triatomíneos.
- Segundo os conceitos morfológico e filogenético de espécie, os espécimes de *Triatoma* sp pertencem a um novo grupo taxonômico específico que deve ser descrito conforme as normas da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica.

## 8. Perspectivas

- ✓ Finalizar a descrição da morfologia da genitália do macho de *Triatoma* sp.;
- ✓ Descrever a morfologia de ovos e ninfas de *Triatoma* sp.;
- ✓ Estudar o fenótipo antenal de *Triatoma* sp. e *T. costalimai*;
- ✓ Realizar experimentos de cruzamentos entre *Triatoma* sp. e *T. costalimai*;
- ✓ Estudar a biologia destes insetos e avaliar a competência vetorial;
- ✓ Dar suporte para a identificação de *Triatoma* sp. tendo em vista a notificação recente de 3 espécimes no domicílio.

## 9. Referências bibliográficas

Abad-Franch F, Monteiro FA. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc* 2005; 77: 437-454.

Abad-Franch F, Monteiro FA, Patterson JS, Miles MA. Phylogenetic relationships among members of the Pacific *Rhodnius* lineage (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 2003; 2: 244–245.

Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(22): 4692-3.

Almeida CE, Marcet PL, Gumiel M, Takiya DM, Cardozo-de-Almeida M, Pacheco RS, Lopes CM, Dotson EM, Costa J. Phylogenetic and phenotypic relationships among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species collected in domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. *J Vector Ecol* 2009; 34(2): 164-73.

Almeida LM, Ribeiro–Costa CS, Marinoni L. Manual de coleta, conservação, montagem e identificação de insetos. Ribeirão Preto: Holos; 1998.

Avila-Pires FD. Ecology Of Small Mammals In Relation To Sylvan And Domestic Transmission Cycles. *Pan American Sanit Bureau* 1976; 317(318): 301-06.

Bahrndorff S, Holmstrup M, Petersen H, Loeschcke V. Geographic variation for climatic stress resistance traits in the springtail *Orchesella cincta*. *J Insect Physiol* 2006; 52: 951-959.

Barata JMS. Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs. In: Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1998. p. 409-514.

Barbu C, Dumonteil E, Gourbière S. Characterization of the dispersal of non-domiciliated *Triatoma dimidiata* through the selection of spatially explicit models. *Plos neglected tropical diseases* 2010; 4 (8): e777.

Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Mas-Coma S. Triatominae vectors of *Trypanosoma cruzi*: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 Suppl 1: 159-64.

Bargues MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. Nuclear rDNA based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(4): 567-73.

Barracough TG. Evolving entities: towards a unified framework for understanding diversity at the species and higher levels. *Phil Trans R Soc B* 2010; 365: 1801-13.

Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores naturais do *Trypanosoma cruzi*. Contribuição para o estudo dos focos naturais da Tripanosomose Americana, com especial referência à região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1967; 1: 23-35.

Barrett TV. Species infertility and crossing experiments in Triatomine systematics. In: Schofield CJ, Dujardin JP, Jurberg J. *Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador: INDRE, Mexico City; 1996. p. 72-77.

Bookstein FL. *Morphometric Tools for Landmark data: Geometry and Biology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.

Campos R, Botto-Mahan C, Coronado X, Jaramillo N, Panzera F, Solari A. Wing shape differentiation of *Mepraia* species (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol* 2011; 11(2): 329-33.

Caranha L, Gurgel-Gonçalves R, Ramalho RD, Galvão C. New records and geographic distribution map of *Triatoma petrocchiae* Pinto & Barreto, 1925 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Check List: Journal of species lists and distribution* 2011; 7(4): 508-509.

Carbajal de La Fuente AL. Eco-genética comparativa das espécies afins *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 e *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951 (Hemiptera: Triatominae) [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2007.

Carbajal de La Fuente AL, Dias-Lima A, Lopes CM, Emperaire L, Walter A, Ferreira A, et al. *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma juazeirensis* (Hemiptera: Reduviidae): behavioural plasticity related to habitat selection in different environments. J Med Entomol 2008; 45: 14-19

Carbajal de La Fuente AL, Jaramillo N, Barata JMS, François N, Diotaiuti L. Misidentification of the two Brazilian triatomines, *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi*, revealed by geometric morphometrics. Med and Vet Entomol (Print) 2011; 25: 178-183.

Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H. Phylogeny of the Triatominae. In: Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1999. p. 925-69.

Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvão C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. Entomol Vectors 2000; 7 Suppl 1: 1-99.

Catalá S. Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a comparative study over five genera. Int J Insect Morphol Embryol 1997; 26(2): 67-73.

Chagas C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; 1: 159-218.

Chagas C. Sobre um *Trypanosoma* do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculata* Latr (1811). Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. Nota prévia. Braz Med 1912; 26: 305-06.

Costa J. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera – Reduviidae – Triatominae): Estudos morfológicos, biológicos e isoenzimáticos sobre diferentes padrões cromáticos. [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 1997.

Costa J, Barth OM, Marchon-Silva V, Almeida CE, Freitas-Sibajev MGR, Panzera F. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) genital structures and eggs of different chromatic forms. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92(4): 493-98.

Costa J, Monteiro F, Beard CB. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 the most important Chagas disease vector in Brazil - Phylogenetic and population analyzes correlated to epidemiologic importance. Am J Trop Med Hygiene 2001; 65: 280.

Costa J, Lorenzo M. Biology , diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines – Chagas disease vectors. Mem Ins Oswaldo Cruz 2009; 04 Suppl. I: 46-51.

Costa J, Peterson AT, Beard CB. Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas disease vectors in Northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Am J Trop Med Hyg 2002; 67 (5): 516-520.

Costa J, Peterson AT, Dujardin JP. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). Infect Gent Evol 2009; 9: 263-270.

Coura JR. Determinantes epidemiológicos da doença de Chagas no Brasil: a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83 Suppl 1: 392-402.

Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 Suppl I: 113-122.

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature 2010; 465: 6-7.

Dias JCP. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Rev Soc Bras Med Trop 2006a; 39 (4): 370-375.

Dias JCP. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. Rev Bras Hematol Hemoter 2006b; 28(2): 81-87.

Dias JCP. Southern cone initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation and perspectives. Mem Int Oswaldo Cruz 2007; 102 Suppl I: 11-18.

Dias JCP, Neto VA. Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44 Suppl 2: 68-72.

Dujardin JP. Morphometrics applied to medical entomology. Infection, genetics and evolution 2008; 8: 875-890.

Dujardin JP, Costa J, Bustamante D, Jaramillo N, Catalá S. Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. Acta Tropica 2009; 110 (2-3): 101 – 111.

Dujardin JP, Chávez T, Moreno JM, Machane M, Noireau F, Schofield CJ. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J Med Entomol 1999a; 36(6): 653-59.

Dujardin JP, Kaba D, Henry AB. The exchangeability of shape. BMC Research Notes 2010; 3: 266.

Dujardin JP, Panzera P, Schofield C. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999b; 94 Suppl 1: 223-8.

Dujardin JP, Panzera P, Schofield C. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Bruxelles: Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer. Classe des Sciences Naturelles et Médicales; 2000.

Dujardin JP, Slice DE. Contributions of morphometrics to medical entomology. In: Tibayrenc M. Encyclopedia of infectious disease. Modern methodologies. New York: Wiley; 2007. p. 435-45.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Monitoramento por Satélite [Internet] [local desconhecido]; 1999 [atualizada em 1999; acesso em 2012 22 Jan]. Disponível em: <http://www.zaeto.cnpm.embrapa.br/vege.html>

Ferrete JA, Lemos JC, Lima SC. Lagos artificiais e os fatores condicionantes e determinantes no processo saúde-doença. Caminhos de Geografia 2004; 12(3): 187-200.

Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. Rev Saúde Pública 1980; 14: 265-99.

Forattini OP, Ferreira OA, Rocha e Silva EO, Rabello EX, Pattoli, DGB. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. III. Dispersão local de triatomíneos, com especial referência ao *Triatoma sordida*. Rev Saúde Pública 1971; 5(2): 193-205.

Franco JMV, Uzunian A. Cerrado Brasileiro. 1.ed. São Paulo: Harbra; 2004.

Frias-Lasserre D. A New Species and Karyotype Variation in the Bordering Distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* Frías *et al* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its Parapatric Model of Speciation. Neotropical Entomology 2010; 39(4):572-583.

Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Segura, CAM, Girón IG, Curto de Casas SI. Distribuição geográfica e dispersão alti-latitudinal de alguns gêneros e espécies da Tribo Triatomini Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1998; 93: 33-37.

Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J. 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 2003; 202: 1-36.

Garcia AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Valente SA, Frame I A, Stothard R, Miles M. Random Amplification of Polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol 1998; 35: 38-45.

Garcia BA, Moriyama EN, Powell JR. Mitochondrial DNA sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. J Med Entomol 2001; 38(5): 675-83.

Garcia BA, Powell JR. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. J Med Entomol 1998; 35: 232-238.

Gardim S. Relação filogenética entre sete espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) da região Centro-Oeste do Brasil baseada no sequenciamento de genes mitocondriais. [Dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"; 2010.

Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95(4): 557-65.

Githeko AK, Lindsay SW, Confalonieri UE, Patz JÁ. El cambio climático y las enfermedades transmitidas por vectores: un análisis regional. Revista Virtual REDESM 2009; 3 (3).

Gonçalves TCM, Lopes CM, Ramos LB, Novo SC, Santos-Mallet JR. Knowledge concerning the insect bug and its role in the transmission of Chagas' disease from the point of view of Health Officers. In: Simpósio Internacional Comemorativo da

Descoberta da Doença de Chagas, 2009, Rio de Janeiro. Simpósio Internacional Comemorativo da Descoberta da Doença de Chagas, 2009a.

Gonçalves TCM, Sampaio IA, Ramos LB, Gomes ACF, Maia AAS, Dantas EC, Teves-Neves SC, Mallet JRS, Lopes CM. Investigação sobre a fauna de triatomíneos no sudeste de Tocantins. In: 25ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas; 2009; Minas Gerais. Uberaba: Livro de Resumos; 2009b. p. 47.

Gonçalves TCM, Lopes CM, Santos-Mallet JR, Gomes ACF, Modena CM, Schall VT. Ações Integradas de Educação e Saúde na Prevenção da Doença de Chagas. In: 26ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas; 2010; Minas Gerais. Uberaba: Livro de resumos; 2010. p. 99.

Gonçalves RG, Ferreira JB, Rosa AF, Bar ME, Galvão C. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Med Vet Entomol* 2011; 25(1): 84-93

Gorla DE, DujardinJP, Schofield CJ. Biosystematics of the world Triatominae. *Acta Trop* 1997; 63: 127-40.

Gumiel M, Catalá S, Noireau F, Rojas de Arias A, García A, Dujardin JP. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Syst Entom* 2003; 28(2): 173-79.

Harrison RG. Linking evolutionary pattern and process: the relevance of species concepts for the study of speciation. In: Howard DJ, Berlocher SH (eds) *Endless forms: species and speciation*. Oxford University Press, New York 1998; pp. 19-31.

Hypsa V, Tietz DF, Zrzavy J, Rego RO, Galvão C, Jurberg J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origino of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 2002; 23(3): 447-57.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapas de bioma e Vegetação [Internet] [local desconhecido]; 2004 [atualizada em 2004 Maio; acesso em 2012 22

Jan]. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas e Mapas/Mapas Murais/biomas\\_pdf.zip](ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/biomas_pdf.zip)

Jeannel R. Henicocephalidae et Reduviidae. In: Voyage de Ch. Alluaud et R. Jeannel en Afrique orientale (1911-1912). Resultats scientifiques – Hemiptera; Paris; 1919; 3: 131-314.

Jurberg J. Contribuição ao estudo comparativo da genitália externa em sub-famílias de Reduviidae (Hemiptera-Heteroptera) [dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1977.

Jurberg J. A taxonomia de triatomíneos baseada nas estruturas fálicas (Hemiptera, Reduviidae) [tese]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1996.

Jurberg J. Ferramentas usadas em taxonomia de Triatomíneos. O uso Múltiplo. In: II Encuentro Nacional de Entomología Médica y Veterinaria. VII Jornadas de Zoología del Uruguay; 2003; Uruguai. Montevideú: Entomología y Vectores 2003; 10(4): 497-509.

Jurberg J, Galvão C. *Hermanlenticia* n. gen. Da Tribo Triatomini, com um rol de espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92 (2): 181-185.

Klingerberg CP. Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. Nat Rev Genet 2010; 11(9): 623-635.

LACEN/TO, Laboratório Central de Referência em Saúde Pública. Relatório de certificação na interrupção da transmissão vetorial da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* (Reduviidae:Triatominae). Tocantins, 2002.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol 1965; 25(4): 349-76.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Cavernícola* Barber, 1937, com um estudo sobre a genitália externa (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol 1969a; 29(4): 317-27.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859, com um estudo sobre a genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol 1969b; 29(4): 487-560.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Eratyrus* Stal, 1859, com um estudo sobre a genitália externa (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol 1970; 30(2): 297-312.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Paratriatoma* Barber, 1938, com um estudo sobre a genitália externa (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol 1971; 31(1): 39-48.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Dipetalogaster* Usinger, 1939, com um estudo sobre a genitália externa (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Studia Entomologica 1972; 15: 465-84.

Lent H, Jurberg J. O gênero *Panstrongylus* Berg, 1879, com um estudo sobre a genitália externa das espécies (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). Rev Brasil Biol 1975; 35(3): 379-438.

Lent H, Jurberg J. Estudo comparativo da genitália externa masculina de seis espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 que mais frequentemente habitam o domicílio humano no Brasil. Rev Brasil Biol 1978; 38(4): 931-44.

Lent H, Jurberg J. Comentários sobre a genitália externa masculina em *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera, Reduviidae). Rev Brasil Biol 1980; 40(3): 611-27.

Lent H, Jurberg J, Galvão C. Descrição do Alótipo (Macho) de *Triatoma guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 proveniente do Estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91(3): 313-15.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Amer Mus Nat Hist 1979; 163 (3): 127-520.

Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 377–386.

Macedo CL. Estudo do “complexo *Triatoma sordida* (Stal, 1859) Hemiptera, Reduviidae, Triatominae através de marcadores genéticos, morfometria e morfologia. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2001.

Macedo ICG, Gomes ACF, Gloria AFR, Silva MDF, Bastos WM, Tamoyo COC. Doença de Chagas aguda no estado do Tocantins: Distribuição das principais espécies de triatomíneos nas regiões de saúde do Estado entre 2005 e 2011. In: Anais da 27ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 15ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses; 2011; Minas Gerais. Uberaba: Livro de Resumos; 2011. p. 35.

Machado RB, Aguiar LMS, Castro AAJF, Nogueira CC, Neto MBR. Caracterização da fauna e flora do Cerrado. In: Faleiro FG, Farias Neto AL. Savanas: Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais. Planaltina, Brasília: Embrapa Cerrados; 2008. p. 285-300.

Mallet J. Group selection and the development of the biological species concept. Philos Trans R Soc B 2010; 365: 1853-1863.

Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schenttino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. The ITS – 2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species and phylogenetic relationships

in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol* 2001; 18(1): 136-42.

Marcilla A, Bargues MD, Abad-Franch F, Panzera F, Carcavallo RU, Noireau F, Galvão C, Jurberg J, Miles MA, Dujardin JP, Mas-Coma S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol* 2002; 1: 225-235.

Martínez FH, GC Villalobos, AM Cevallos, P De la Torre, JP Laclette, R Alejandre-Aguilar, B Espinoza. 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* 2006; 41 (2): 279-287.

Mas-Coma S, Bargues MD. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop* 2009; 110 (2-3): 112-136.

Matias A, de la Riva JX, Torrez M, Dujardin JP. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by wings. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(7): 947-50.

Mayr E. Systematics and the origin of species. Nova York: Columbia University Press 1942.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 Suppl 1: 17-30.

Monteiro FA, Costa J, Sole-Cava AM. Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petroicii* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92(8): 897-900.

Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62 (4): 460-465.

Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 2004; 32: 46–56.

Moraes-Souza H, Ferreira-Silva M. O controle da transmissão transfusional. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44 Suppl 2: 64-67.

Naegele MP, Da Costa PI, Da Rosa JA. Polymorphism of the ITS-2 region of the ribosomal DNA of the Triatominae *Rhodnius domesticus*, *R. pictipes*, *R. prolixus* and *R. stali*. *Medical and Veterinary Entomology* 2006; 20: 353-357.

Nei M, Kumar S. *Molecular evolution and phylogenetics*. 1.ed. Oxford: Oxford University; 2000. p.112.

Neiva A, Pinto C. O estado actual dos conhecimentos sobre o gênero *Rhodnius* Stal, com a descrição de uma nova espécie. *Brasil Med*. 1923; 37: 20-24.

Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Dujardin JP. Detection of wild dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 583-584.

Noireau F, Carbajal-de-La-Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An da Acad Bras Cienc* 2005; 77(3): 431-36.

Noireau F, Flores R, Vargas F. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93(1): 13-14.

Obara MT, Barata JMS, Rosa JA, Almeida PS, Gonçalves GA, Dale C, Gurgel – Gonçalves R. Description of the female and new records of *Triatoma baratai* Carcavallo & Jurberg, 2000 (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) from

Mato Grosso do Sul, Brazil, with a key to the species of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex. Zootaxa 2012; 3151: 63-68.

Oliveira IAS, Maia AAS, Dantas EC. Avaliação do controle de qualidade na identificação taxonômica e exame parasitológico de triatomíneos, indicadores de resultados discordantes e positividade, nos anos de 2004 a 2006. Boletim epidemiológico - Superintendência de vigilância e proteção a Saúde do Tocantins 2008 Jan; 5: 1-3.

Pacheco RS, Almeida CE, Costa J, Klisiowicz DR, Mas-Coma S, Bargues MD. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). Na Trop Med Paras 2003; 97 (7): 757-768.

Paterson HEH. The recognition concept of species. In: Vrba ES (ed) Specie and speciation. Transvaal Museum Monograph 4, Pretoria, 1985; pp 21-29.

Paula AS, Diotaiuti L, Schofield. Testing the sister-group relationship of the *Rhodniini* and *Triatomini* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). Mol Phylogenet Evol 2005; 35(3): 712-18.

Pedro EG, Rodrigues BEPF, Simões PR, Amaral PV, Junior AP, Figueiredo LAF, Souza R, Rodrigues A, El-dosh LG. IV Expedição Tocantins (BR): Rumo ao desconhecido. In: XXIX Congresso Brasileiro de Espeleologia; Minas Gerais. Ouro Preto: Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Espeleologia; 2007. p.231-237.

Pereira-Lourenço AS, Santos-Mallet JR, Freitas SPC. Descrição de uma nova estrutura presente na bolsa copulatória de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Heteroptera, Reduviidae). In: I Simpósio de Entomologia do Rio de Janeiro; 2011; Rio de Janeiro, RJ: Anais do I Simpósio de Entomologia do Rio de Janeiro; 2011.

Pérez-Gutiérrez E, Agrello RS, Figueroa R, Junqueira ACV, Abad-Franch F, Coura JR, Dias JCP, Viñas PA, Andrade SG, et al. Consulta técnica em epidemiologia,

prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39(5): 512-14.

Pérez R, Hernández M, Quintero O, Scvortzoff E, Canale D, Méndez L, Cohanoff C, Martino M, Panzera F. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Genetica 2005; 125(2-3): 261-70.

Pfeiler E, Bitler BG, Ramsey JM, Palacios-Cardiel C, Markow TA. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. Mol Phylogenet Evol 2006; 41(1): 209-221.

Poinar Jr. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoralia: Trypanosomatidae), the first fóssil evidence of a Triatominae – Trypanosomatid vector association. Vector Borne Zoonotic Dis 2005; 5 (1): 72 – 81.

Rosa JA, Mendonça VJ, Rocha CS, Gardim S, Cilense M. Characterization of the external female genitalia of six species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) by scanning electron microscopy. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(3): 286-92.

Rosa JA, Mendonça VJ, Rocha CS, Gardim S, Oliveira J, Nascimento JD, Pinto MC, Cilense M, Almeida CE, Galvão C, Barata JM. Estudo da genitália externa feminina de 12 espécies de *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae) por microscopia eletrônica de varredura. In: Anais da 27ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e 15ª Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses; 2011; Minas Gerais. Uberaba: Livro de Resumos; 2011. p. 26.

Ryckman RE. Biosystematics and hosts of the *Triatoma* complex in North America. Univ California Publ Ent 1962; 27: 93-239

Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, García BA. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genética* 2004; 121: 229-240.

Santos-Mallet JR, Lopes CM, Gonçalves TCM. Métodos Usados em Invertebrados. In: Ribeiro CAO, Reis-Filho HS, Goetzner SR. Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia. São Paulo: Santos; 2012. p. 295-305.

Schachter – Broide J, Gürtler RE, Kitron V, Dujardin JP. Temporal variations of wing size and shape of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Northwestern Argentina using geometric morphometry. *J Med Entomol* 2009; 46(5): 994-1000.

Schaefer CW. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Questões sistemáticas e algumas outras. *Neotrop Entomol* 2003; 32(1): 1-10.

Schmunis GA. Tripanossomíase Americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. In: Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1997. p. 11-24.

Schofield CJ. Biosystematics of the Triatominae. In: Service MW. Biosystematics of Haematophagous Insects. Oxford: Oxford University Press; 1988. p. 284-312.

Schofield CJ. Triatominae: biology and control. *Med Vet Entomol* 1994; 8(3): 218.

Schofield CJ. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cad Saude Publica* 2000a; 16 Suppl 2: 89-92.

Schofield CJ. *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000b; 95: 535-544.

Schofield CJ, Dolling WR. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In: Lane RP, Crosskey RW. Medical Insects and Arachnids. London: Chapman & Hall; 1993; p. 483-516.

Schofield CJ, Dujardin JP. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actualités Biologiques* 1999; 21: 183-197.

Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 2009; 110(2-3): 88-100.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 2006; 22(12): 583-8.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (Brasil). Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Diagnóstico e manejo clínico da forma cardíaca da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 15-18.

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (Brasil). Aspectos Epidemiológicos da Doença de Chagas [Internet]. Brasília; 2011 [atualizada em 2011 Ago; acesso em 2012 22 Jan]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31454](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454)

Shaw KL. The genealogical view of speciation – commentary. *J Evol Biol* 2001; 14: 880-882.

Shaw KL, Mullen SP. Genes versus phenotypes in the study of speciation. *Genetica* 2011; 139(5): 649-661.

Silva LAGC. Nota técnica: Biomas presentes no Estado do Tocantins. Biblioteca digital da câmara dos deputados. 2007; p. 3-9.

Silveira AC. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44 Suppl 2: 122-24.

Silveira AC, Dias JCP. O controle da transmissão vetorial. Rev Soc Bras Med Trop 2011; 44 Suppl 2: 52-63.

Silveira AC, Vinhaes MC. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31: 15-60.

Soares RPP, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH. Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Acta Trop 1998; 71(3): 285-91.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol 2011; 28: 2731-39.

Tum R. Roberta Tum.com.br [Internet]. Palmas (TO); 2011 [atualizada em 2011 Nov; acesso em 2012 22 Jan]. Disponível em: <http://robertatum.com.br/noticia/ananas-vive-surto-de-chagas-contaminacao-aconteceu-com-suco-da-jucara-e-saude-ja-tem-7-casos-confirmados/17151>

Usinger RL. A revised classification of the Reduvidae with a new subfamily from South America (Hemiptera). Ann Entomol Soc Am 1943; 36: 602-18.

Usinger RL, Wygodzinsky P, Ryckman RE. The biosystematics of Triatominae. Ann Rev Entomol 1966; 11: 309-330.

Valente SAS. Estudos dos surtos de doença de Chagas ocorridas no Pará e Amapá: Análise parasitológica, sorológica e molecular. [Tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2008.

Valente SAS, Pimentel, OS, Valente VC. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém. Primeiro registro no oeste do Pará. Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34(1):19-20.

Vaz VC, D'Andrea PS, Jansen AM. Effects of habitat fragmentation on wild mammal infection by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2007; 134: 1785-93.

Verano OT, Galvão AB. *Triatoma costalimai* sp N. *Rev Bras Malariol D Trop* 1959; 10:199-205.

Via S, West J. The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation. *Mol Ecol* 2008; 17: 4334-4345.

Villegas, J, Feliciangeli, MD, Dujardin JP. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infect Genet Evol* 2002; 2(2): 121-28.

Villela MM, Souza JMB, Melo VP, Dias JCP. Avaliação do programa de controle da doença de Chagas em relação à presença de *Panstrongylus megistus* na região centro-oeste do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Cad Saude Publica* 2009; 25(4): 907-17.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saude Publica* 2000; 16 Suppl 2: 7-12.

Weirauch C, Munro JB. Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Mol Phylogenet Evol* 2009; 53: 287–299.

World Health Organization. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO Technical Report Series 2002; 905: pp.109.

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. [local desconhecido]; 2010 [atualizada em 2010 Jun; acesso em 2011 22 Dez]. Disponível em: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>