

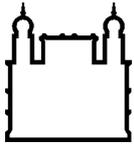
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

***Taxonomia integrada de espécies de Triatoma Laporte,
1832 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) encontradas no
Estado do Rio Grande do Sul, Brasil***

CAROLINA BRANCO DALE COUTINHO

Rio de Janeiro
Novembro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

CAROLINA BRANCO DALE COUTINHO

Taxonomia integrada de espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Saúde

Orientador (es): Prof. Dr. Cleber Galvão Ferreira
Profa. Dra. Marina Vianna Braga

RIO DE JANEIRO

Novembro de 2017

Coutinho, Carolina Branco Dale.

Taxonomia integrada de espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil / Carolina Branco Dale Coutinho. - Rio de Janeiro, 2017.

100 f.; il.

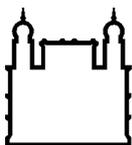
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2017.

Orientador: Cleber Galvão .

Co-orientadora: Marina Vianna Braga.

Bibliografia: f. 65-69

1. Doença de Chagas. 2. Vetores. 3. Taxonomia. 4. Morfometria Geométrica. 5. Hidrocarbonetos Cuticulares. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

AUTOR: CAROLINA BRANCO DALE COUTINHO

**Taxonomia integrada de espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera:
Reduviidae: Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**

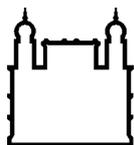
**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Cleber Galvão Ferreira
Profa. Dra. Marina Vianna Braga**

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Jacenir dos Santos Mallet - Presidente (Fundação Oswaldo Cruz)
Prof. Dr. Fernando Braga Stehling Dias (Fundação Oswaldo Cruz)
Prof. Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva (UniRio)
Prof. Dra. Karina Alessandra Morelli (UERJ)
Prof. Dra. Dayse da Silva Rocha (Instituto Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, 13 de novembro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Agradecimentos

Ao meu orientador e eterno chefe Cleber Galvão, pela oportunidade, por esses mais de 14 anos de convivência e apoio, pela confiança e liberdade de conduzir meu trabalho. Pela amizade e principalmente por me despertar a paixão pela taxonomia. Sem seu apoio e incentivo eu não teria chegado até aqui.

À minha coorientadora Marina Vianna Braga por abrir não só as portas do seu laboratório, como as de sua casa. Por me aturar finais de semana, por me fazer querer aprender a cada dia mais sobre o mundo da quimiotaxonomia.

Ao meu marido Luis Claudio, por todo apoio e paciência durante esses quatro anos. Por estar ao meu lado até nas horas mais chatas. Você é o meu número, sem você a vida teria bem menos graça.

À minha amiga Dra. Silvia Justi por todas as colaborações, sempre me ceder horas do seu dia e trabalho para me ajudar nos experimentos, análises correções, revisões e desabafos.

À Dra. Marilza, do Laboratório de Simulídeos e Oncocercose por abrir as portas do Laboratório para que eu pudesse conduzir meu trabalho de biologia molecular. E também a sua equipe envolvida, por todo apoio, atenção e cuidado na realização dos experimentos.

Ao Dr. Gary Blomquist e Marina MacLean, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Nevada em Reno, nos Estados Unidos, por me aceitar durante um mês, e abrir as portas do Laboratório onde pude conduzir meu trabalho. E também a sua equipe do departamento que tiveram toda paciência do mundo em me ensinar e não tornaram nossas diferenças de língua um problema.

À Dra. Dayse Rocha muito obrigado por ter aceitado ser revisora da minha tese. Por ter me acompanhado e compartilhado todas as minhas coletas de campo (minha melhor companhia), na criação das minhas colônias, por ter se tornado parte da minha vida. Obrigada por todo carinho, atenção e dedicação!

À Dra. Jacenir dos Santos Mallet, ao Dr. Fernando Stehling e ao Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva muito obrigado por terem aceitado participar da banca examinadora da minha tese.

À Dra. Karina Morelli por ter aceitado ser suplente da minha banca.

À Fundação Oswaldo Cruz e à coordenação de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz pela oportunidade de realizar esta tese.

As Plataformas de Sequenciamento de DNA e Espectometria da Fundação Oswaldo Cruz.

Às minhas alunas Thaynara e Renatha, muito obrigado por todo apoio com os experimentos, pelos momentos de descontração, pelas risadas e até mesmo pelo mau humor, esse trabalho também é parte da vida de vocês! Vocês foram fundamentais nesse trabalho.

À chefe do Laboratório de Biodiversidade Entomológica Dra. Jane Costa pelo incentivo, e por ter permitido que o LABE seja um ambiente de trabalho onde pesquisadores colaboram entre si e produzem conhecimento.

À toda Equipe do LABE vocês são parte fundamental da minha vida profissional, muito obrigada pela paciência e carinho que vocês tiveram ao longo desses três anos juntos.

Ao Dr. Jurgen Deckert, curador da coleção Entomológica do Museu de História Natural de Berlim e a Ruth Salas, curadora do Museu de História Natural de Nova York, por me receberem e permitirem meu acesso aos espécimes depositados.

Ao Dr. Carlos Eduardo de Almeida pelo material cedido, sua contribuição foi muito valiosa!

Ao amigo Cesar Luiz pela amizade e ter me apresentado e cedido uma das melhores pessoas do mundo (Marina).

Às minhas amigas e amigos, obrigado por entenderem minha ausência necessária.

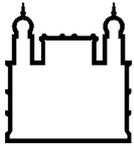
Ao meu Mestre de Taekwondo Marcio Losada, por me tornar uma pessoa melhor a cada dia e mostrar que sou realmente capaz de alcançar meus objetivos com serenidade, tranquilidade e disciplina em todos os momentos.

À minha mãe por ter sustentado o meu sonho e acreditado que eu seria capaz.

Obrigado a todas as pessoas envolvidas que não foram mencionadas pelo apoio na realização deste trabalho.

“O que fazemos durante as horas de trabalho determina o que temos; o que fazemos nas horas de lazer determina o que somos.”

Charles M. Schulz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

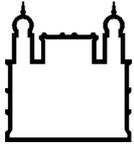
Taxonomia integrada de espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Carolina Branco Dale Coutinho

A doença de Chagas tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido ao homem e a outros mamíferos através das fezes infectadas de triatomíneos. Na década de 1980, o Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, apresentava um dos maiores índices de infestação domiciliar e altas taxas de soroprevalência do país. Após a eliminação do *Triatoma infestans*, outros vetores vêm sendo mais frequentemente encontrados em domicílios e peridomicílios. Das 80 espécies do gênero *Triatoma*, dez podem ser encontradas no Rio Grande do Sul. Devido à ausência de uma vacina e drogas mais eficazes, os programas de controle permanecem fundamentados no combate aos vetores, sendo preciso investir na elaboração de planos de vigilância e controle baseados na correta identificação desses insetos. Os objetivos do presente trabalho foram analisar e comparar, através da taxonomia integrada (morfologia, morfometria geométrica, análise de hidrocarbonetos cuticulares e biologia molecular), as espécies afins de *Triatoma* encontradas no Estado do Rio Grande do Sul. Foram coletados espécimes de triatomíneos em 13 municípios, identificados como *Triatoma circummaculata*, *Triatoma pintodiasi* e *Triatoma rubrovaria*. Foi constatado que estas espécies apresentam um polimorfismo cromático de pronoto muito maior do que aqueles descritos na literatura, porém distinguir essas espécies utilizando essa característica não é possível. Nossos resultados de morfometria geométrica associados aos de hidrocarbonetos cuticulares mostram que os espécimes de *T. rubrovaria* que apresentam coloração amarela parecem ser uma espécie diferente das demais, e que *T. pintodiasi* mesmo apresentando variação cromática aparece como uma linhagem independente. A análise dos hidrocarbonetos cuticulares se mostrou como uma ferramenta útil na diagnose desse grupo de espécies de triatomíneos e esta foi a primeira vez que se utilizou toda a série tipo desse grupo para comparação de seus espécimes. A análise morfométrica da espécie *T. circummaculata* demonstra que os espécimes coletados no Estado do Rio Grande do Sul diferem da sua série tipo indicando que são uma entidade taxonômica diferente. Os dados de biologia molecular foram inconclusivos para caracterização dessas espécies, sendo necessárias outras análises.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Integrate taxonomy of *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) species from Rio Grande do Sul State, Brazil

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Carolina Branco Dale Coutinho

Chagas disease is transmitted to man and other mammals through infected feces of triatomines containing the ethiological agent *Trypanosoma cruzi*. During the 1980's, the State of Rio Grande do Sul, Brazil, presented one of the highest rates of house infestation and high rates of seroprevalence in the country. After the elimination of *Triatoma infestans*, other vectors have been found more frequently in households and peridomestic places. Of the 80 species of the *Triatoma* genus, ten can be found in Rio Grande do Sul. Due to the absence of a vaccine and more effective drugs, control programs remain based on the vector control, and it is necessary to invest in surveillance programs and control plans based on the correct identification of these insects. The objectives of the present work were to analyze and compare, using integrated taxonomy (morphology, geometric morphometry, cuticular hydrocarbon analysis and molecular biology), the related *Triatoma* species found in the State of Rio Grande do Sul. Triatomine specimens were collected in 13 municipalities, identified as *Triatoma circummaculata*, *Triatoma pintodiasi* and *Triatoma rubrovaria*. Those species showed a higher chromatic polymorphism of the pronotum than described in the literature. but distinguishing these species using this character, was not possible. Our results of geometric morphometry associated with cuticular hydrocarbon analysis show that *T. rubrovaria* specimens presenting yellow coloration appear to be a different species, and *T. pintodiasi*, even presenting chromatic variation, appears as an independent lineage. The analysis of cuticular hydrocarbons proved to be a useful tool in the diagnosis of this group of species, and this was the first time that the type series was used to compare their specimens. The morphometric analysis of *T. circummaculata* demonstrated that the specimens collected in the State of Rio Grande do Sul differ from their type series, indicating that they are a different taxonomic entity. Molecular biology data were inconclusive for the characterization of these species, and other analyses are necessary.

ÍNDICE

AUTOR: Carolina Branco Dale Coutinho	iii
Índice de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xvi
Lista de Siglas e Abreviaturas	xvii
1.1 O Estado do Rio Grande do Sul	2
1.2 A Doença de Chagas no Rio Grande do Sul	2
1.3 Subfamília Triatominae	5
1.4 Tribo Triatomini e gênero <i>Triatoma</i>	5
1.5 Triatomíneos do Rio Grande do Sul	6
1.6 Caracterização dos Triatomíneos	12
1.7 Justificativa	15
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3.1 Obtenção das amostras	17
3.2 Coleta em campo	17
3.3 Coleções Entomológicas	20
3.4 Manutenção de colônias para material coletado em campo	22
3.5 Morfometria Geométrica	23
3.6 Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs)	25
3.7 Análise de DNA mitocondrial	30
4.1 Identificação dos Triatomíneos	31
4.2 Polimorfismo cromático das espécies do Estado do Rio Grande do Sul	33
4.3 Morfometria Geométrica	44
4.4 Hidrocarbonetos Cuticulares	47
4.5 Rede de Haplótipos	56
9.1 Anexo I	70
9.2 Anexo II	75
9.3 Anexo III	76
9.4 Anexo IV	79

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa de distribuição das principais espécies *Triatoma rubrovaria*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma circummaculata*, *Triatoma sordida*, *Triatoma oliveirai* e *Panstrongylus tupynambai* no Estado do Rio Grande do Sul de acordo com Di Primio (1953) 4
- Figura 2. Espécies de Triatominae do Estado do Rio Grande do Sul (Galvão, 2014). A) *Triatoma carcavalloei*; B) *Triatoma circummaculata*; C) *Triatoma delponteii*; D) *Triatoma infestans*; E) *Triatoma klugii*; F) *Triatoma oliveirai*; G) *Triatoma pintodiasi*; H) *Triatoma platensis*; I) *Triatoma rubrovaria* e J) *Triatoma sordida* 6
- Figura 3. Holótipo de *Triatoma carcavalloei*, coleção Rodolfo Carcavallo, Fiocruz, Rio de Janeiro. 7
- Figura 4. Holótipo de *Triatoma circummaculata* depositado na coleção do Museu de História Natural, Berlim. 8
- Figura 5. Espécime de *Triatoma klugii* (n. 2926), coleção Herman Lent, Fiocruz, Rio de Janeiro. 9
- Figura 6. Holótipo de *Triatoma pintodiasi* (fonte: Jurberg et al. 2013) 10
- Figura 7. Lectótipo de *Triatoma rubrovaria* depositado na coleção do Museu de História Natural, Berlim. 11
- Figura 8. Principais pontos de coleta (Municípios) do Estado do Rio Grande do Sul. Erro! Indicador não definido.
- Figura 9. A e C) Relevo característico dos municípios coletados, B e D) Amontoado de pedras onde as espécies podem ser encontradas 19
- Figura 10. A) Espécimes de *Triatoma rubrovaria* e a série tipo *T. circummaculata* (3 espécimes); B) Espécimes de *T. rubrovaria* e C) Lectótipo de *T. rubrovaria* em vista lateral, depositados na coleção entomológica do Museu de História Natural de Berlim. 20
- Figura 11. A) Espécimes de *Triatoma circummaculata* e B) Espécimes de *Triatoma rubrovaria* e C) Espécime de *T. rubrovaria* depositados na coleção entomológica do Museu de História Natural de Nova York, Estados Unidos. 21
- Figura 12. Asa de *Triatoma rubrovaria* mostrando os 9 pontos de referência (landmarks) marcados para cada espécime de *Triatoma*. 23
- Figura 13. Cabeça de *Triatoma rubrovaria* mostrando os 15 pontos de referência (landmarks) marcados para todos os espécimes. 23

Figura 14. A) Tubos de ensaio contendo hexano; B) Coluna cromatográfica contendo lã de vidro e C) Coluna cromatografica contendo lã de vidro e Florsil	25
Figura 15. Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM - Plataforma Farmanguinhos, Fiocruz)	26
Figura 16. Esquema dos procedimentos pré-injeção no Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas	27
Figura 17. A) Cromatograma mostrando o perfil dos hidrocarbonetos cuticulares e B) Espectro do composto obtido em um dos picos.	28
Figura 18. A) Relevo e vegetação característica da região central do Rio Grande do Sul e B) Amontoado de rochas onde foram coletados os espécimes	31
Figura 19;. Espécimes de triatomíneos coletados na região. A) <i>T. rubrovaria</i> , B) <i>T. pintodiasi</i> e C) <i>T. circummaculata</i>	31
Figura 20. A) Cerca de pedra, B) Ninfa de triatomíneos encontrada nas cercas e C) Coleta e acondicionamento do espécime.	32
Figura 21. Pronoto de <i>Triatoma rubrovaria</i> com padrão cromático apresentando duas manchas com diferentes padrões cromáticos: A) laranja ; B) amarelo-alaranjado e C) vermelho	33
Figura 22. Colar de <i>Triatoma rubrovaria</i> apresentando ângulos anterolaterais variando do negro ao vermelho.	34
Figura 23. Espécimes de <i>Triatoma rubrovaria</i> apresentando cor das asas diferente da cor dos conexivos.	35
Figura 24. Lobo posterior do pronoto de <i>Triatoma circummaculata</i> apresentando padrão cromático variando do totalmente negro ao vermelho.	40
Figura 25. Espécimes de <i>Triatoma circummaculata</i> apresentando padrões cromáticos de conexivo diferentes: A) laranja; B) laranja-amarelado; C) amarelo e D) amarelo.	41
Figura 26. Mapa fatorial da análise discriminante com a distribuição de cada espécie. TR: <i>Triatoma rubrovaria</i> ; TK: <i>Triatoma klugi</i> ; TCAR: <i>Triatoma carcavalloi</i> ; TRB: <i>Triatoma rubrovaria</i> série Berlim; TPD: <i>Triatoma pintodiasi</i> ; TC: <i>Triatoma circummaculata</i> brasileiro; TC/TPD: <i>Triatoma pintodiasi</i> com algumas características de <i>Triatoma circummaculata</i> ; TCB: <i>Triatoma circummaculata</i> holótipo série Berlim	45
Figura 27. Análise de cluster. TR: <i>Triatoma rubrovaria</i> ; TK: <i>Triatoma klugi</i> ; TCAR: <i>Triatoma carcavalloi</i> ; TRB: <i>Triatoma rubrovaria</i> série Berlim; TPD:	

<i>Triatoma pintodiasi</i> ; TC: <i>Triatoma circummaculata</i> brasileir; TC/TPD: <i>Triatoma pintodiasi</i> com algumas características de <i>Triatoma circummaculata</i> ; TCB: <i>Triatoma circummaculata</i> holótipo série Berlim	45
Figura 28. Mapa fatorial mostrando a morfometria geométrica das cabeças. TR: <i>Triatoma rubrovaria</i> ; TK: <i>Triatoma klugi</i> ; TCAR: <i>Triatoma carcavallo</i> ; TRB: <i>Triatoma rubrovaria</i> série Berlim; TPD: <i>Triatoma pintodiasi</i> ; TPDFD: <i>Triatoma pintodiasi</i> de Fernão Dias TC: <i>Triatoma circummaculata</i> brasileir; TC/TPD: <i>Triatoma pintodiasi</i> com algumas características de <i>Triatoma circummaculata</i> ; TCB: <i>Triatoma circummaculata</i> holótipo série Berlim; TCB: <i>Triatoma circummaculata</i> coleção IOC; RVRs: <i>Triatoma rubrovaria</i> de Santa Maria.	46
Figura 29. Análise de Cluster utilizando a conformação das cabeças dos espécimes do Rio Grande do Sul. TI: <i>Triatoma infestans</i> ; TR: <i>Triatoma rubrovaria</i> ; TK: <i>Triatoma klugi</i> ; TCAR: <i>Triatoma carcavallo</i> ; TRB: <i>Triatoma rubrovaria</i> série Berlim; TPD: <i>Triatoma pintodiasi</i> ; TPDFD: <i>Triatoma pintodiasi</i> de Fernão Dias TC: <i>Triatoma circummaculata</i> brasileir; TC/TPD: <i>Triatoma pintodiasi</i> com algumas características de <i>Triatoma circummaculata</i> ; TCB: <i>Triatoma circummaculata</i> holótipo série Berlim; TCB: <i>Triatoma circummaculata</i> coleção IOC; FDRs: <i>Triatoma pintodiasi</i> Fernão Dias com características diferentes; RVRs: <i>Triatoma rubrovaria</i> de Santa Maria.	46
Figura 30. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de <i>Triatoma rubrovaria</i> padrão cromático vermelho.	47
Figura 31. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de <i>Triatoma rubrovaria</i> padrão cromático amarelo.	48
Figura 32. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de <i>Triatoma rubrovaria</i> padrão cromático laranja.	49
Figura 33. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de <i>Triatoma rubrovaria</i> padrão cromático rosa.	49
Figura 34. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares do espécime argentino de coleção de <i>Triatoma rubrovaria</i> .	50
Figura 35. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares do lectótipo de <i>Triatoma rubrovaria</i> .	50
Figura 36. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de <i>Triatoma circummaculata</i> .	51
Figura 37. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de <i>Triatoma pintodiasi</i> .	52

Figura 38 - Comparação entre as porcentagens médias dos n-alcenos majoritários e do esqualeno presentes nos espécimes analisados de *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma pintodiasi* e *Triatoma circummaculata*. 54

Figura 39 - Dendograma montado a partir do índice de similaridade de Bray-Curtis por “single linkage method” comparando *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma circummaculata* e *Triatoma pintodiasi*. Cluster A mostra *T. rubrovaria* do Museu de Berlim (1595vB) como táxon irmão de *T. pintodiasi* (Tpd_1608); Cluster B mostra as distâncias entre os outros espécimes analisados. 54

Figura 40 - Porcentagens de cada classe de hidrocarbonetos cuticulares por espécime estudado. Comparação entre *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma circummaculata* (Tc) e *Triatoma pintodiasi* (Tpd). 55

Figura 41. Árvore mostrando o agrupamento dos haplótipos. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Foto e desenho esquemático dos padrões cromáticos de <i>T. rubrovaria</i> já descritos na literatura, com descrição, autor e ano.	35
Tabela 2. Foto e desenho esquemáticos dos novos padrões cromáticos encontrados em espécimes de <i>T. rubrovaria</i> do Estado do Rio Grande do Sul	37
Tabela 3. Foto e desenho esquemáticos dos novos padrões cromáticos encontrados em espécimes de <i>T. circummaculata</i> do Estado do Rio Grande do Sul.....	42
Tabela 4. Foto e desenho esquemáticos dos novos padrões cromáticos encontrados em espécimes de <i>T. pintodiasi</i> do Estado do Rio Grande do Sul	43
Tabela 5 - Porcentagens de hidrocarbonetos cuticulares majoritários por espécime estudado. Comparação entre <i>Triatoma rubrovaria</i> vermelho, amarelo, laranja e rosa, <i>Triatoma pintodiasi</i> e <i>Triatoma circummaculata</i>	76
Tabela 6 - Porcentagens dos hidrocarbonetos cuticulares encontrados em cada espécime estudado. Comparação entre <i>Triatoma rubrovaria</i> vermelho, amarelo, laranja e rosa, <i>Triatoma pintodiasi</i> e <i>Triatoma circummaculata</i>	79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ex Exemplo

1 INTRODUÇÃO

Descoberta em 1909, a doença de Chagas (DC), também conhecida como Tripanossomíase Americana, é uma patologia de natureza endêmica e evolução geralmente crônica, que tem (*Trypanosomatida*; *Trypanosomatidae*) (Chagas, 1909). O parasito é transmitido ao homem e a outros mamíferos, principalmente, através das fezes infectadas dos insetos vetores da subfamília *Triatominae* (*Hemiptera*: *Reduviidae*), popularmente conhecidos como barbeiros (Dias & Schofield 1999, Schmunis 1999). Além da transmissão vetorial clássica, existem ainda outros mecanismos envolvidos na infecção chagásica como: a) transmissão vetorial oral (ingestão acidental do parasito por meio de alimentos contaminados com as fezes do vetor; b) transfusão sanguínea; c) transmissão congênita; d) acidentes de laboratório; e) transplante de órgãos; f) aleitamento materno (Dias & Schofield 1999).

Entre as décadas de 1970 e 1980, estimava-se que 29,4% dos 17 milhões de casos mundiais da DC ocorriam em território nacional, o que correspondia a quase 4,2% da população brasileira da época, e que a incidência anual era de 700-800 mil novos casos (Morel & Lazdins 2003). Os estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul eram os que apresentavam os maiores índices de infestação domiciliar, e uma das mais altas taxas de soroprevalência no país (8,8%) (Passos & Silveira, 2011). Em 1991, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) coordenou um consórcio internacional denominado “Iniciativa dos Países do Cone Sul”, uma parceria do Brasil com Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai que tinha como objetivos a redução da transmissão vetorial e o controle dos bancos de sangue evitando a transmissão por transfusão sanguínea.

O primeiro objetivo foi alcançado pelo o controle do *Triatoma infestans* (Klug, 1834), a principal espécie vetora, que apresentava alta capacidade e competência vetorial e ampla distribuição geográfica, sendo encontrada exclusivamente em domicílios. Hoje, esta espécie está restrita a focos residuais na Bahia e Rio Grande do Sul. Com o controle do *T. infestans* outros vetores, que eram considerados secundários ou de pouca importância epidemiológica, vêm sendo mais frequentemente encontrados tanto em domicílios quanto em peridomicílios (Lent & Wygodzinsky 1979, Almeida et al. 2002, Galvão 2014). Nesse novo contexto, algumas espécies como por exemplo *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1832) e *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911) vem sendo consideradas espécies de importância primária na transmissão da DC no país.

Essa iniciativa além de apresentar um grande impacto na redução da transmissão vetorial da doença, também estimulou a criação de iniciativas subsequentes nos países andinos e na América Central (Schofield & Dujardin 1997, Dias & Schofield 1999, Dias et al. 2002, Gurgel-Gonçalves et al. 2012).

Apesar do sucesso relativo dos programas de controle, atualmente estima-se que a DC afete entre seis e sete milhões de pessoas e que cerca de 75 milhões vivam em áreas de risco, sendo a quarta principal endemia das Américas (WHO, 2017). No Brasil é ainda considerada uma enfermidade de caráter socioeconômico (Dias et al. 2016).

Devido à ausência, até o momento, de uma vacina e drogas mais eficazes, os programas de controle permanecem fundamentados no combate ao vetor, através da melhoria das habitações (ações físicas) e da utilização de inseticidas de efeito residual (ações químicas). Porém, estas medidas não obterão êxito se empregadas isoladamente. É preciso investir na elaboração de planos de vigilância e controle baseados na correta identificação dos vetores, que podem ser encontrados no ambiente silvestre, invadindo, ocasionalmente, os domicílios ou em processo de domiciliação.

1.1 O Estado do Rio Grande do Sul

Localizado no extremo sul do Brasil, o Rio Grande do Sul é uma das 27 unidades federativas do país, possui uma área total de cerca de 282 km², 11,29 milhões de habitantes e uma alta taxa de alfabetização (95%). Tem o quinto maior IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) do Brasil, de 0,869, e o quarto maior PIB (Produto Interno Bruto) (www.rs.gov.br).

É o estado mais meridional do país e está dividido em sete mesorregiões, 35 microrregiões e 496 municípios. Sua geografia é caracterizada por um diversificado relevo, dividido em Pampas, Planalto Serrano e Região Lagunar. Tem como limites o Estado de Santa Catarina ao norte, o Uruguai ao sul e a Argentina a oeste.

1.2 A doença de Chagas no Rio Grande do Sul

Neiva (1913) fez o primeiro registro de *Triatoma infestans* no país, porém somente em 1918, foi comprovada a infecção natural desta espécie por *T. cruzi*.

Talice (1939) diagnosticou o primeiro caso humano de DC em Montevideu de um paciente procedente do município de Santana do Livramento, Rio Grande do Sul.

César Pinto (1946) realizou o primeiro levantamento de índices parasitários no Rio Grande do Sul, observando taxa de infecção de 50% para os triatomíneos domiciliados em 49 dos 92 municípios e 73 casos humanos (Neiva, 1913; Baruffa & Alcantara Filho, 1985).

Na década de 1950, ocorreram as primeiras ações de controle no Estado. Coutinho, Pinto & Barbosa (1951) constataram uma taxa de infecção de 56,7% em espécimes de *T. infestans* capturados em domicílios. Di Primio (1951) faz o primeiro registro oficial de *T. circummaculata* (Stål, 1859) no Estado do Rio Grande do Sul e o primeiro mapa de distribuição desta espécie (Fig. 1). Caldeira Brant *et al.* (1957) realizaram o primeiro inquérito epidemiológico com populações da zona rural.

Salgado *et al.* (1964) realizaram um inquérito que abrangeu 20 municípios do Rio Grande do Sul, a maioria das amostras eram de crianças em idade escolar, e o índice médio de positividade para DC registrado foi de 3,13%. Baruffa & Alcântara Filho (1977) verificaram 27 municípios do Centro Sul do estado e constaram que em menos de 10 anos índice médio havia aumentado cinco vezes mais. Baruffa & Alcantara Filho (1985), após 10 anos da criação do Programa de Controle de Doença de Chagas (PCDCh), pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM) realizaram um novo inquérito sorológico e entomológico em populações rurais de 17 municípios, e registraram que a região estava entre as áreas de maior endemia do país. Em 1992, o Rio Grande do Sul passou a integrar o Programa de Eliminação de *T. infestans* (Camargo *et al.* 1984, Baruffa & Alcantara Filho 1985, Bedin *et al.* 2009, Pedroso *et al.* 2011).

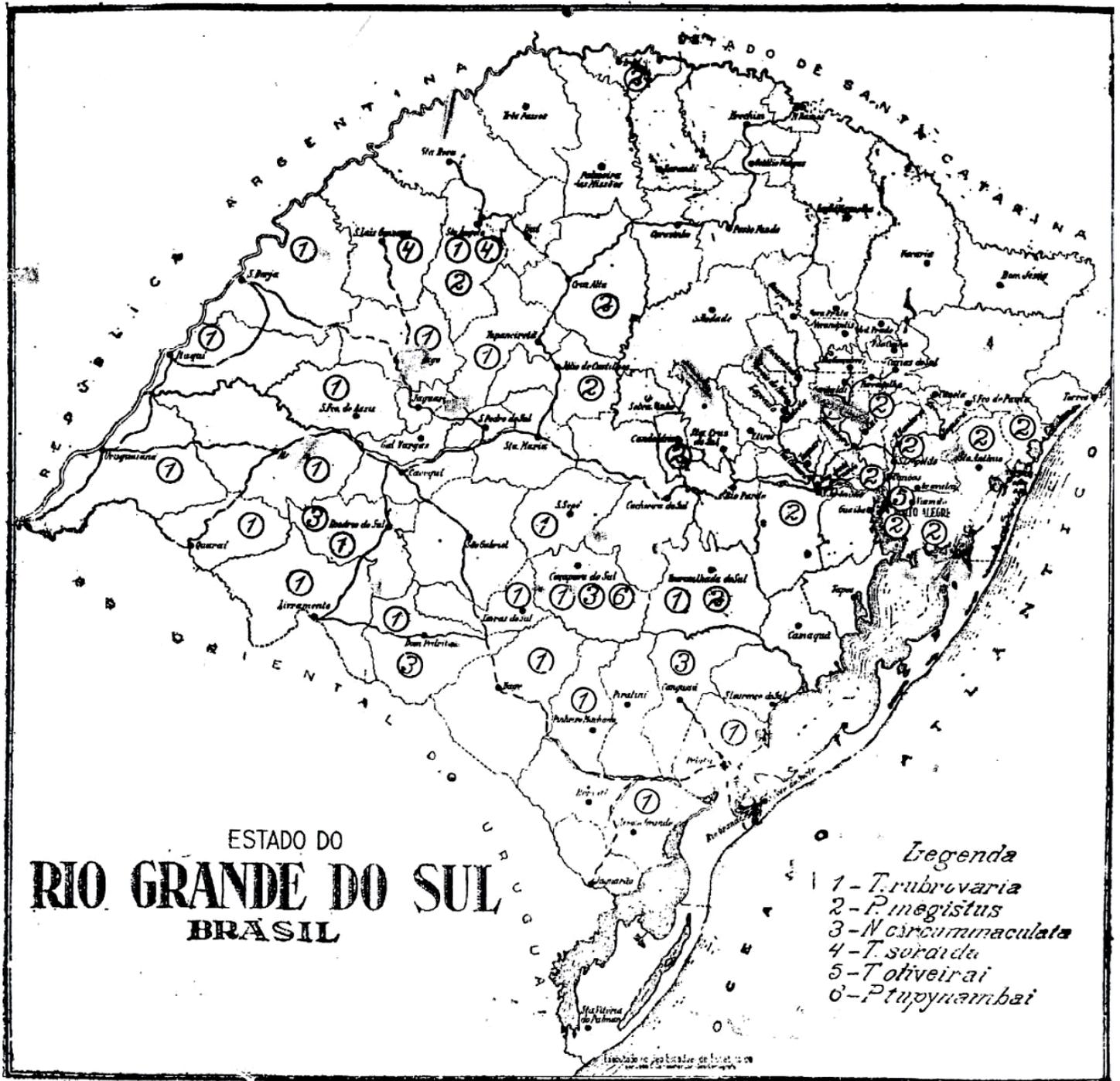


Figura 1. Mapa de distribuição das principais espécies *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843), *P. megistus* (Burmeister, 1835), *T. circummaculata* (Stål, 1859), *Triatoma sordida* (Stål, 1859), *Triatoma oliveirai* (Neiva, Pinto & Lent, 1939) e *P. tupynambai* Lent, 1942 no Estado do Rio Grande do Sul de acordo com Di Primio (1953)

1.3 Subfamília Triatominae

A subfamília Triatominae é atualmente composta por 152 espécies distribuídas em 15 gêneros e cinco tribos (Justi & Galvão 2016):

Alberproseniini Martínez e Carcavallo, 1977;

Bolboderini Usinger, 1944;

Cavernicolini Usinger, 1944;

Rhodniini Pinto, 1926;

Triatomini Jeannel, 1919.

Dentre estas, as tribos Triatomini e Rhodniini possuem grande importância epidemiológica, além de serem as mais diversas e, conseqüentemente, as mais estudadas (Lent & Wygodzinsky 1979, Galvão et al. 2003, Vallejo et al. 2009).

Triatomíneos são caracterizados pelo hematofagismo obrigatório em todas as fases do desenvolvimento, que é do tipo hemimetabólico, onde o ciclo de vida de ovo a adulto passa por cinco estádios ninfais (1° a 5°). As ninfas podem ser diferenciadas dos adultos por apresentarem olhos reduzidos, ausência de asas, ausência de ocelos e imaturidade sexual. Adultos apresentam evidente dimorfismo sexual, cabeça geralmente alongada e subcilíndrica, dividida em regiões ante e pós-ocular; olhos desenvolvidos multifacetados; ocelos; tórax e pronoto bem desenvolvidos; escutelo proeminente; abdômen achatado dorsoventralmente e conexivos laterais que podem apresentar manchas características (Lent & Wygodzinsky 1979, Galvão, 2014).

1.4 Tribo Triatomini e gênero *Triatoma*

A tribo Triatomini Jeannel (1919), é a mais diversa, composta por 10 dos 15 gêneros conhecidos. *Panstrongylus* Berg, 1879 e *Triatoma* Laporte, 1832 são os gêneros de maior importância médica, pois algumas de suas espécies são consideradas como principais vetores de *T. cruzi* na América Latina (Galvão 2014).

Triatoma é o gênero que apresenta uma morfologia muito diversa e o maior número de espécies descritas, que podem ser agrupadas em oito complexos e oito subcomplexos (Schofield & Galvão 2009, Justi et al. 2014).

1.5 Triatomíneos do Rio Grande do Sul

Atualmente, das 85 espécies (sendo uma fósil) que compõem o gênero *Triatoma*, 33 ocorrem em território nacional, sendo que destas, 10 são encontradas no estado do Rio Grande do Sul: *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Galvão 1998, *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859), *Triatoma delponteii* (Romaña & Abalos, 1947), *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Triatoma klugi* Jurberg, Lent & Galvão, 2001, *Triatoma oliveirai* (Neiva, Pinto & Lent, 1939), *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013, *Triatoma platensis* Neiva, 1913, *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Schofield & Galvão 2009, Galvão 2014) (Fig.2 A-J).

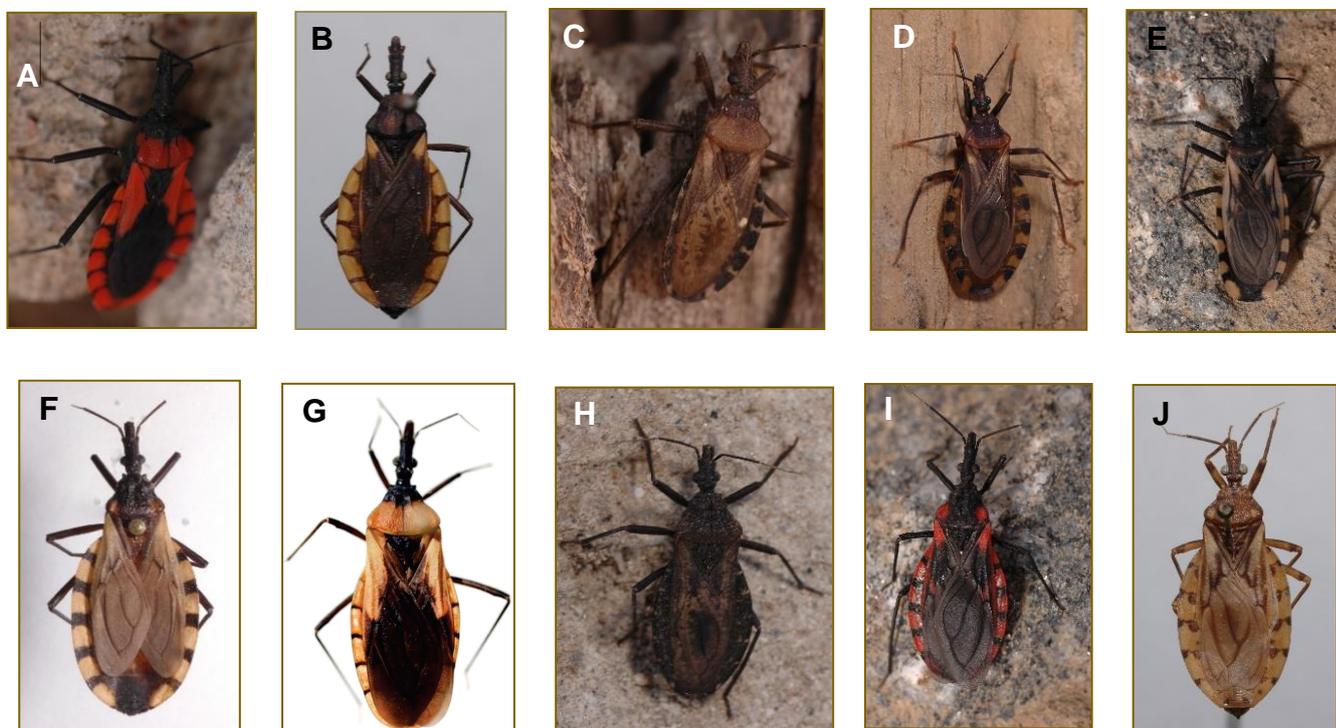


Figura 2. Espécies de Triatominae do Estado do Rio Grande do Sul (Galvão, 2014). A) *Triatoma carcavalloei*; B) *Triatoma circummaculata*; C) *Triatoma delponteii*; D) *Triatoma infestans*; E) *Triatoma klugi*; F) *Triatoma oliveirai*; G) *Triatoma pintodiasi*; H) *Triatoma platensis*; I) *Triatoma rubrovaria* e J) *Triatoma sordida*

1.5.1 *Triatoma carcavalloi* Jurberg, Rocha & Lent, 1998

Características principais: Comprimento total de 19,5 a 22 mm. Coloração geral negra com grandes manchas alaranjadas ou avermelhadas no lobo posterior do pronoto, cório e conexivo. Pronoto com o lobo anterior apresentando tubérculos disciais bem desenvolvidos e tubérculos laterais ausentes; lobo posterior variando do vermelho ao laranja, ângulos umerais arredondados. Escutelo negro. Pernas uniformemente negras, áreas tarsais castanhas (Fig. 3).

(Descrição completa em Jurberg et al. 1998).

Material-tipo: Coleção Rodolfo Carcavallo, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Descrita com base em quatro fêmeas coletadas em domicílios do RS. Holótipo: n°5505; Parátipos: n°5506, 5507, 5508.



Figura 3. Holótipo fêmea de *Triatoma carcavalloi*, coleção Rodolfo Carcavallo, Fiocruz, Rio de Janeiro.

1.5.2 *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859)

Características principais: Comprimento total de 15 a 17 mm. Coloração geral castanho-escura ou negra, com manchas que podem variar do laranja ao vermelho no pronoto, cório e conexivo. Pronoto com lobo anterior variando de castanho-escuro a negro, lobo posterior como o lobo anterior, ou variando de parcialmente a totalmente vermelho. Escutelo com processo apical da metade do comprimento do corpo principal e raramente com ápice claro. Conexivo vermelho brilhante com faixas negras transversais estreitas localizadas sobre as suturas intersegmentares.

(Descrição completa em Lent & Wygodzinsky, 1979)

Material-tipo: Museum für Naturkunde (Museu de História Natural), Berlim, Alemanha. Série-tipo com três fêmeas: lote 2935 (Fig. 4).

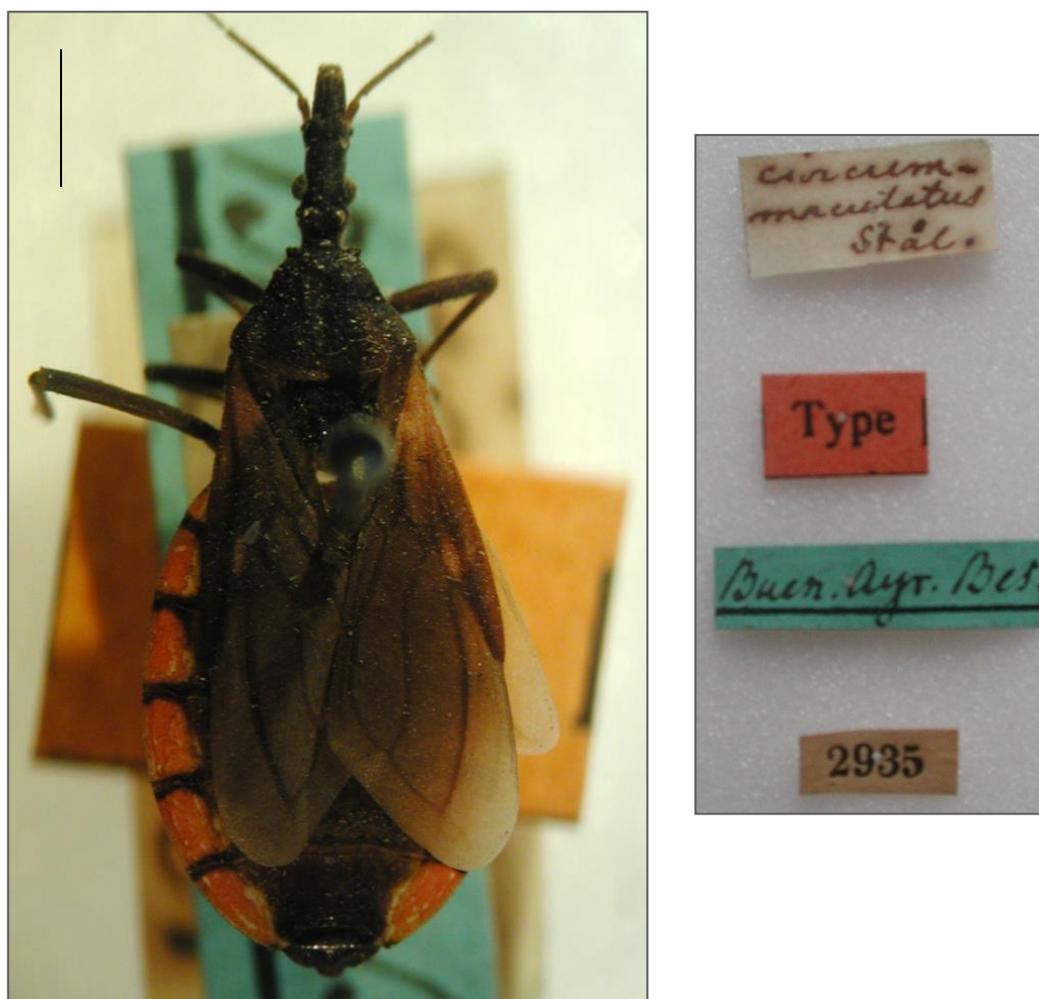


Figura 4. Holótipo fêmea de *Triatoma circummaculata* depositado na coleção do Museu de História Natural, Berlim.

1.5.3 *Triatoma klugi* Jurberg, Lent & Galvão, 2001

Características principais: Comprimento total 24 a 27 mm. Coloração geral negra, tendo manchas amarelas centrais em cada segmento do conexivo, parte externa do clavo e base do cório. Cabeça negra. Pronoto negro brilhante, rugoso. Lobo anterior com tubérculos discais vestigiais. Lobo posterior rugoso. Escutelo muito rugoso com a depressão central muito profunda e o processo do escutelo cônico, pequeno e voltado para cima. Hemiélitros não atingindo o bordo posterior do abdômen, apenas a metade do VII urotergito. Cório amarelo com veias negras. Pernas uniformemente negras, longas e delgadas, fêmures anteriores e médios com 1 + 1 tubérculos pequenos na união do 1/4 apical com os 3/4 proximais. Conexivo com mancha amarela no centro de cada segmento.

(Para descrição completa veja Carcavallo et al. 2001)

Material-tipo: Coleções Herman Lent e Rodolfo Carcavallo, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.



Figura 5. Espécime de *Triatoma klugi* (n. 2926), coleção Herman Lent, Fiocruz, Rio de Janeiro.

1.5.4 *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013

Características principais: comprimento total de 15 a 16 mm. Coloração geral castanho-escuro. Pronoto com lobo anterior totalmente negro, lobo posterior totalmente laranja. Ângulo ântero-lateral levemente projetado, acuminado. Escutelo triangular, negro, superfície esculpada e brilhante. Hemílitros com a maior parte do clavo e pequena porção do cório castanho-escuros e maior parte do cório laranja; nervuras da membrana castanho-escuras, tornando-se laranja ao adentrarem o cório. (Para descrição completa veja Jurberg et al. 2013).

Material-tipo: Coleção Herman Lent, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.



Figura 6. Holótipo de *Triatoma pintodiasi* (fonte: Jurberg et al. 2013)

1.5.5 *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843)

Características principais: comprimento total de 21 a 25 mm. Coloração geral negra com manchas laranjas ou vermelhas no pescoço, pronoto, cório e conexivo. Pronoto com lobo anterior invariavelmente negro, lobo posterior raramente completamente negro ou completamente avermelhado, apresentando nessa região grande variabilidade cromática mesclando áreas negras e avermelhadas. Escutelo negro com processo apical curto. Hemiélitro com cório negro com manchas basais e subapicais claras, membrana castanho-escuro. Conexivo negro com grande mancha vermelha ou laranja na região central de cada segmento.

(Para descrição completa veja Lent & Wygodzinsky, 1979).

Material-tipo: *Conorhinus rubrovarius*: desconhecido; sinónimas: *Triatoma rubroniger*. Museum für Naturkunde (Museu de História Natural), Berlim, Alemanha; *T. gomesi*: Coleção Herman Lent, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; *T. bruchi*: Misión de Estudios de Patología Regional, Buenos Aires, Argentina.

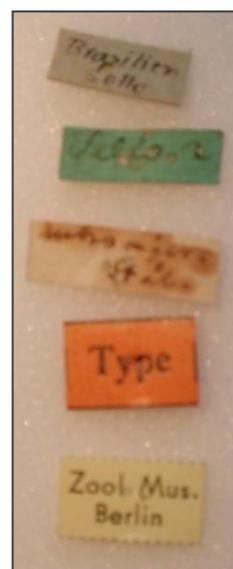
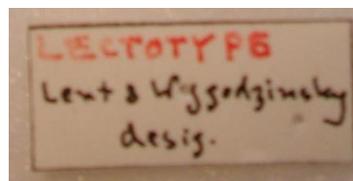


Figura 7. Lectótipo de *Triatoma rubrovaria* (*Triatoma rubroniger*) depositado na coleção do Museu de História Natural, Berlim.

1.6 Caracterização dos Triatomíneos

1.6.1 *Morfometria Geométrica*

Segundo Bookstein (1991) a morfometria pode ser definida como “o estudo estatístico da covariância entre mudanças de forma e fatores causais”, ou seja, é uma linguagem matemática que descreve e estuda as diferenças entre as formas dos organismos, verificando as possíveis afinidades entre indivíduos ou grupo de indivíduos. Pode ser classificada em tradicional ou geométrica de acordo com o padrão de medidas utilizado.

Na morfometria tradicional são utilizadas medidas isométricas de distâncias entre pontos homólogos, perdendo sua relação com a forma biológica, pois na isometria à medida que o organismo cresce não há mudança em sua conformação.

A morfometria geométrica ou “nova morfometria”, ao contrário da morfometria tradicional, analisa através de medidas alométricas a quantificação da variação da forma, isso ocorre porque na alometria, à medida que ocorre a mudança de tamanho há uma alteração na sua conformação, gerando uma geometria diferente, como se houvesse uma deformação. Esta metodologia consegue capturar a geometria do objeto estudado através da utilização de coordenadas cartesianas como pontos de referência, permitindo a descrição e visualização, através de dados bi- ou tridimensionais, das diferenças geométricas das formas (Dujardin *et al.*, 1999).

Nos estudos dos triatomíneos, a utilização da morfometria tem duas décadas, tanto no campo da biologia populacional como em sistemática, sendo que alguns trabalhos têm utilizado esta metodologia visando esclarecer a validade taxonômica de algumas espécies (Dujardin *et al.* 1999, Patterson 2007, Jaramillo 2014, Magaly *et al.* 2015, Nattero *et al.* 2017).

1.6.2 **Hidrocarbonetos Cuticulares**

Os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são o principal grupo de compostos encontrados na complexa camada de lipídios presentes na superfície dos insetos. Além destes podem ser encontrados ácidos graxos, álcoois, parafinas, acilglicerídeos, fosfolipídios e glicolipídios (Lockey 1988; Blomquist & Bagnères 2010).

Baker et al. (1963), após o advento da cromatografia de gás líquido, realizaram a primeira análise completa dos HCs presentes na epicutícula de *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758) (Blattodea: Blattidae) (Blomquist & Bagnères 2010).

Com variadas funções, são os principais responsáveis pela resistência à dessecação, e ao decorrer de vários estudos foram sendo associados a outras funções, como agentes de proteção contra microrganismos patogênicos (Lockey 1988) e comunicação química (feromônios, alomônios ou cairomônios) (Carlson et al. 1971, Howard & Blomquist 2005, Blomquist & Bagnères 2010).

Os HCs são divididos em três classes principais (Lockey 1980, Blomquist & Bagnères 2010):

A. *n*-Alcanos: compostos saturados de cadeia linear.

B. Alcanos metil ramificados: apresentam ramificação metil e podem ser divididos em monometilalcanos com ramificações terminais (2- e 3- metilalcanos), monometilalcanos com ramificações internas (do carbono quatro em diante), dimetilalcanos, trimetilalcanos e, ocorrendo em menor abundância, tetra e pentametilalcanos.

C. Alcenos: compostos insaturados. São classificados em monoenos (com apenas uma dupla ligação na cadeia), dienos (duas) e trienos (três duplas ligações). Alcenos metilramificados não são comumente encontrados, mas Carlson e Schlein (1991) já reportaram a presença destes em moscas da família Glossinidae.

Estudos têm mostrado que os HCs diferem entre espécies próximas e até mesmo entre populações (Bagnères & Wicker-Thomas 2010, Braga et al. 2016). Além desta divergência, podem ocorrer variações intraespecíficas, que podem ser observadas por diferenças de perfis relacionadas à idade do inseto, fases de desenvolvimento, ao sexo (machos e fêmeas), entre outros (Lockey 1985, Lockey 1991, Kather & Martin 2012, Braga et al. 2013, Braga et al. 2016).

A utilização dos HCs para identificação e descrição de espécies vem sendo bastante empregada (Bagnères e Wicker-Thomas 2010), entretanto o uso como caráter taxonômico só foi possível após os trabalhos de Carlson & Service (1979, 1980), onde os autores, utilizando HCs, conseguiram separar as espécies do complexo *Anopheles gambiae* Guiles, 1926 (Diptera: Culicidae). A partir de então, diversos outros trabalhos, empregando esta técnica chamada de quimiotaxonomia, surgiram para auxiliar na identificação de algumas espécies crípticas (Bagnères e Wicker-Thomas 2010).

1.6.3 **Análise de DNA mitocondrial**

Com o advento da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), os métodos baseados em DNA permitiram que as análises moleculares se tornassem fundamentais para o avanço dos estudos de taxonomia e filogenia de triatomíneos. Nos últimos anos, técnicas moleculares utilizando diferentes marcadores, tais como 12S, 16S, Citocromo oxidase subunidade I (**COI**) e Citocromo b (**CytB**), vêm sendo amplamente empregados na tentativa de solucionar questões taxonômicas como identificação de espécies, estudos de genética de população e filogenia de triatomíneos. Esta técnica, apesar de gerar informações apenas sobre um *locus* de cada vez, pode ser útil na comparação de grupos de qualquer nível de relacionamento filogenético (Abad-Franch & Monteiro 2005). Alguns marcadores como **CytB** vem sendo muito utilizado com o propósito de identificação molecular em triatomíneos, pois este permite uma boa separação entre espécies proximamente relacionadas (Monteiro et al. 2001, 2013, Justí et al. 2014). O gene **Cytb**, quando comparado a **COI**, aparece como uma ferramenta muito mais informativa para comparações entre espécies, pois procura esclarecer tanto questões de sistemática como de evolução, e tenta auxiliar a investigação de problemas referentes ao impedimento taxonômico, como a identificação de espécies crípticas (Monteiro et al. 2001, 2013, Bargues et al. 2002, Abad-Franch & Monteiro 2005).

1.7 Justificativa

Desde a descrição da primeira espécie de Triatominae por De Geer (1773), a identificação de Triatomíneos tem evoluído constantemente, desde a abordagem morfológica e cromática (Costa et al. 1997), passando por extensas análises utilizando múltiplas abordagens, a fim de fortalecer a caracterização de cada táxon.

Segundo Jinbo et al. (2011), “A identificação de espécies é uma parte fundamental para o reconhecimento e descrição da biodiversidade”. Tradicionalmente esta identificação é feita por taxonomistas com base nas diagnoses e descrições morfológicas. Contudo, mesmo com descrições mais detalhadas e diagnoses evidentes, a identificação de alguns grupos de espécies morfológicamente muito similares ou crípticas se torna difícil ou em alguns casos, impossível (Schroeder et al. 2003). Esta dificuldade na identificação das espécies pode afetar o sucesso dos programas de controle vetorial e elaboração de planos de vigilância. Com base nessa problemática e a fim de contribuir para minimizar essas dificuldades, pesquisadores passaram a empregar técnicas alternativas (morfométricas e moleculares) que pudessem auxiliar a solucionar essas questões taxonômicas. Portanto, é necessário o desenvolvimento de estudos taxonômicos associados à novas técnicas, a fim de dar continuidade no estudo das espécies da região sul, contribuindo na identificação e caracterização desses potenciais vetores, visando à utilização destes dados para avaliação do risco da reinstalação da DC e também como subsídios na aplicação de medidas de controle mais precisas (Lent & Wygodzinsky, 1979; Hypsa et al. 2002; Almeida et al. 2000, 2009, Galvão et al. 2003, Galvão 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Definir o status taxonômico de alguns espécimes de triatomíneos encontradas no Estado do Rio Grande do Sul por meio de diferentes metodologias como morfometria geométrica dos adultos, a quimiotaxonomia (através da análise dos hidrocarbonetos cuticulares) e marcadores moleculares.

2.2 Objetivos Específicos

- Definir o perfil morfométrico dos adultos de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e dos diferentes morfotipos de *T. rubrovaria* através da morfometria geométrica.

- Construir uma rede de haplótipos entre as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* utilizando o marcador mitocondrial citocromo b (*Cytb*).

- Descrever e comparar o perfil de hidrocarbonetos cuticulares de adultos de *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* através da utilização da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

- Comparar pela primeira vez resultados de hidrocarbonetos cuticulares e análises de DNA mitocondrial com a morfometria geométrica das espécies de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

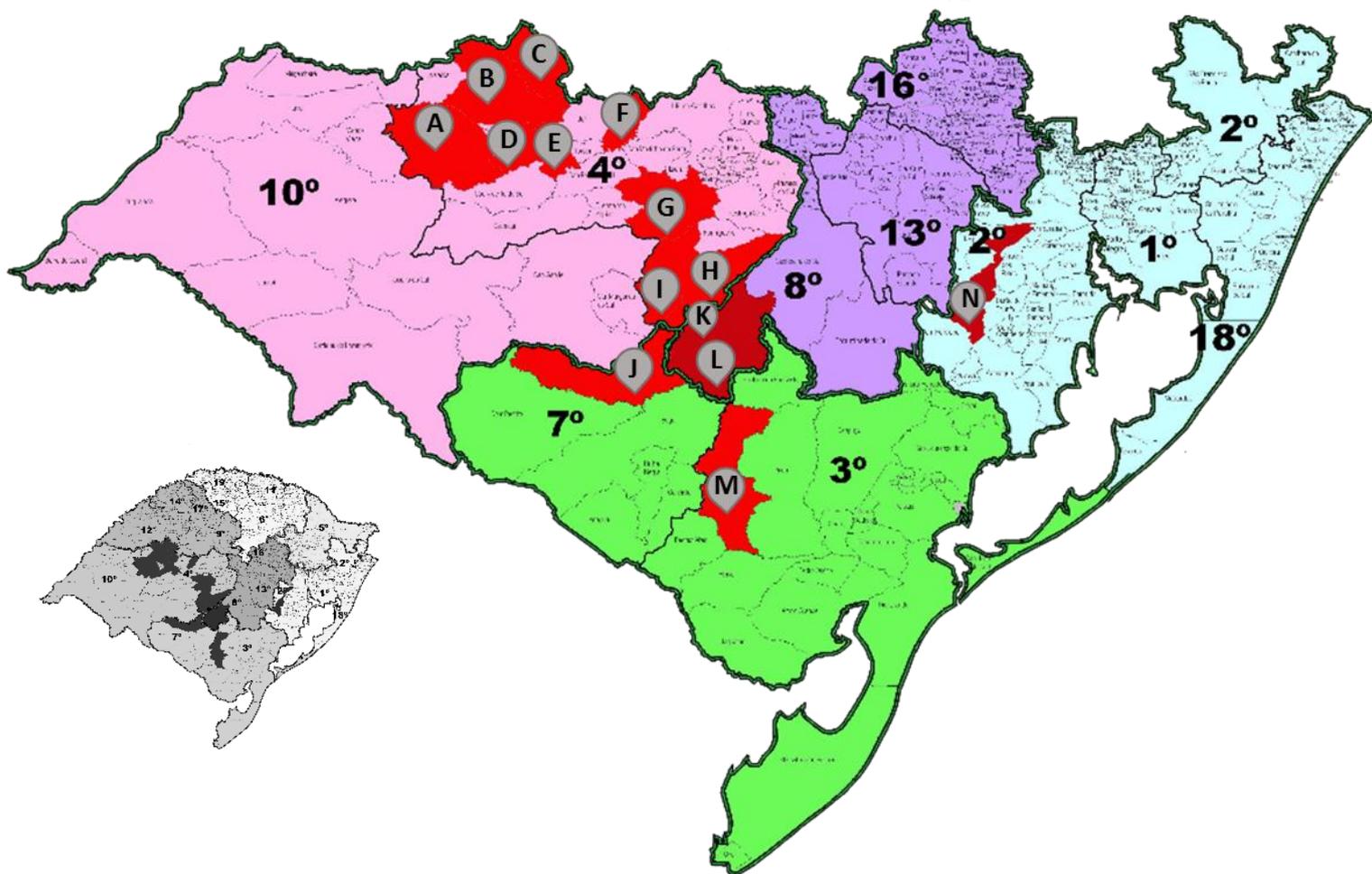
3.1 Obtenção das amostras

Espécimes de *Triatoma* utilizados neste estudo foram provenientes de cinco diferentes grupos: i) Coleção de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz, IOC (CT-IOC), Rio de Janeiro ; ii) Coleção do Museu de História Natural de Berlim, Alemanha; iii) Coleção do Museu de História Natural de Nova York, Estados Unidos; iv) insetos provenientes de campo, obtidos em diversas coletas em diferentes localidades no Rio Grande do Sul; e v) insetos provenientes de colônias do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (LNIRTT). Para a identificação taxonômica dos adultos foram utilizadas as chaves dicotômicas de Lent & Wygodzinsky (1979) e Galvão & Dale (2014).

3.2 Coleta em campo

Foram realizadas saídas de campo, no período de março de 2011 a julho de 2014 com a colaboração da 4ª Coordenadoria Regional de Saúde do Estado e também com o apoio do Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, para coleta de triatomíneos nos seguintes municípios: Caçapava do Sul, Capão do Cipó, Cerrito do Ouro, Jaguari, Lavras do Sul, Mata, Pinheiro Machado, Quevedos, São Francisco de Assis, Santiago, Santa Maria, São Jerônimo e Vila Nova do Sul (Fig. 8).

Os municípios estudados no presente trabalho encontram-se na região central do Rio Grande do Sul, na grande planície chamada Planalto meridional, e não apresentam muitas barreiras geográficas. O relevo possui formações de rochas sedimentares, onde podem ser encontradas as espécies *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* (Fig. 9 A-D). Nesse trabalho a espécie *T. klugi* não foi incluída na busca em campo pois seu local de ocorrência é no município de Nova Petrópolis, cerca de 400 Km de distância da região central do Estado do Rio Grande do Sul. Para as espécies *T. carcavalloi* e *T. klugi* foram utilizados insetos provenientes de colônias do insetário do LNIRTT provenientes das localidades São Jerônimo e Nova Petrópolis, respectivamente.



Localidades

- A – São Francisco de Assis**
- B – Santiago**
- C – Capão do Cipó**
- D – Jaguari**
- E – Mata**
- F – Quevedos**
- G – Santa Maria**

- H – São Sepé**
- I – Vila Nova do Sul**
- J – Lavras do Sul**
- K – Cerrito do Ouro**
- L – Caçapava do Sul**
- M – Pinheiro Machado**
- N – São Jerônimo**

Figura 8. Principais pontos de coleta (Municípios) do Estado do Rio Grande do Sul, por Regional.

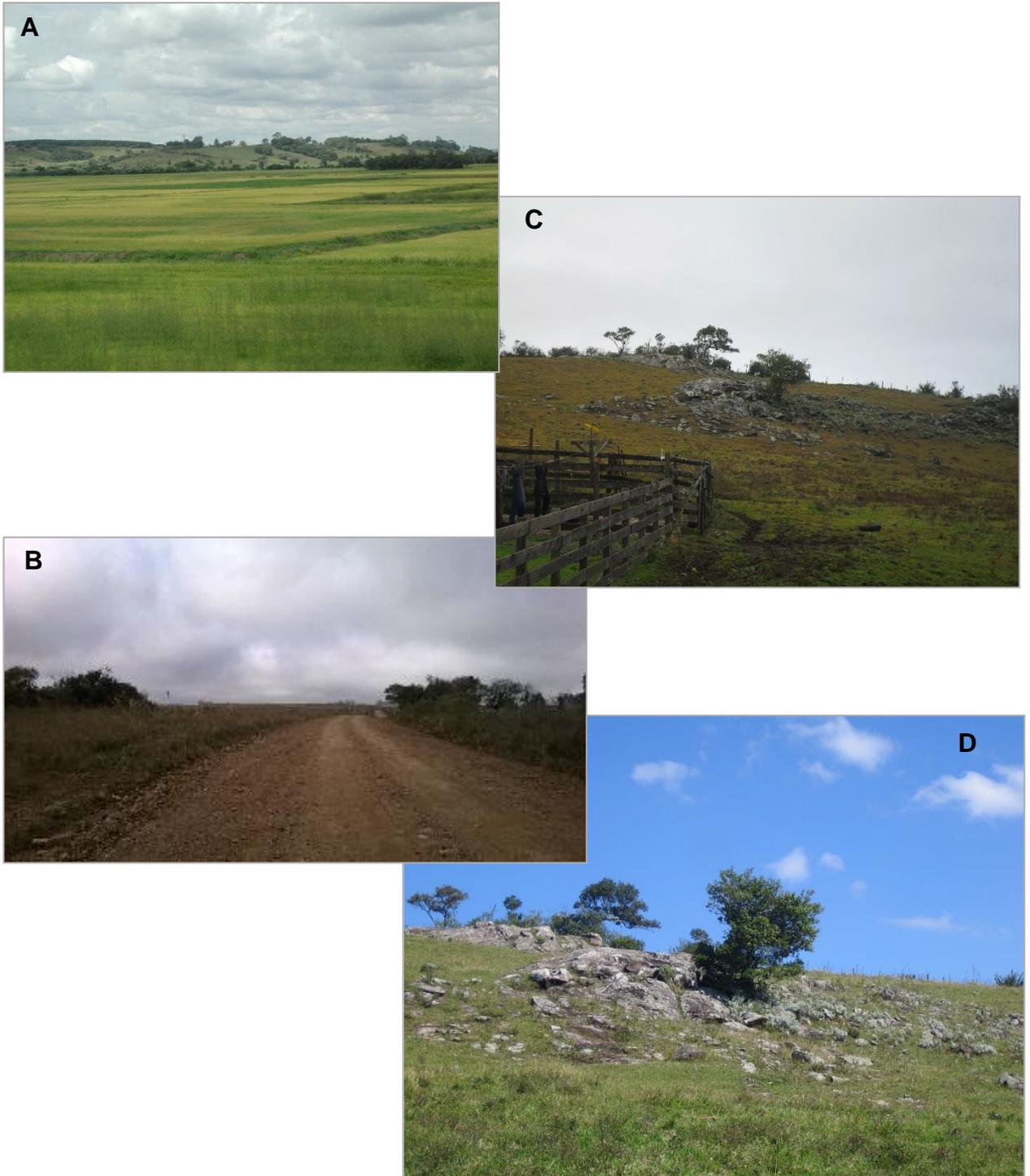


Figura 9. A e B) Relevo característico da região central do Rio Grande do Sul , C e D) Amontoado de pedras onde as espécies podem ser encontradas em Caçapava do Sul.

3.3 Coleções Entomológicas

a. *Coleção Entomológica do Museu de História Natural de Berlim, Alemanha*

O Museu de História Natural de Berlim, tem em seu acervo a série tipo de *T. circummaculata* com três espécimes provenientes de Buenos Aires e o lectótipo de *T. rubrovaria*. Além deste, a coleção possui um vasto acervo contendo diferentes espécies, incluindo holótipos e parátipos de diferentes espécies de triatomíneos. Neste trabalho foi possível fotografar os oito espécimes de *T. rubrovaria*, três de *T. circummaculata*, um total de 45 imagens dos espécimes em posição dorsal, ventral e lateral e também as informações referentes a etiqueta de distribuição geográfica, ano de depósito, identificação e lote também foram anotadas e fotografadas (Fig. 10)

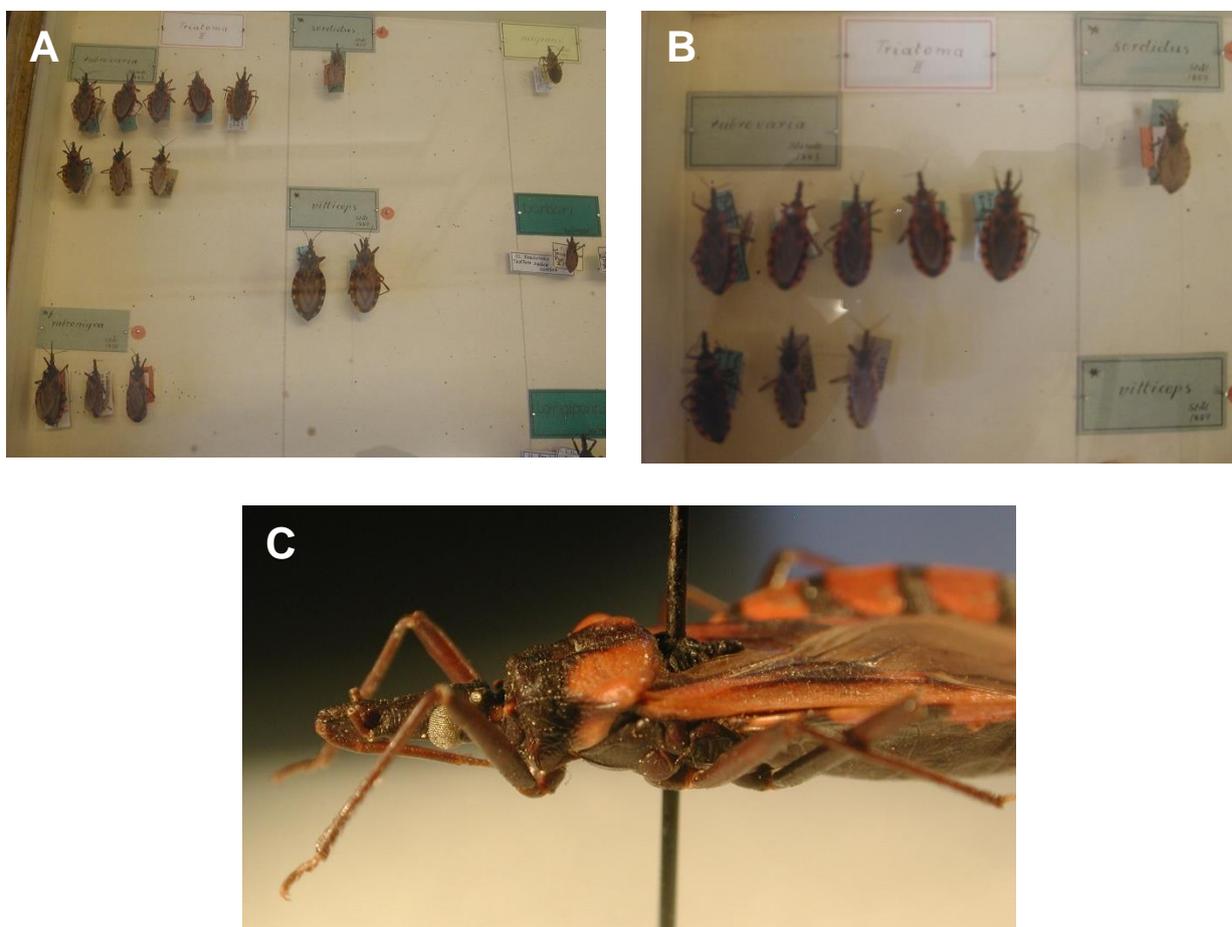


Figura 10. A) Espécimes de *Triatoma rubrovaria* e a série tipo *T. circummaculata* (3 espécimes); B) Espécimes de *T. rubrovaria* e C) Lectótipo de *T. rubrovaria* em vista lateral, depositados na coleção entomológica do Museu de História Natural de Berlim.

b. Coleção Entomológica do Museu de História Natural de Nova York, Estados Unidos.

O Museu de História Natural de Nova York abriga em sua coleção entomológica diferentes espécies de triatomíneos, uma boa parte depositada e estudada por Herman Lent e Pedro Wygodzinsky. Neste trabalho foi possível fotografar os 10 espécimes de *T. rubrovaria*, 11 de *T. circummaculata* e um sem identificação. Foram registadas um total de 25 imagens e as informações referentes a distribuição geográfica, ano de depósito, identificação e lote também foram anotadas e fotografadas (Fig.11)

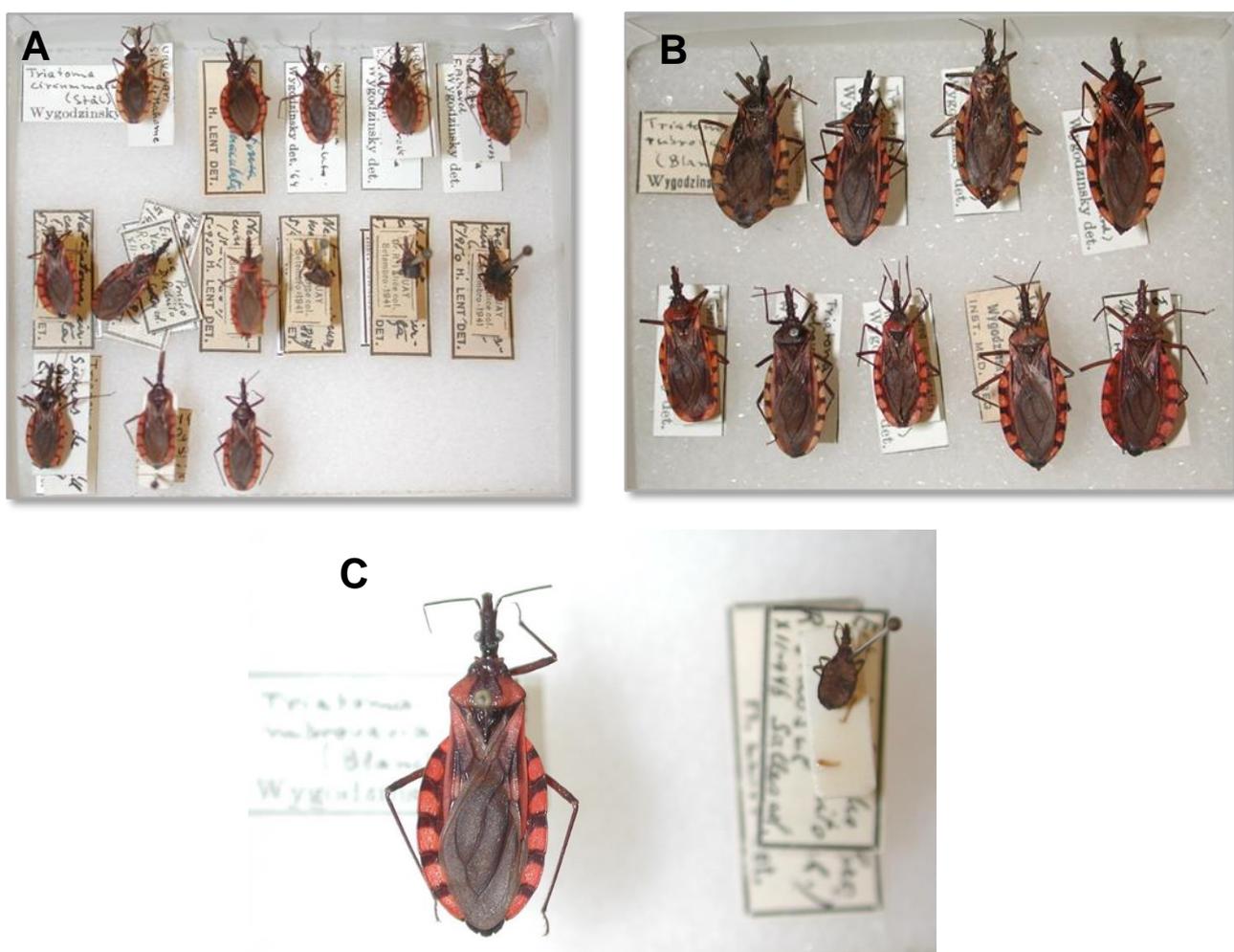


Figura 11. A) Espécimes de *Triatoma circummaculata* e B) Espécimes de *Triatoma rubrovaria* e C) Espécime de *T. rubrovaria* depositados na coleção entomológica do Museu de História Natural de Nova York, Estados Unidos.

c. Coleção entomológica Herman Lent e Rodolfo Carcavallo

O Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (LNIRTT) abriga a Coleção de Triatomíneos do Instituto Oswaldo Cruz (CTIOC), incluindo a Coleção Herman Lent (aberta e recebendo material) e a Coleção Rodolfo Carcavallo (fechada), ambas dedicadas principalmente aos vetores da doença de Chagas. Com mais de 10.000 espécimes, possui em seu acervo holótipos e parátipos de diferentes espécies de Triatominae, incluindo o material tipo de *T. carcavallo* e *T. pintodiasi*. Foram registradas um total de 90 imagens das espécies *T. carcavallo*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*.

3.4 Manutenção de colônias para material coletado em campo

Todo o material capturado em campo foi enviado ao LNIRTT do IOC, Fiocruz, RJ, onde foram mantidas 27 colônias, de acordo com o município estudado, em temperatura e umidade ambiente. Os espécimes foram acondicionados em recipientes de vidro, com rótulos identificando a origem e data de coleta, papel filtro de forma circular no fundo (para absorção das fezes e urinas) e outro em forma sanfonada (para auxiliar na movimentação dos insetos). A abertura do recipiente foi coberta com tecido de náilon presos com elásticos de borracha, para contenção.

Os insetos foram alimentados duas vezes por semana com camundongo *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (Rodentia; Muridae), provenientes do ICTB/Fiocruz, que foram colocados dentro de redes confeccionados em náilon e inseridos no interior de cada colônia, de acordo com o protocolo do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) LW002/14. Todos os insetos que morreram foram separados em placas de Petri de vidro e mantidos em refrigerador, para as análises posteriores de morfometria geométrica, biologia molecular e hidrocarbonetos cuticulares.

Após as análises, os insetos foram alfinetados, identificados com etiquetas com nome da espécie, procedência (local de coleta) e depositados na coleção entomológica Herman Lent com seu devido número de identificação. Para cada espécime depositado foram confeccionadas fichas em triplicatas contendo informações detalhadas de coleta (município e localidade), nome da espécie, coletores, data, latitude e longitude, identificador e informações sobre o ambiente no qual foram encontrados (e.g ambiente rochoso, pedregais, etc).

3.5 Morfometria Geométrica

Para morfometria geométrica os espécimes adultos foram apoiados sobre massa de modelar plástica, para que suas partes ficassem em posição horizontal. As cabeças e asas (da posição esquerda), de todos os espécimes, foram fotografadas através de câmera digital Nikon Coolpix 990. As imagens foram transferidas para o computador onde, com o auxílio do software TPSdig (versão 2, Rohlf 2005), da série TPS (“*thin-platesplines*”), foram marcados os pontos de referência (*landmarks*) para melhor definir a forma (o contorno) da cabeça e das asas dos espécimes (Fig.12 e 13).

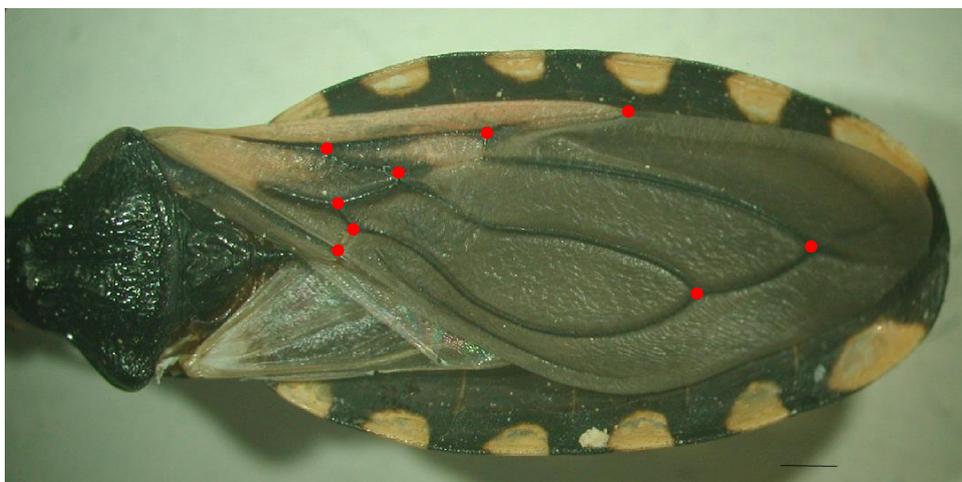


Figura 12. Asa de *Triatoma rubrovaria* mostrando os 9 pontos de referência (*landmarks*) marcados para cada espécime de *Triatoma*.



Figura 13. Cabeça de *Triatoma rubrovaria* mostrando os 15 pontos de referência (*landmarks*) marcados para todos os espécimes.

Utilizando o software TPSRelw (“*Thin plate spline relative warps analysis*”) foi feita uma análise da deformação relativa de placas delgadas para os cálculos dos

componentes uniformes X (esticamento ao longo do eixo X) e Y (dilatações ou compressões ao longo do eixo Y), tamanho centróide e obtenção da matriz numérica (matriz pesada – *weight matrix*) de formato NTS (*Numerical Taxonomic System*). A matriz consenso foi submetida a uma análise multivariada de componentes principais totais (ACPt) com a finalidade de observar a relação existente entre as diferentes espécies. A análise discriminante (AD) foi realizada a partir dos componentes principais derivados da ACPt, resultando em fatores discriminantes (FD) sobre a qual foi construído um mapa fatorial para visualização da variabilidade da conformação.

Por meio do programa TPSrelw, os pontos cartesianos foram submetidos à análise generalizada de procrustes (AGP), gerando uma matriz. Esta foi convertida em valores numéricos, seguindo-se a redução do número de variáveis e análise multivariada, que origina os componentes principais (CPs). Os componentes gerados a partir da análise dos componentes principais (ACP) foram utilizados na análise discriminante (AD) que, por sua vez, gerou fatores discriminantes (Canons). A partir do Canon um e Canon dois foi montado um mapa fatorial para visualizar a posição de cada espécie. Essas análises foram realizadas por meio do programa JMPpro 12, 2.1.0 (SAS). Para obtenção das placas delgadas, foi utilizado o programa TPSregr, permitindo uma visualização das diferenças entre a menor e a maior espécie. Foi realizado teste estatístico de Lambda de Wilks (λ *Lambda*) para avaliar diferenças multivariadas entre esses grupos.

3.6 Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs)

3.6.1 Extração dos HCs

Cento e cinquenta espécimes adultos (cinco *T. carcavalloi*, 36 *T. circummaculata*, 20 *T. pintodiasi* e 89 *T. rubrovaria*) foram previamente lavados com água destilada e separados individualmente em tubos de ensaio de vidro. Cada espécime foi imerso duas vezes seguidas (a primeira por 10min e a segunda por apenas 1 min) em solvente apolar (Hexano). Após cada imersão, o solvente foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro e passado em uma coluna de cromatografia rápida (Fig. 14 A). Esta coluna consistiu de uma pipeta Pasteur de vidro contendo lã de vidro (entre o corpo da pipeta e sua região mais afilada) (Fig.14 B) e dois terços do corpo da pipeta preenchidos com o adsorvente Florisil® (Florisil 60 a 100 mesh, Fischer-Chemicals) (Fig.14 C), para a separação dos HCs dos outros compostos lipídicos da epicutícula. Para evitar contaminação, foi utilizada uma coluna para cada amostra. Após a passagem pela coluna, o hexano contendo os HCs extraídos foi acondicionado em um frasco de vidro borossilicato (12 x 32 mm), identificado com o nome da espécie, e evaporado em uma cabine de exaustão química. Após o término da evaporação, os frascos foram hermeticamente fechados e alocados em um freezer a -24°C para posterior análise no cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM).

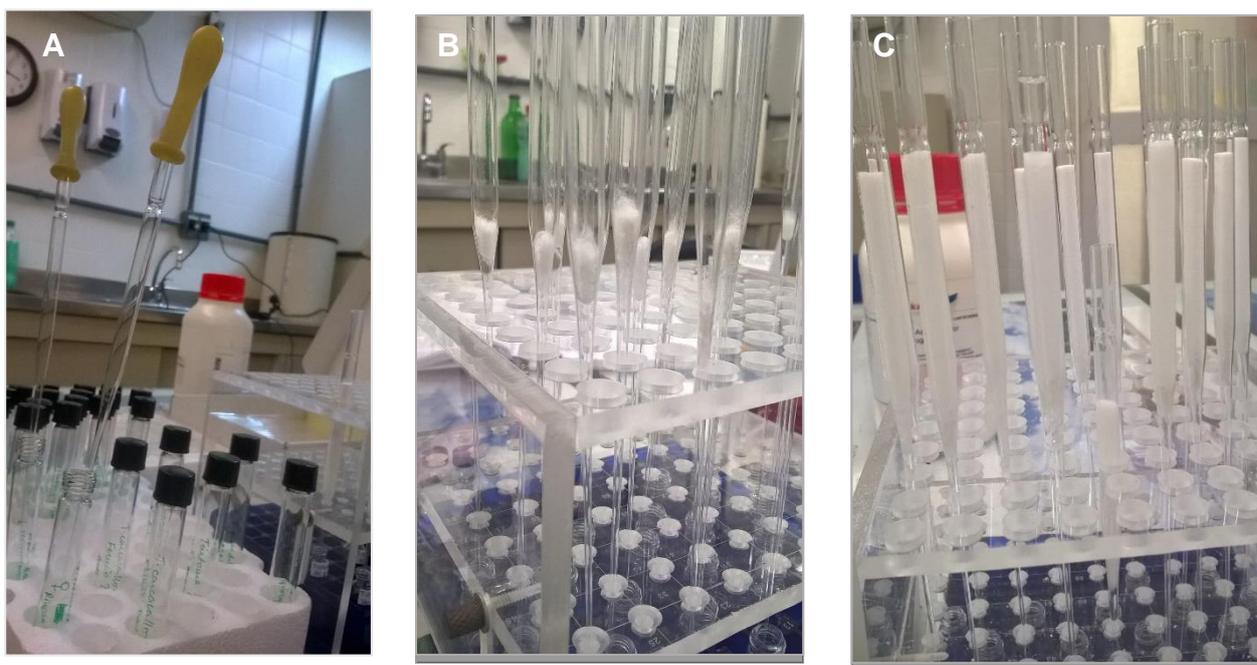


Figura 14. A) Tubos de ensaio contendo hexano; B) Coluna cromatográfica contendo lã de vidro e C) Coluna cromatográfica contendo lã de vidro e Florisil

3.6.2 Injeção das amostras no Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas.

Após a evaporação completa do hexano, os HCs foram ressuspensos com 250 μL de hexano, para liberar os HCs aderidos na parede interna dos frascos, com auxílio de uma microseringa de vidro Hamilton de 100 μL . Para análise das amostras em CG-EM, foram preparados novos frascos com identificação de cada amostra, e dentro de cada um foi inserido um *insert* de vidro de 250 μL da marca Agilent. Com auxílio de uma seringa de vidro foram transferidos 200 μL da ressuspensão dos extratos, e os 50 μL restantes foram armazenados para posterior utilização (caso fosse necessário).

As amostras foram injetadas em dois cromatógrafos a gás acoplados a espectrômetros de massas (CG-EM) Agilent 6890N-5973 Network GC-MS System em locais distintos (Fig.15). A primeira parte das amostras foi injetada no Setor de Química do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Reno, em Nevada, Estados Unidos, onde para cada amostra (frasco) foi utilizada uma alíquota de 5 μL que foi injetada na máquina de forma automática, modo splitless, usando uma coluna capilar DB-5 com 30m de comprimento, 0,50 mm de diâmetro e filme de 0,25 μm de espessura. A temperatura inicial do forno foi de 150 $^{\circ}\text{C}$ e aumentada até a temperatura final de 320 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. As temperaturas do injetor e do detector foram de 290 e 325 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente.



Figura 15. Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa (CG-EM - Plataforma Farmanguinhos, Fiocruz)

Plataforma de Métodos Analíticos - Espectrometria de Massas e Cromatografia de Farmanguinhos, Fiocruz, RJ. Utilizando a mesma metodologia, mas injetada em uma coluna capilar DB-5 com diâmetro menor (30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, e filme de 0,25 μ m de espessura) (Fig. 16).

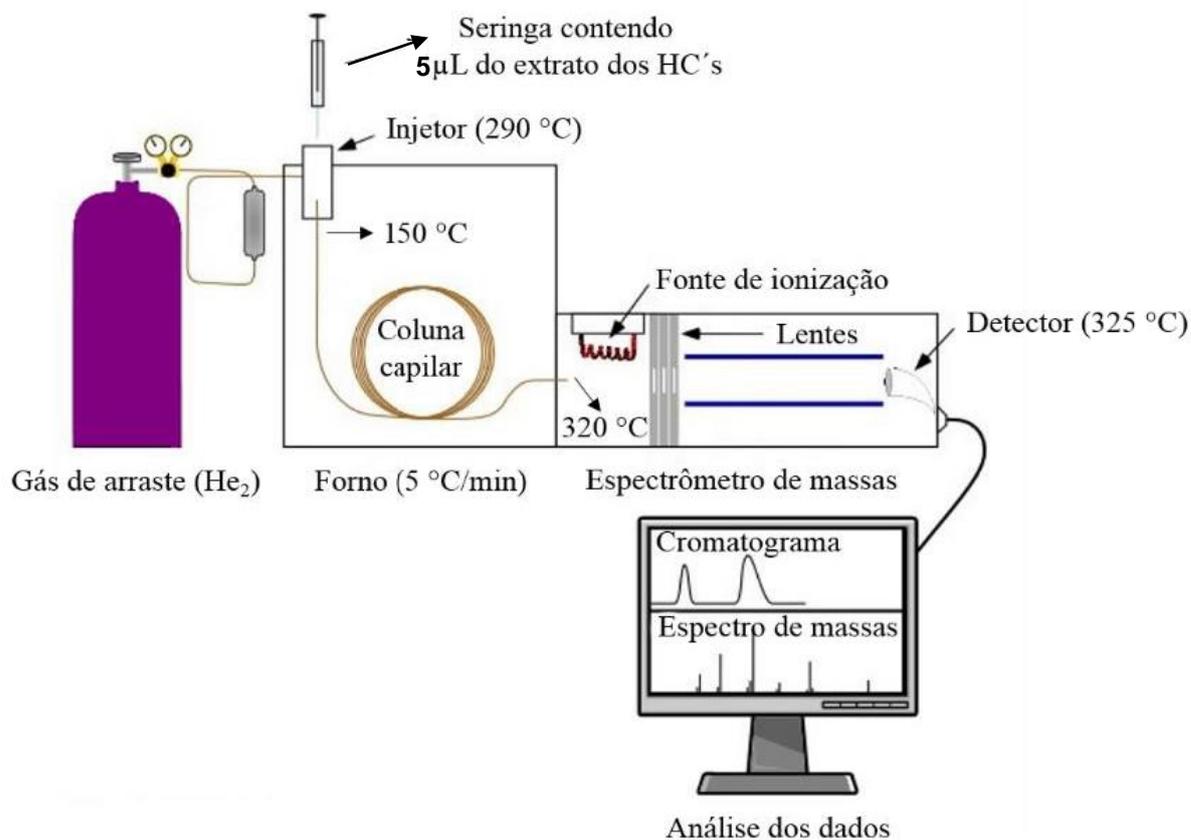


Figura 16. Esquema dos procedimentos pré-injeção no Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas

3.6.3 *Análise dos hidrocarbonetos cuticulares.*

Após as corridas, as amostras originaram cromatogramas que representam o perfil de HCs de cada espécime onde os compostos são representados por diferentes picos. Os compostos foram identificados a partir da interpretação dos espectros de massas (Fig.17) obtidos de cada pico como descrito anteriormente (Bagneres & Blomquist, 2010, Blomquist et al. 1987, Jackson e Blomquist, 1976).

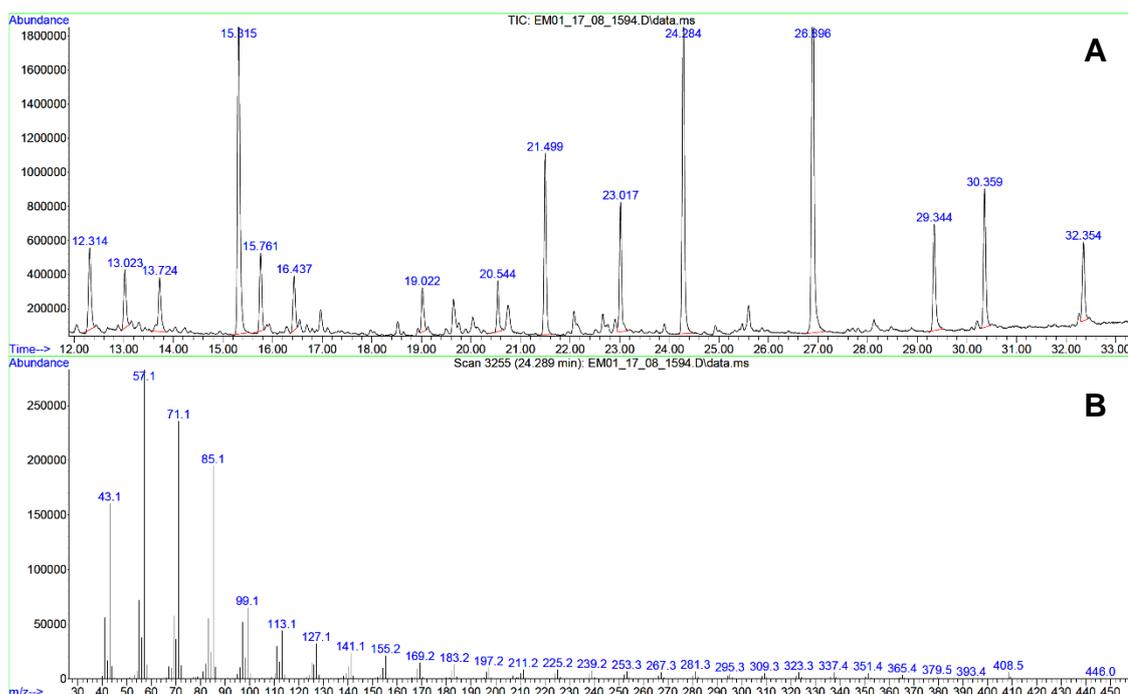


Figura 17. A) Cromatograma mostrando o perfil dos hidrocarbonetos cuticulares e B) Espectro do composto obtido em um dos picos.

A nomenclatura utilizada para listar os HCs foi Cxx para indicar o número total de carbonos na cadeia linear do composto; a localização dos grupamentos metil foi indicada como x-Me para monometil alcanos, x,y-DiMe para dimetil alcanos, x,y,z-TriMe para trimetil alcanos e w,x,y,z-TetraMe para tetrametil alcanos, quando um, dois, três ou quatro grupamentos metil estão localizados na molécula, respectivamente. Para alcenos, a nomenclatura foi Cxx:z com z indicando o número de duplas ligações na cadeia do composto (Braga et al. 2016).

Para a identificação dos Tamanhos Equivalentes de Cadeia (**TEC** – em inglês *Equivalent Chain Length ECL*) de cada composto presente no perfil, foi utilizado como base o cromatograma dos compostos “padrão” contendo o Tempo de Retenção (TR)

dos *n*-alcanos gerado a partir da análise da solução padrão (Alkane Standard Solution C21-C40 Marca SigmaAldrich). Após a identificação dos ***n*-alcanos** foi calculado o TEC de cada composto, utilizando a fórmula abaixo:

$$\text{TEC} = \frac{\text{TR } n\text{-alcano de maior cadeia} - \text{TR composto analisado}}{\text{TR } n\text{-alcano de maior cadeia} - \text{TR } n\text{-alcano de menor cadeia}}$$

Após a identificação dos compostos foram calculadas, individualmente, as abundâncias relativas de cada composto em todas as amostras. A partir desses valores foi calculado a média de cada composto para a descrição do perfil de cada espécie. Os compostos que apresentaram médias acima de 5% foram considerados majoritários para cada espécie.

3.6.4 ***Análise estatística***

Verificar se é possível diferenciar as espécies através os HCs foi feita uma análise de Cluster utilizando o Índice de Similaridade de Bray-Curtis, utilizando o software Past (version 2.17C) (Hammer et al. 2013)

3.7 Análise de DNA mitocondrial

3.7.1 *Extração, amplificação e sequenciamento de DNA*

DNA genômico foi extraído de uma ou duas pernas de cada espécime (40 *T. carcavalloji*, 40 *T. circummaculata*, 40 *T. klugii*, 40 *T. pintodiasi* e 70 *T. rubrovaria*) utilizando o kit Qiagen® Blood and Tissue, seguindo as recomendações do fabricante para isolamento do material genético de tecido animal.

Neste estudo foi utilizado o marcador molecular mitocondrial citocromo b (Cytb). Para amplificação (PCR) da região de interesse. Foi utilizado o par de iniciadores descrito por Monteiro et al. (2003), nas seguintes condições: 94°C (por 5 min), seguido de 35 ciclos a 94°C (por 45 seg), 48°C (por 30 seg), e 72°C (por 45 seg), e uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%), corados com Brometo de etídio e visualizados em um transiluminador ultra-violeta. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *GFX™ PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare), para posterior sequenciamento de ambas as fitas (senso e anti-senso), utilizando o kit ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) e os mesmos iniciadores da reação de PCR. As reações foram submetidas a 30 ciclos nas seguintes temperaturas: 96°C (por 10 seg), 45-51°C (por 5 seg) e 60°C (por 4 min). Os produtos dessa reação foram purificados e sequenciados na Plataforma de sequenciamento de DNA PDTIS-FIOCRUZ.

3.7.2 *Edição*

Todas as sequências geradas foram editadas individualmente com a utilização dos programas SeqMan Lasergene versão 7.0 (DNASStar, Inc.) e MEGA versão 5.0 (Tamura et al. 2011). Posteriormente as sequências foram alinhadas utilizando os programas ClustalW, disponível no programa MEGA versão 5.0.

As distancias par-a-par foram calculadas e plotadas utilizando o pacote APE (*Analysis of Phylogenetics and Evolution*) (Paradis & Claude 2004) no R, Versão 3.4 (R Development Core Team, 2008), utilizando o script disponível em <https://tinyurl.com/y8zpck3p> (Anexo I).

Para a reconstrução da rede de haplótipos foi utilizado o método de parcimônia, através do algoritmo do TCS (Young 2000) implementado no programa PopArt (<https://popart.otago.ac.nz>). A distribuição dos haplótipos também foi visualizada no PopArt.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação dos Triatomíneos

Os espécimes foram coletados em diferentes municípios localizados na região central do Rio Grande do Sul. Região não apresenta muitas barreiras geográficas, planície com pouco relevo e vegetação característica (Fig. 18 A). Locais de coleta formado por amontado de rochas (Fig. 18 B) ou cerca de pedras característicos da região onde foram coletados espécimes de *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* (Fig 19 A - B).

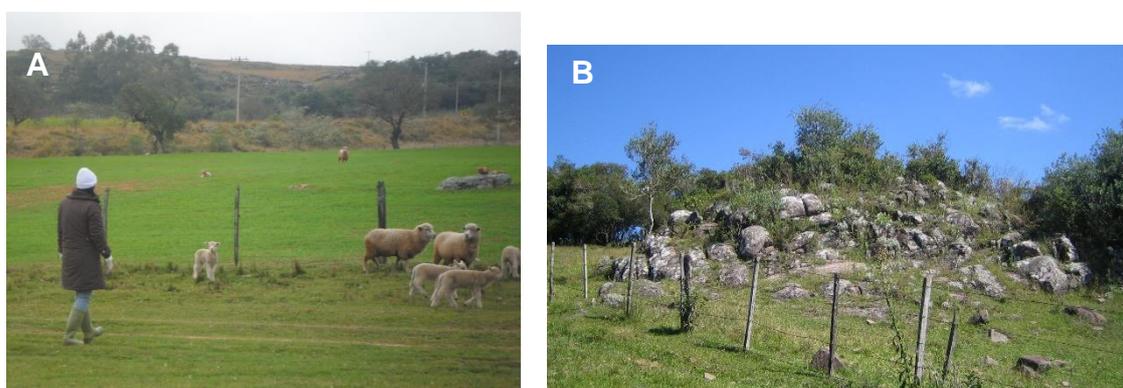


Figura 18. A) Relevo e vegetação característica da região central do Rio Grande do Sul e B) Amontado de rochas onde foram coletados os espécimes

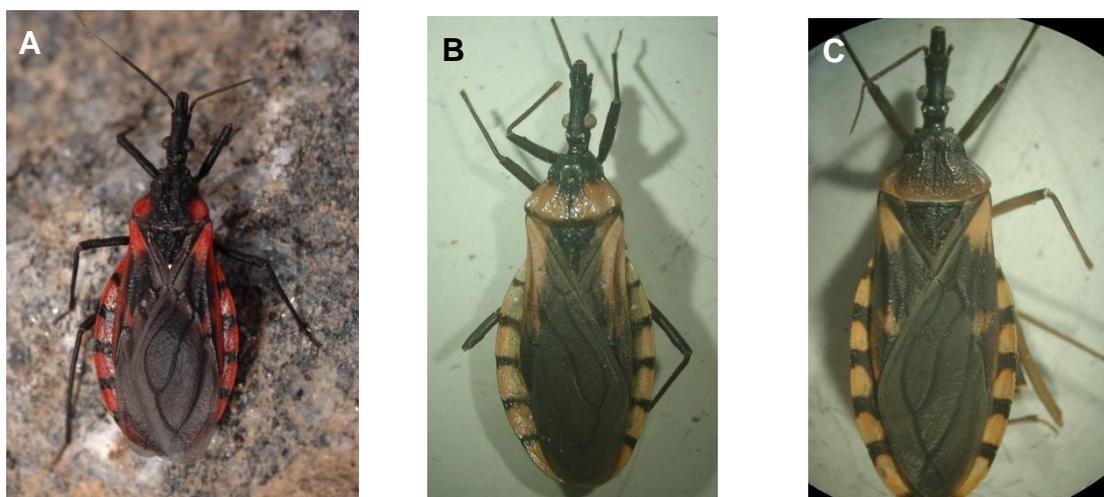


Figura 19;. Espécimes de triatomíneos coletados na região. A) *T. rubrovaria*, B) *T. pintodiasi* e C) *T. circummaculata*

Foram coletadas no total 1246 ninfas, em diferentes meses e condições climáticas (períodos secos, úmidos, inverno, verão, etc.), por meio de busca ativa (manual) em ambiente ruderal. Os espécimes foram encontrados sempre debaixo de rochas, ou em cercas de pedra (ao longo das estradas) (Fig.20 A). Em nenhum dos pontos foi possível encontrar espécimes adultos, apenas imaturos em diferentes estádios de desenvolvimento (Fig. 20 B e C).

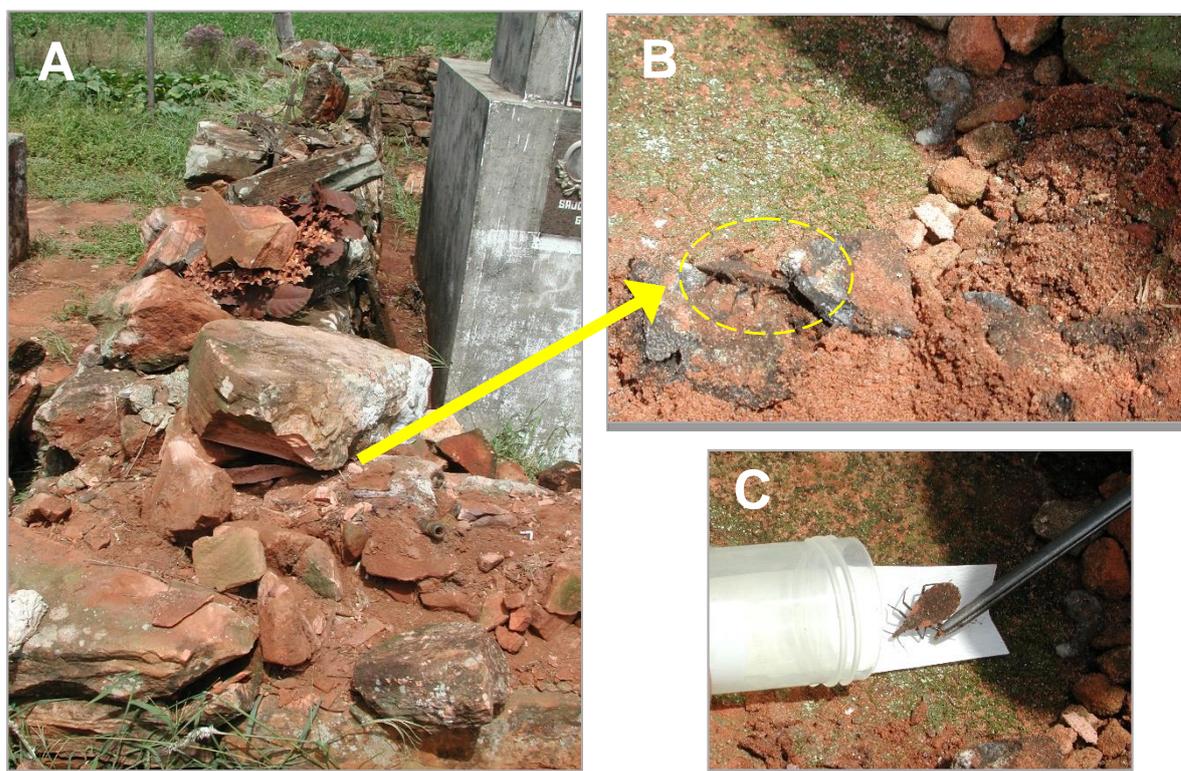


Figura 20. A) Cerca de pedra, B) Ninfa de triatomíneos encontrada nas cercas e C) Coleta e acondicionamento do espécime.

As ninfas foram enviadas para o insetário do LNIRTT, onde foram mantidos em temperatura ambiente e alimentadas em sangue de camundongo (*Mus musculus*) semanalmente segundo protocolo CEUA LW002/14. Os espécimes que atingiram a fase adulta foram identificados, ou tiveram sua identificação confirmada, por meio da chave dicotômica de Galvão & Dale (2014) como sendo das espécies *T. rubrovaria* (56%); *T. circummaculata* (32%) e *T. pintodiasi* (12%). Também foram separados casais de acordo com o padrão cromático (e.g. pronoto preto – macho e fêmea; pronoto preto com duas manchas vermelhas – macho e fêmea), para a observação das ninfas (novas proles) e formação de novas colônias.

Em nenhum dos municípios estudados foi encontrado *T. carvalhoi*.

4.2 Polimorfismo cromático das espécies do Estado do Rio Grande do Sul

Espécies do Rio Grande do Sul apresentam em sua descrição uma clara separação morfológica, não só devido à diferença nos tamanhos, mas como nos seus caracteres diagnósticos bem definidos e específicos. Porém, observando espécimes recém-coletados de *T. rubrovaria*, foram observadas a presença de caracteres diferentes de sua descrição original, como tamanho do corpo, largura dos conexivos e principalmente o padrão cromático do pronoto e corpo. O mesmo foi notado para *T. circummaculata* e para espécie *T. pintodiasi*.

Para tentar esclarecer essa dúvida, foi feita uma vasta observação e foi constatado um polimorfismo cromático muito maior que os descritos na literatura até hoje, tanto para *T. rubrovaria* quanto para *T. circummaculata*, bem como para *T. pintodiasi*, conforme detalhado a seguir.

A) *Triatoma rubrovaria*

Foram analisados um total de 443 espécimes, com uma extensa variação cromática no pronoto, asas e conexivos. Os espécimes apresentaram pronoto variando do castanho ao preto, apresentando (ou não) manchas lobo anterior variando do castanho ao preto, lobo posterior apresentando um padrão cromático variado que vai do amarelo-alaranjado ao vermelho (Fig.21). Colar apresentando ângulos anterolaterais muitas vezes totalmente negro, e algumas vezes podendo variar do laranja ao vermelho (Fig.22).



Figura 21. Pronoto de *Triatoma rubrovaria* com padrão cromático apresentando duas manchas com diferentes padrões cromáticos: A) laranja ; B) amarelo-alaranjado e C) vermelho

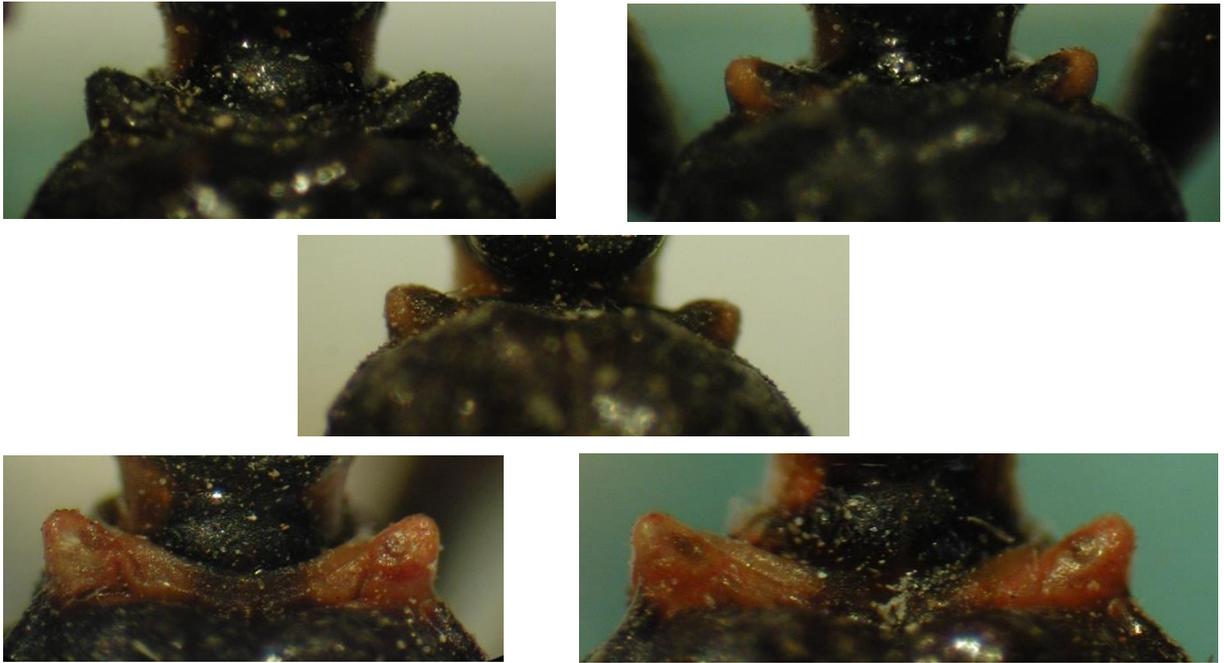


Figura 22. Colar de *Triatoma rubrovaria* apresentando ângulos anterolaterais variando do negro ao vermelho.

Foram observados os diferentes padrões de pronoto já descritos na literatura. A exceção foram os padrões descritos para espécie tipo que apresenta em sua característica pronoto com ângulos posteriores com manchas vermelhas que se prolongam até o lobo posterior. Também não foi observado nenhum espécime com colar totalmente vermelho, somente manchas grandes ocupando dois terços do colar ou apenas nos ângulos anterolaterais. Apenas um espécime apresentou lobo anterior preto e posterior totalmente vermelho, os demais que apresentaram lobo posterior vermelho também tinham as carenas e linhas medianas mais escuras formando diferentes desenhos (Tabela 1).

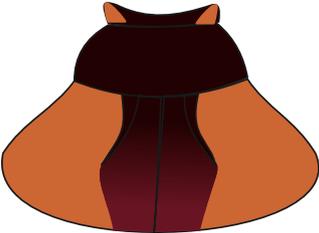
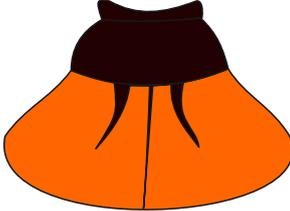
Até o momento foram encontrados 16 novos polimorfismos cromáticos, e foi constatado que o padrão “pronoto totalmente preto”, considerado como o mais raro, foi o mais encontrado em todas os municípios estudados (Tabela 2). Além da variação cromática do pronoto, observamos uma grande alteração da coloração desses insetos, foram encontrados espécimes de coloração amarela e laranja, principalmente nas localidades de Lavras do Sul, Vila Nova do Sul e Caçapava do Sul, e espécimes com mistura de cores como asas laranjas, pronoto totalmente negro e conexivos amarelos (Fig.23), também foram observadas cores rosadas para algumas asas.

Todas as ninfas apresentaram o mesmo padrão de manchas.



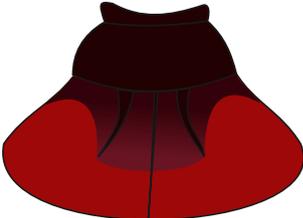
Figura 23. Espécimes de *Triatoma rubrovaria* apresentando cor das asas diferente da cor dos conexivos.

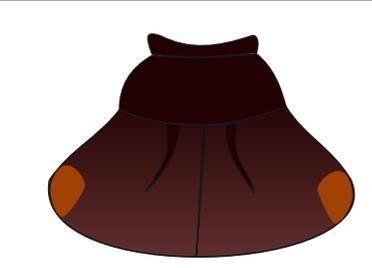
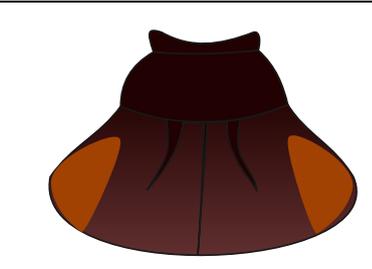
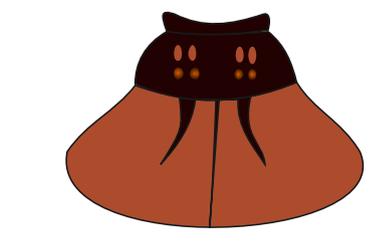
Tabela 1. Foto e desenho esquemático dos padrões cromáticos de *T. rubrovaria* já descritos na literatura, com descrição, autor e ano.

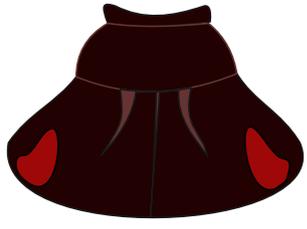
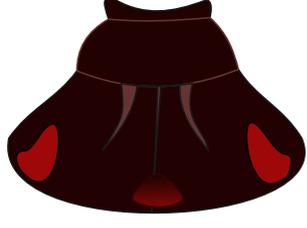
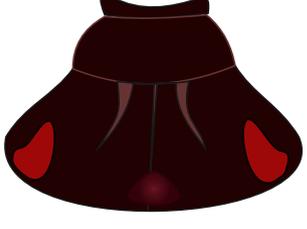
Padrão cromático descrito na literatura	Descrição do pronoto	Referências
 	<p>Lobo posterior vermelho lateral e posteriormente. Lobo anterior preto, cujo colorido se prolonga, medianamente, para o lobo posterior em forma de tridente.</p>	<p>Herrich-Schaeffer (1848)</p>
 	<p>Collar com 1+1 manchas nos ângulos anterolaterais. Lobo posterior enegrecido entre as carenas.</p>	<p>Stål (1859) Pinto (1925) Lent & Wygodzinsky (1979)</p>
 	<p>Lobo posterior vermelho exceto as carenas que são negras.</p>	<p>Stål (1859) Lent & Wygodzinsky (1979)</p>
 	<p>Collar com 1+1 manchas nos ângulos anterolaterais. Lobo posterior vermelho com as carenas e sulcos medianos negros</p>	<p>Lent (1942)</p>

		<p>Colar com 1+1 manchas nos ângulos anterolaterais. Lobo posterior vermelho com pequena região entre as carenas negras</p>	<p>Lent (1942) Lent & Wygodzinsky (1979)</p>
		<p>Mancha negra pode se alargar de forma que o colorido vermelho fique visível somente na região dos ângulos posteriores.</p>	<p>Lent (1942) Lent & Wygodzinsky (1979)</p>
		<p>Totalmente negro.</p>	<p>Lent & Wygodzinsky (1979)</p>
		<p>Colar com 1+1 manchas nos ângulos anterolaterais. Lobo posterior com mancha negra pode se alargar de forma que o colorido vermelho fique visível somente na região dos ângulos posteriores.</p>	<p>Lent & Wygodzinsky (1979)</p>

Tabela 2. Foto e desenho esquemáticos dos novos padrões cromáticos encontrados em espécimes de *T. rubrovaria* do Estado do Rio Grande do Sul

Novo Padrão cromático encontrado	Descrição
 	<p>Lobo posterior castanho escuro com exceção da carena, dos ângulos posteriores e bordo lateral.</p>
 	<p>Lobo posterior predominantemente castanho escuro com exceção do bordo inferior.</p>
 	<p>Lobo posterior castanho escuro com 1+1 pequenas manchas nos ângulos humerais e porção inferior da linha mediana entre as carenas.</p>
 	<p>Lobo posterior vermelho com exceção das carenas bordo superior do pronoto.</p>
 	<p>Colar com 1+1 manchas nos ângulos anterolaterais. Lobo posterior castanho escuro com 1 + 1 manchas nos ângulos humerais.</p>
 	<p>Lobo posterior predominantemente castanho escuro com exceção do bordo inferior que apresenta mancha vermelha larga.</p>

		<p>Mancha negra pode se alargar de forma que o colorido vermelho fique visível somente na região do bordo inferior e ângulos humerais.</p>
		<p>Lobo posterior predominantemente castanho escuro com 1+1 manchas quase imperceptíveis nos ângulos posteriores.</p>
		<p>Lobo posterior predominantemente castanho escuro com 1+1 manchas quase imperceptíveis nos ângulos posteriores.</p>
		<p>Lobo posterior predominantemente castanho escuro com 1+1 manchas nos ângulos humerais.</p>
		<p>Lobo posterior predominantemente castanho escuro com 1+1 manchas nos ângulos humerais.</p>
		<p>Lobo anterior castanho com 4+4 manchas. Lobo posterior predominantemente laranja com exceção das carenas e linha mediana.</p>

		<p>Lobo posterior predominantemente negro com 1+1 manchas vermelhas nos ângulos humerais.</p>
		<p>Lobo posterior predominantemente negro com 1+1 manchas vermelhas nos ângulos humerais.</p>
		<p>Lobo posterior predominantemente negro com uma mancha na porção final da linha mediana e 1+1 manchas vermelhas nos ângulos humerais.</p>
		<p>Lobo posterior predominantemente negro com uma mancha na porção final da linha mediana e 1+1 manchas vermelhas nos ângulos humerais.</p>

B) *Triatoma circummaculata*

Apresentou como característica pronoto com o lobo anterior variando do castanho ao preto, lobo posterior apresentando um padrão cromático variado que vai do totalmente negro ao vermelho (Fig.24) (Tabela 3). Colar variando do castanho ao preto sem manchas laterais.

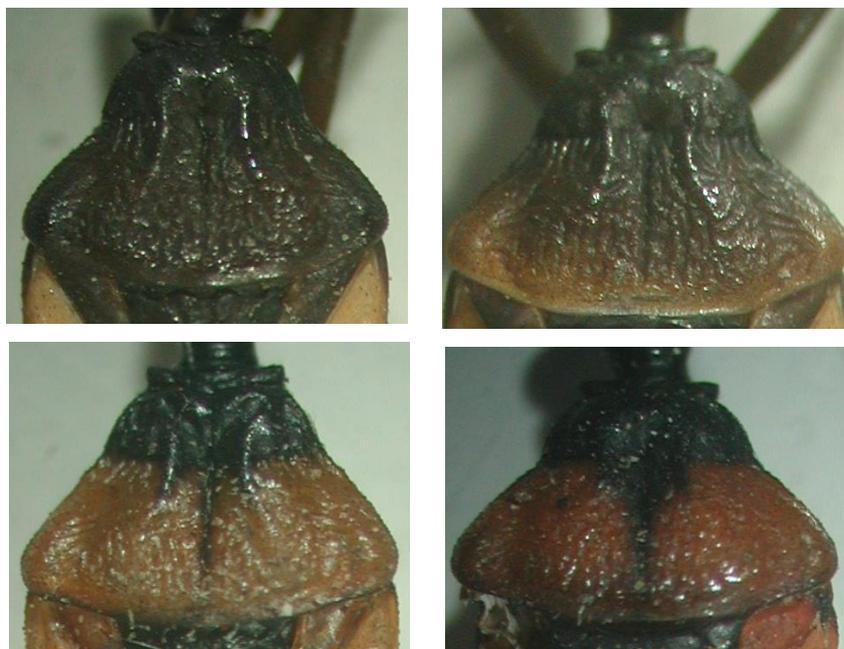


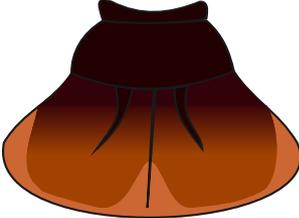
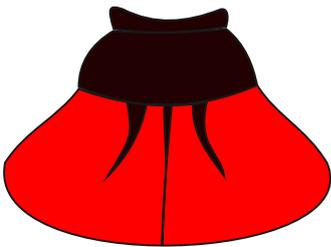
Figura 24. Lobo posterior do pronoto de *Triatoma circummaculata* apresentando padrão cromático variando do totalmente negro ao vermelho.

Dos 306 espécimes analisados o padrão pronoto com lobo anterior preto e lobo posterior vermelho foi o mais encontrado, cerca de 53% da amostragem total. O segundo padrão mais observado foi o pronoto totalmente preto (28%), o padrão com manchas no lobo posterior foi pouco observado (19%). O polimorfismo cromático do pronoto desta espécie variou menos do que em *T. rubrovaria*, mas também foram observados espécimes que apresentaram coloração amarela e laranja em seus conexivos. Analisando os espécimes de *T. circummaculata* coletados em campo e os depositados na coleção do AMNH-NY com os espécimes depositado no Museu de História Natural de Berlim, podemos observar que morfologicamente eles são muito próximos, mas seus padrões cromáticos de pronoto e conexivo (amarelos e laranjas) (Fig. 25) são muito distintos da série tipo proveniente do Uruguai (vermelho).



Figura 25. Espécimes de *Triatoma circummaculata* apresentando padrões cromáticos de conexivo diferentes: A) laranja; B) laranja-amarelado; C) amarelo e D) amarelo.

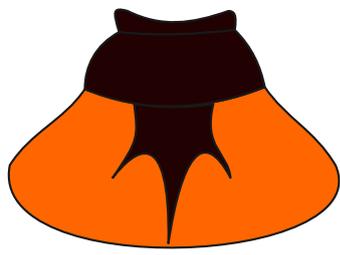
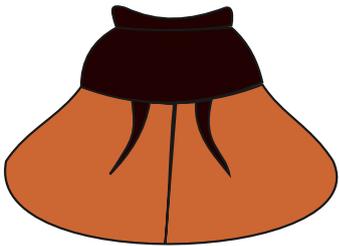
Tabela 3. Foto e desenho esquemáticos dos novos padrões cromáticos encontrados em espécimes de *T. circummaculata* do Estado do Rio Grande do Sul.

Padrão cromático encontrado	Descrição do pronoto
 	<p>Totalmente negro</p>
 	<p>Mancha negra pode se alargar de forma que o colorido vermelho fique visível somente na região do bordo inferior e ângulos humerais.</p>
 	<p>Lobo posterior vermelho com as carenas e sulcos medianos negros</p>
 	<p>Lobo posterior vermelho exceto as carenas que são negras.</p>

C) *Triatoma pintodiasi*

Foram observados 35 espécimes, e grande parte apresentava características um pouco diferentes da sua descrição. O padrão de pronoto mais encontrado foi o lobo anterior preto e posterior laranja, porém também foi observado que o lobo posterior poderia apresentar as variações nas manchas do lobo posterior. (Tabela 3)

Tabela 4. Foto e desenho esquemáticos dos novos padrões cromáticos encontrados em espécimes de *T. pintodiasi* do Estado do Rio Grande do Sul

Padrão cromático encontrado	Descrição
 	Lobo posterior laranja com mancha castanho escuro cujo colorido se prolonga quase em forma de tridente.
 	Lobo posterior laranja exceto as carenas que são negras.

4.3 Morfometria Geométrica

Para a análise foram utilizados 477 espécimes adultos sendo, 201 de *T. rubrovaria*, 10 e *T. carcavalloi*, 113 de *T. circummaculata*, 136 de *T. pintodiasi*, 10 de *T. infestans* e 10 de *T. klugi*.

4.3.1 Morfometria geométrica de asas.

O teste de Kruskal-Wallis para análise da variação de tamanho das asas revelou diferenças significativas ($p < 0,001$) entre as espécies. Os resultados da Análise dos Componentes Principais (ACP – transformação de coordenadas) das asas, considerando somente os autovalores (eigenvalues) maiores que 1, mostraram que a somatória dos valores do primeiro (CP1) e do segundo (CP2) componentes principais equivalem a 72,10% da variabilidade total da forma (CP1= 63,04% e CP2= 9,06%).

O mapa fatorial da análise discriminante das asas (Fig.26) com a distribuição de cada espécie (representada por círculos), mostra que não existe uma clara separação entre as espécies *T. rubrovaria*, *T. pintodiasi* e *T. circummaculata*, e sim um solapamento entre estas.

A análise de cluster usando a distância de Mahalanobis (Fig.27), gerou um dendograma mostrando a proximidade de *T. rubrovaria* com *T. circummaculata* (proveniente de coletas recentes no RS), este grupo aparece como grupo irmão de *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* formando um único Clado A. Este clado aparece próximo ao clado que mostra as espécies *T. carcavalloi* relacionada a *T. rubrovaria* (que encontra-se depositado na coleção do Museu de História Natural de Berlim), estas espécies próximas a *T. klugi* formando o Clado B. *T. circummaculata* (holótipo) aparece como um grupo externo nesta análise.

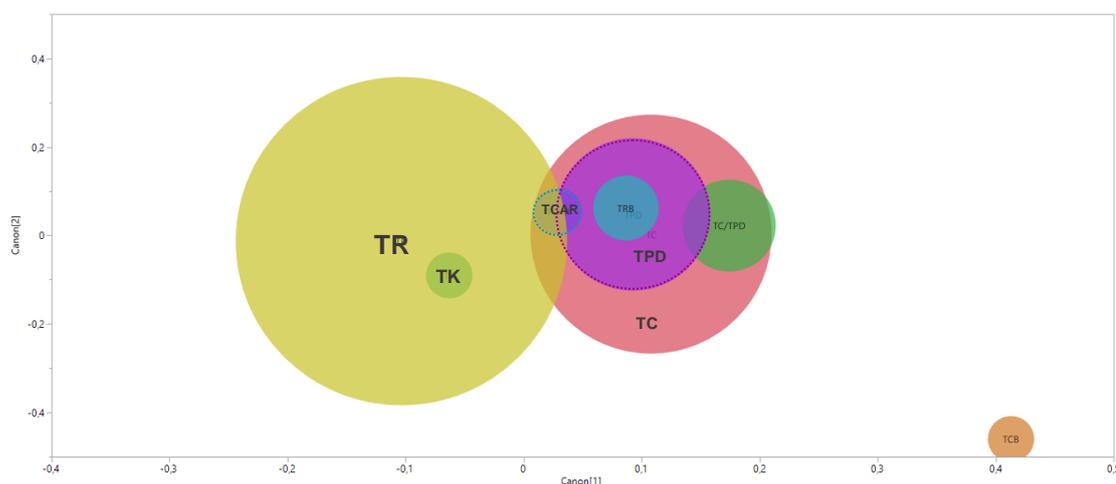


Figura 26. Mapa fatorial da análise discriminante com a distribuição de cada espécie. TR: *Triatoma rubrovaria*; TK: *Triatoma klugi*; TCAR: *Triatoma carcavalloii*; TRB: *Triatoma rubrovaria* série Berlim; TPD: *Triatoma pintodiasi*; TC: *Triatoma circummaculata* brasileiro; TC/TPD: *Triatoma pintodiasi* com algumas características de *Triatoma circummaculata*; TCB: *Triatoma circummaculata* holótipo série Berlim

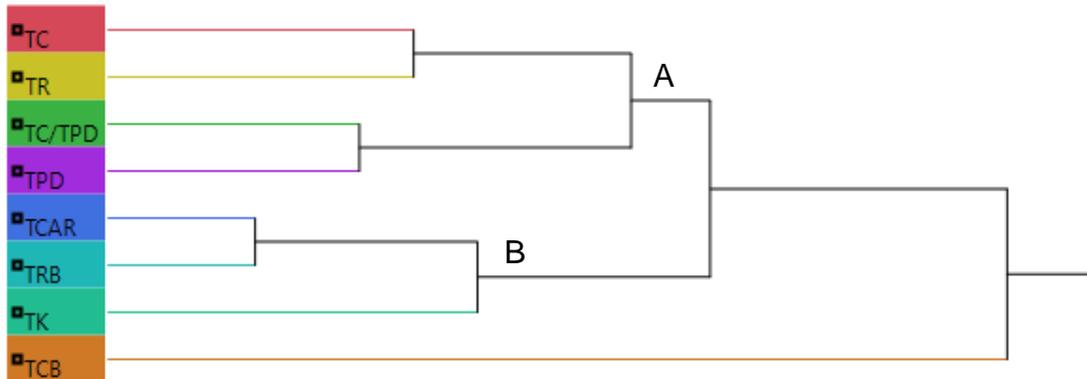


Figura 27. Análise de cluster. TR: *Triatoma rubrovaria*; TK: *Triatoma klugi*; TCAR: *Triatoma carcavalloii*; TRB: *Triatoma rubrovaria* série Berlim; TPD: *Triatoma pintodiasi*; TC: *Triatoma circummaculata* brasileiro; TC/TPD: *Triatoma pintodiasi* com algumas características de *Triatoma circummaculata*; TCB: *Triatoma circummaculata* holótipo série Berlim

4.3.2 Morfometria geométrica de cabeças

Na tentativa de elucidar melhor o resultado da morfometria geométrica das asas, foi feita uma análise discriminante utilizando a morfometria geométrica das cabeças desse grupo. Observando a morfologia das cabeças foi possível separar espécies *T. rubrovaria* e *T. circummaculata*.

Os resultados exibidos no mapa fatorial (Fig.28) mostram que a espécie *T. carcavalloii* está bem estabelecida como espécie, uma vez que não vemos uma sobreposição com outras espécies. Diferente de *T. klugi* e *T. rubrovaria*, que assim como na morfometria geométrica das asas, apresentam uma sobreposição bem clara.

A análise de cluster (Fig.29), usando as distâncias de Mahalanobis entre as espécies, gerou um dendrograma que mostra a proximidade de *T. rubrovaria* com seu lectótipo, e distante dos demais espécimes depositados na coleção de Berlim. *T. circummaculata* (brasileiro), aparece próximo de *T. pintodiasi* porém distante de seu holótipo.

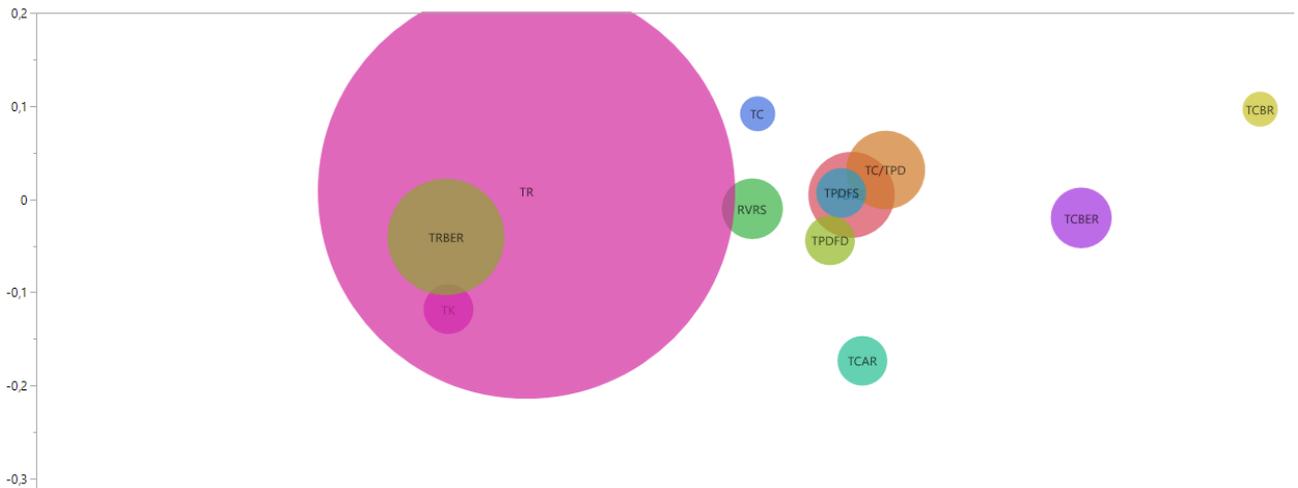


Figura 28. Mapa fatorial mostrando a morfometria geométrica das cabeças. TR: *Triatoma rubrovaria*; TK: *Triatoma klugi*; TCAR: *Triatoma carcavalloii*; TRBer: *Triatoma rubrovaria* série Berlim; TPD: *Triatoma pintodiasi*; TPDFD: *Triatoma pintodiasi* de Fernão Dias TC: *Triatoma circummaculata* brasileira; TC/TPD: *Triatoma pintodiasi* com algumas características de *Triatoma circummaculata*; TCB: *Triatoma circummaculata* holótipo série Berlim; TCB: *Triatoma circummaculata* coleção IOC; RVRS: *Triatoma rubrovaria* de Santa Maria.

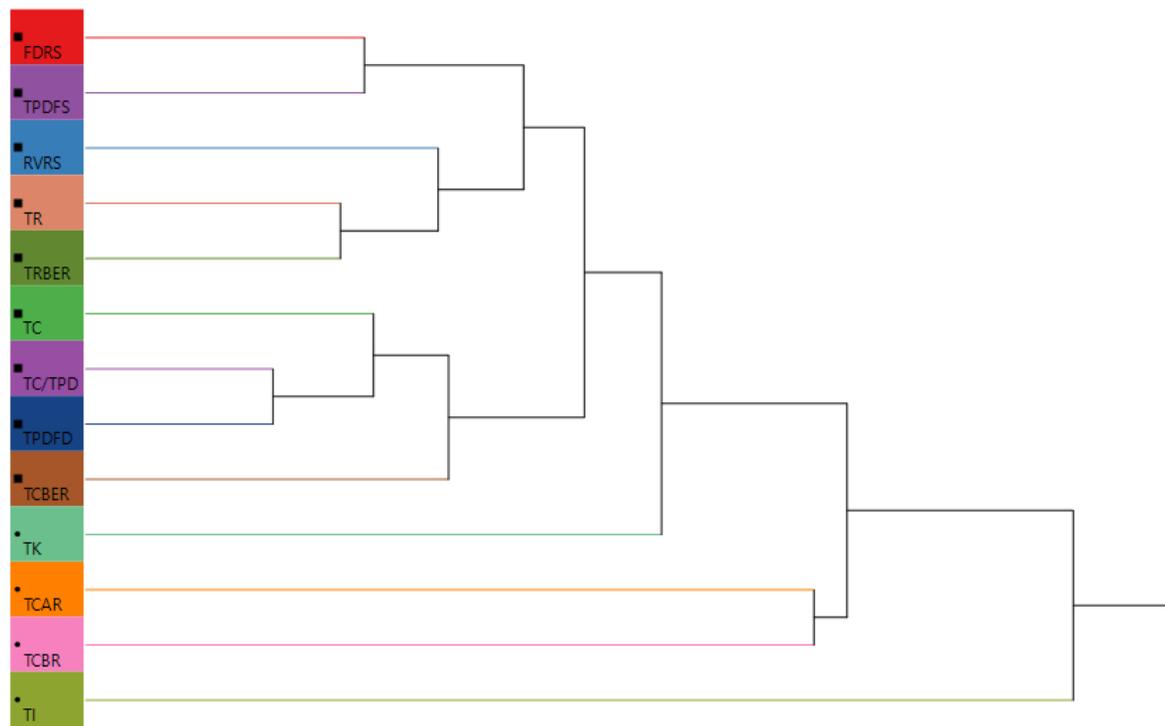


Figura 29. Análise de Cluster utilizando a conformação das cabeças dos espécimes do Rio Grande do Sul. TI: *Triatoma infestans*; TR: *Triatoma rubrovaria*; TK: *Triatoma klugi*; TCAR: *Triatoma carcavalloii*; TRB: *Triatoma rubrovaria* série Berlim; TPD: *Triatoma pintodiasi*; TPDFD: *Triatoma pintodiasi* de Fernão Dias TC: *Triatoma circummaculata* brasileira; TC/TPD: *Triatoma pintodiasi* com algumas características de *Triatoma circummaculata*; TCB: *Triatoma circummaculata* holótipo série Berlim; TCB: *Triatoma circummaculata* coleção IOC; FDRS: *Triatoma pintodiasi* Fernão Dias com características diferentes; RVRS: *Triatoma rubrovaria* de Santa Maria.

4.4 Hidrocarbonetos Cuticulares

Nas análises abaixo foram identificados os HCs das seguintes classes: *n*-alcano, alceno e mono-, di-, tri- e tetrametil alcanos. A diferença no diâmetro das colunas não interferiu nos resultados. Em alguns picos dois ou mais isômeros eluíram juntos e nesses casos a abundância relativa não pode ser individualizada para cada composto.

4.4.1 *Triatoma rubrovaria*

As amostras foram separadas pelas cores predominantes dos conexivos – vermelho, amarelo, laranja e rosa – apresentando os seguintes resultados:

A - Padrão cromático VERMELHO:

Foram identificados 69 compostos, com cadeia linear variando entre 21 e 42 carbonos (Anexo II). Destes, podemos destacar os *n*-alcanos nonacosano (*n*-C29) e hentriacontano (*n*-C31), 5,13-dimetil henicosano, os alcenos tricoseno e esqualeno (C30:6) e 15,19,25-trimetil nonatriacontano, que estavam presentes com abundância relativa acima de 5%, sendo considerados os compostos majoritários para esta espécie (Fig.30)..

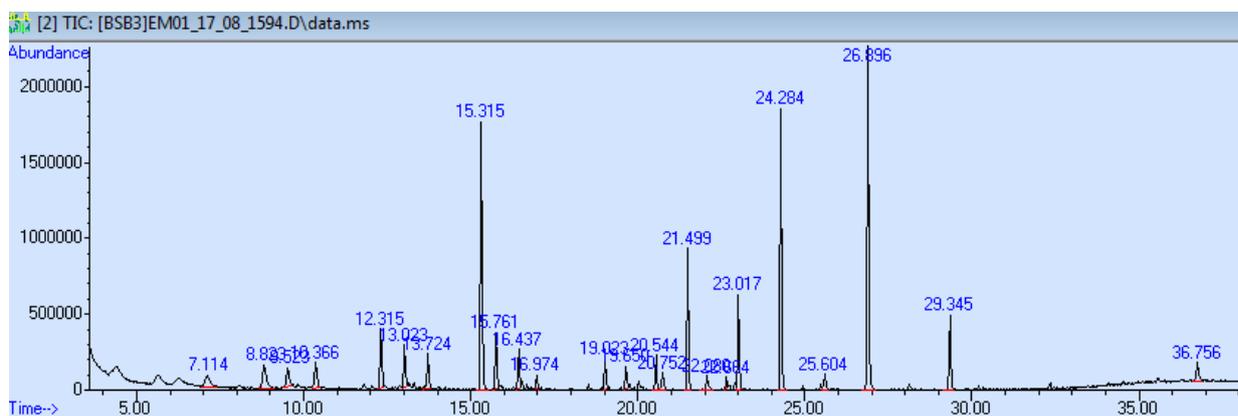


Figura 30. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de *Triatoma rubrovaria* padrão cromático vermelho.

B - Padrão cromático AMARELO:

Foram identificados 21 compostos, com cadeia linear variando entre 21 e 39 carbonos. Destes, podemos destacar os *n*-alcanostricosano (*n*-C23), nonacosano (*n*-C29), hentriacontano (*n*-C31) e tritriacontano (*n*-C33) que estavam presentes com abundância relativa acima de 5%, sendo considerados os compostos majoritários para esta espécie. Além destes compostos apenas o alceno esqualeno, os isômeros de 13,17,25-,15,19,25-,15,19,27-trimetil heptatriacontano e 3-metilhentriacontano apareceram em todas as amostras, porém somente o esqualeno apresentou abundância relativa acima de 5% (Fig.31)

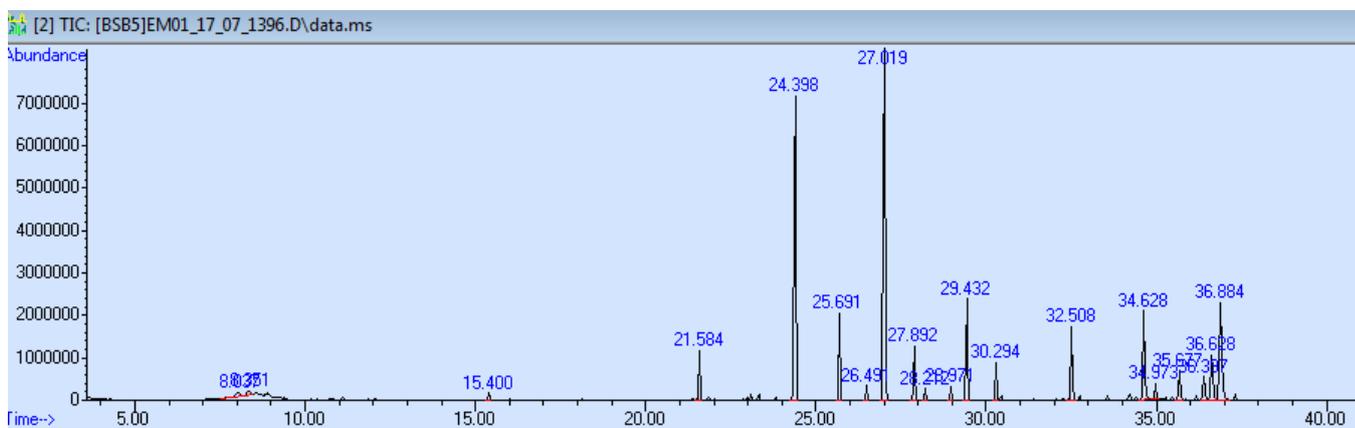


Figura 31. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de *Triatoma rubrovaria* padrão cromático amarelo.

C - Padrão cromático LARANJA:

Foram identificados oito compostos, com cadeia linear variando entre 21 e 39 carbonos. Destes, podemos destacar os *n*-alcanos tricosano (*n*-C23), nonacosano (*n*-C29), hentriacontano (*n*-C31) e hexatriacontano (*n*-C36) que estavam presentes com abundância relativa acima de 5%, sendo considerados os compostos majoritários para esta espécie. Além destes compostos 13,19-dimetil heptatriacontano e 15,19,25-trimetil heptatriacontano e apareceram em uma das amostras com abundância relativa acima de 5% (Fig.32)

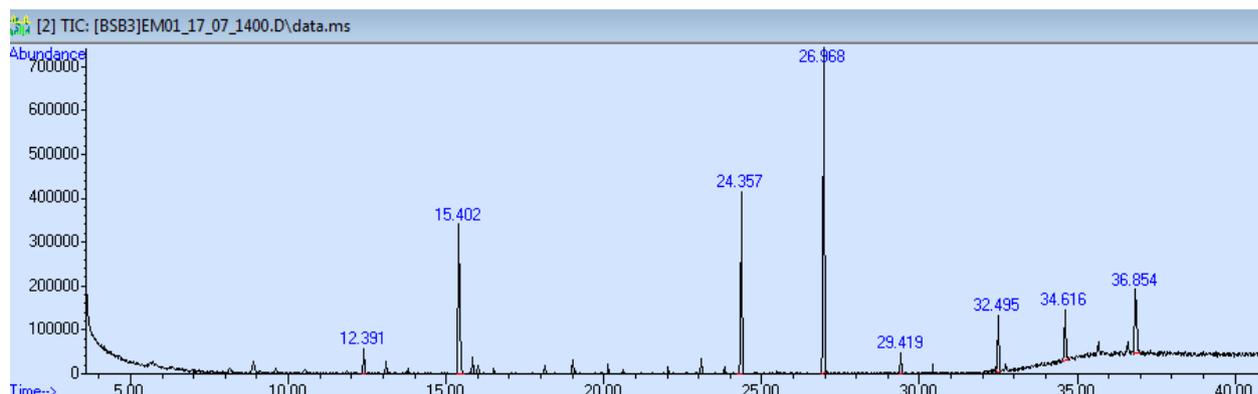


Figura 32. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de *Triatoma rubrovaria* padrão cromático laranja.

D - Padrão cromático ROSA:

Foram identificados 13 compostos, com cadeia linear variando entre 21 e 39 carbonos. Destes, podemos destacar os *n*-alcanos heptacosano (*n*-C27), nonacosano (*n*-C29), hentriacontano (*n*-C31) e tritriacontano (*n*-C33) que estavam presentes com abundância relativa acima de 5%, sendo considerados os compostos majoritários para esta espécie. Nenhum outro composto com abundância relativa acima de 5% foi observado para esta amostra (Fig.33).

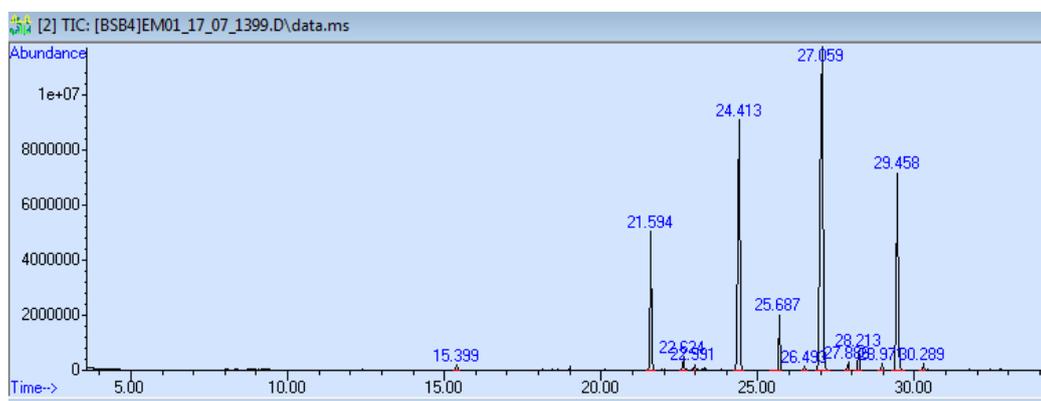


Figura 33. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de *Triatoma rubrovaria* padrão cromático rosa.

Lectótipo de *T. rubrovaria*:

Pela primeira vez foi analisada a perna de um espécime preservado há mais de um século em coleção (data de depósito de 1859). No seu cromatograma foram identificados 14 compostos de cadeia linear variando entre 21 e 29 carbonos. Destes, podemos destacar os dois alcenos o tricoseno (C23:1) e o esqualeno, sendo que este último apresentou abundância relativa de 20% (Fig.34).

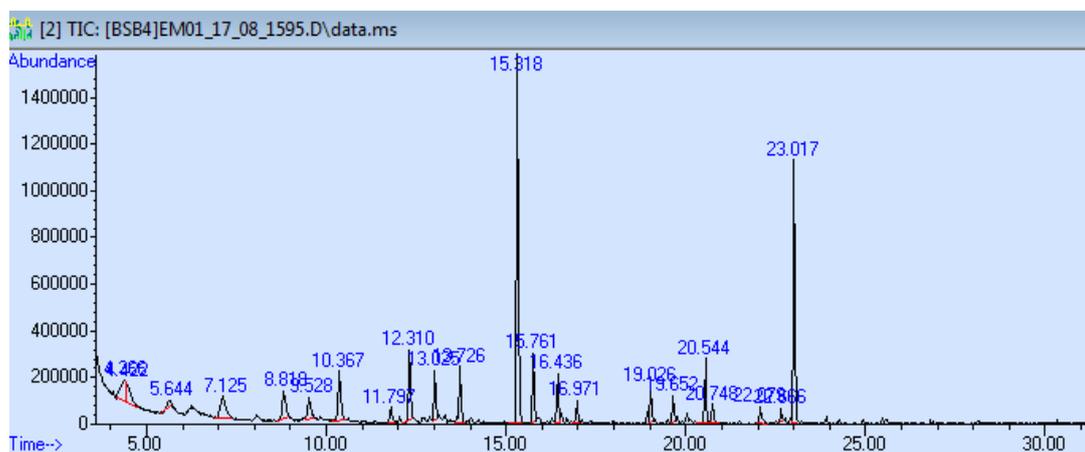


Figura 34. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares do espécime argentino de coleção de *Triatoma rubrovaria*.

Espécime argentino de Coleção

Para comparação com o lectótipo de *T. rubrovaria* foi analisado um espécime proveniente da Argentina, pelo fato de sua localidade ser próxima à região de encontro da espécie no Estado do Rio Grande do Sul. No seu cromatograma foram identificados 46 compostos de cadeia linear variando entre 21 e 40 carbonos. Destes, podemos destacar o 15,19,25- trimetil heptatriacontano com abundância relativa maior que 5% (Fig.35)

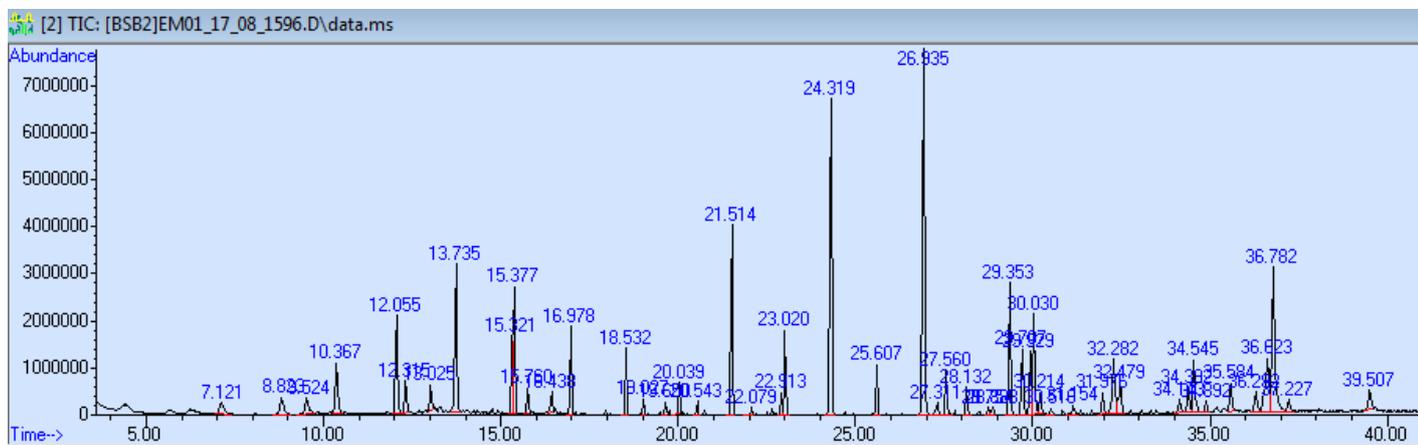


Figura 35. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares do lectótipo de *Triatoma rubrovaria*.

4.4.2 *Triatoma circummaculata*

Foram identificados 28 compostos, com cadeia linear variando entre 21 e 40 carbonos. Destes, podemos destacar os *n*-alcanos nonacosano (*n*-C29), hentriacontano (*n*-C31) e tritriacontano (*n*-C33) que estavam presentes com abundância relativa acima de 5%, sendo considerados os compostos majoritários para esta espécie. Igualmente, o alceno esqualeno apresentou abundância relativa acima de 5% nesta amostra (Fig.36)

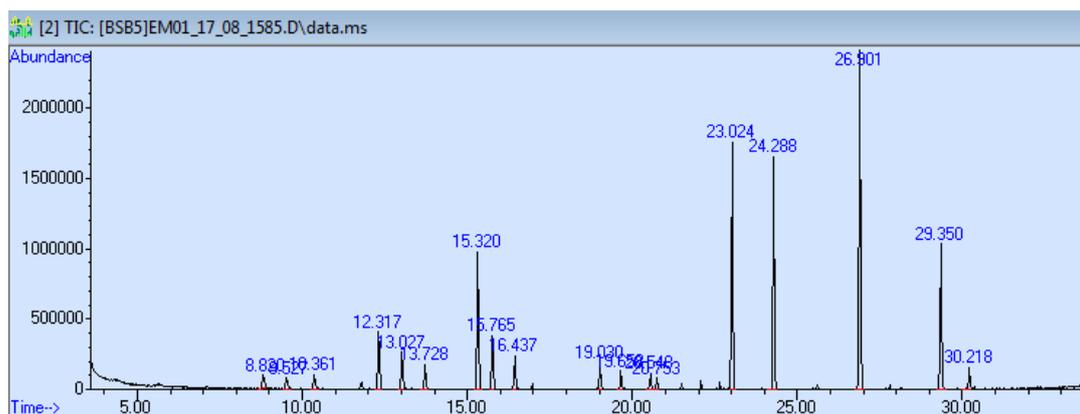


Figura 36. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de *Triatoma circummaculata*.

4.4.3 *Triatoma pintodiasi*

Foram identificados 26 compostos, com cadeia linear variando entre 21 e 33 carbonos. Destes, podemos destacar os n-alcenos tricosano (n-C23), nonacosano (n-C29), hentriacontano (n-C31) e tritriacontano (n-C33) que estavam presentes com abundância relativa acima de 5%, sendo considerados os compostos majoritários para esta espécie. Nenhum outro composto com abundância relativa acima de 5% foi observado para esta amostra (Fig.37).

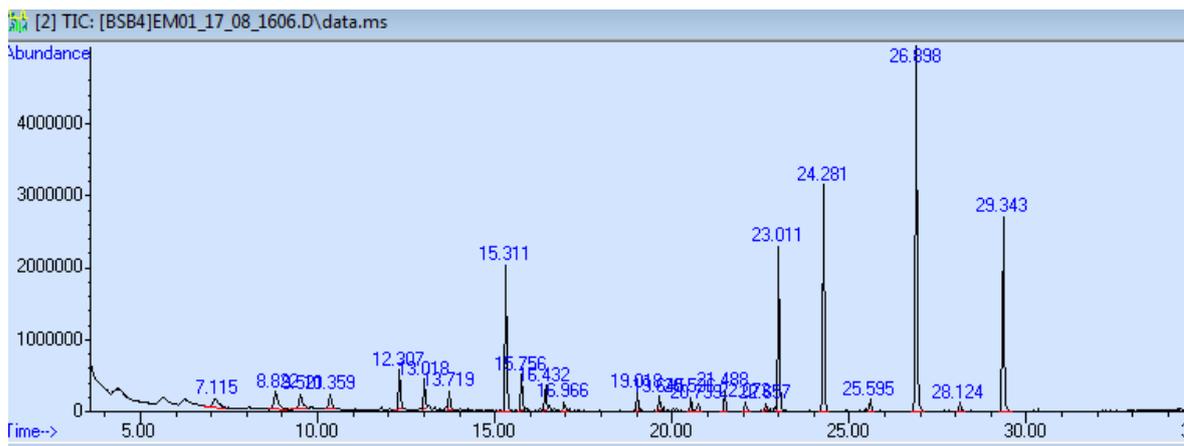


Figura 37. Cromatograma representativo do perfil de hidrocarbonetos cuticulares de *Triatoma pintodiasi*.

4.4.4 **Comparação de espécies**

As porcentagens de cada classe foram diferentes entre as amostras analisadas (fig. 38), comparando todos os compostos majoritários, foi feita uma análise de Cluster onde obtivemos uma árvore hierárquica a partir do índice de Similaridade de Bray-Curtis. A correlação cofenética de 0,9771 indica que não há distorções significativas na análise (Fig.39).

O dendograma comparando todos os espécimes por ligação simples (*single linkage method* ou *nearest neighbor*) mostra que existem dois clusters:

No cluster A (Fig.39) o espécime tipo de *T. rubrovaria* (1595vB) aparece como táxon irmão de um espécime de *T. pintodiasi* (Tpd_1608).

O cluster B (Fig. 39) reúne os espécimes de *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, onde o espécime *T. pintodiasi* (Tpd_1607) aparece como o ramo mais basal e externo no dendograma. É nítida a separação dos três espécimes de *T. circummaculata* dos demais *T. rubrovaria*. Estes aparecem como um arranjo de ramos bem distinto, pareado com seu ramo irmão *T. pintodiasi* (Tpd_1606).

Já no agrupamento de ramos de *T. rubrovaria* só é possível observar a clara separação dos insetos que apresentam cor laranja (1400lar). Os espécimes de cor amarela (1395a, 1394a), vermelha e rosa não mostram uma distinta separação por cor. Uma exceção é o espécime de *T. rubrovaria* (1389v) que está fora desse agrupamento aparecendo como o ramo mais basal.

As amostras que foram analisadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Nevada, Reno, não puderam ser aproveitadas, pois a abundância de cada uma não foi satisfatória impossibilitando as interpretações dos espectros de massas.

Os gráficos de agrupamento de compostos corroboram a análise de cluster, mostrando a separação das espécies por compostos (Fig.40).

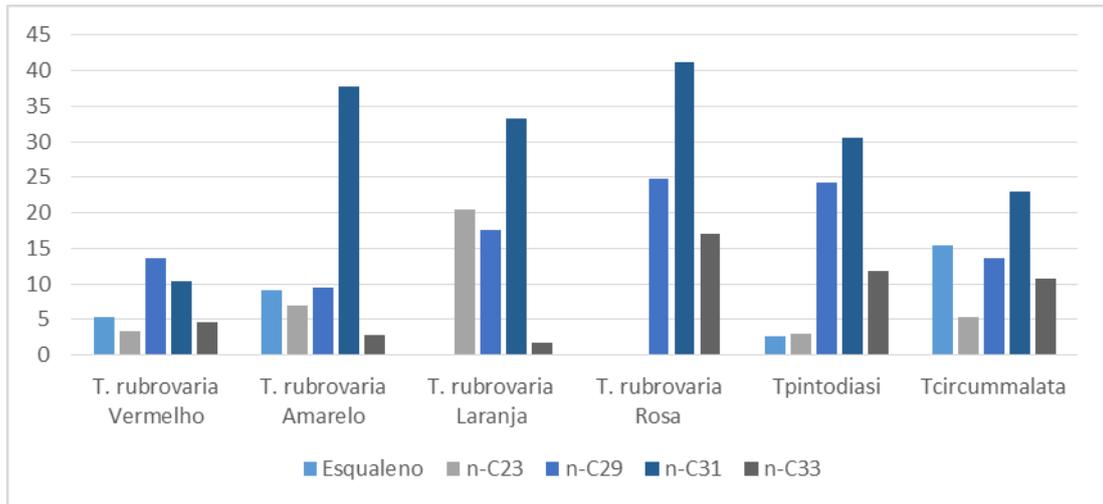


Figura 38 - Comparação entre as porcentagens médias dos n-alcenos majoritários e do esqualeno presentes nos espécimes analisados de *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma pintodiasi* e *Triatoma circummaculata*.

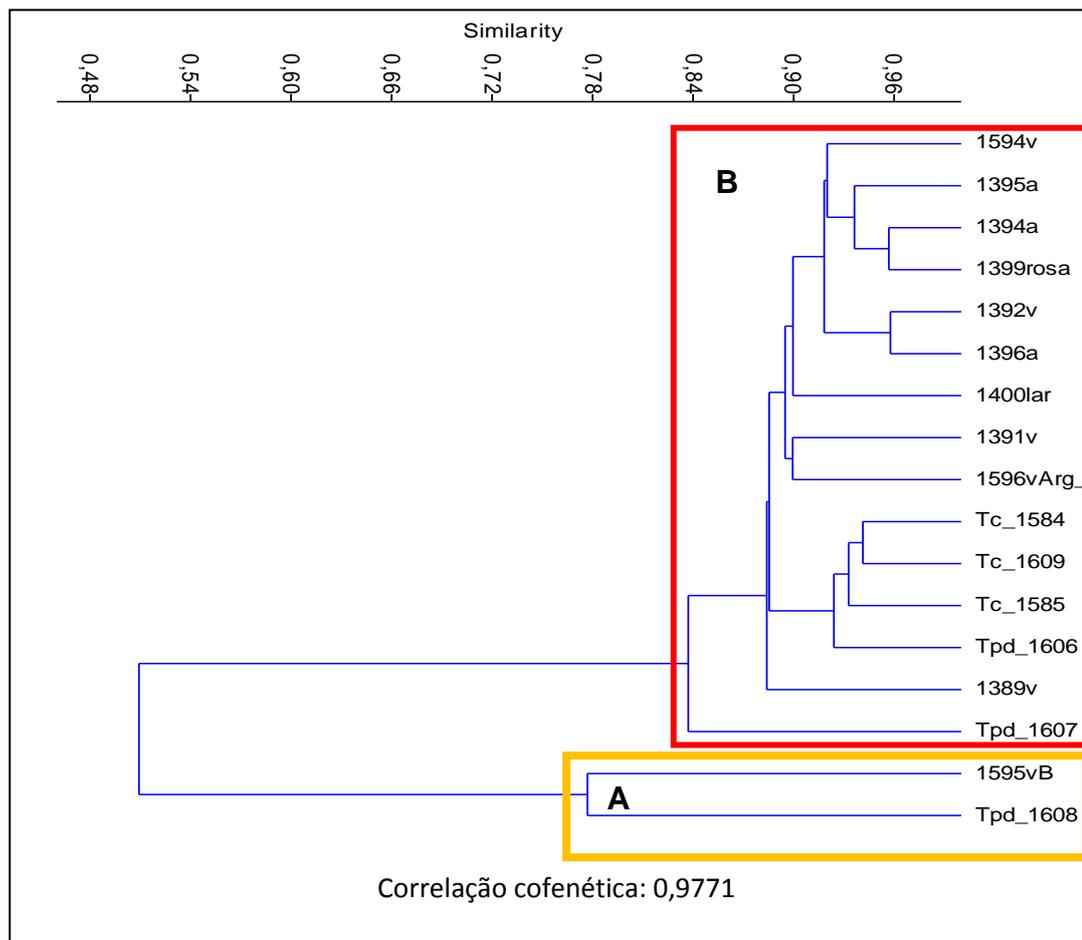


Figura 39 - Dendrograma montado a partir do índice de similaridade de Bray-Curtis por "single linkage method" comparando *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma circummaculata* e *Triatoma pintodiasi*. Cluster A mostra *T. rubrovaria* do Museu de Berlim (1595vB) como táxon irmão de *T. pintodiasi* (Tpd_1608); Cluster B mostra as distâncias entre os outros espécimes analisados.

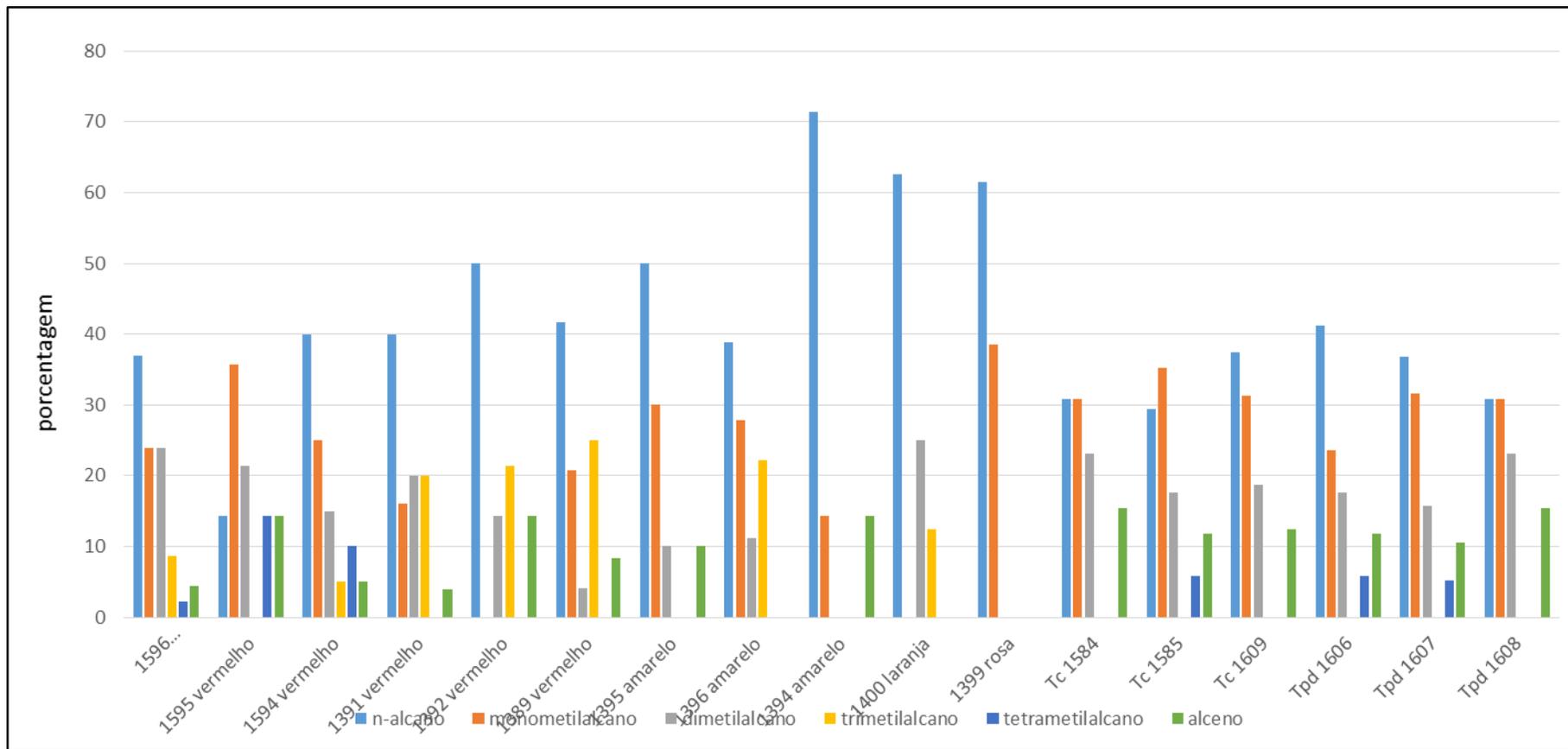


Figura 40 - Porcentagens de cada classe de hidrocarbonetos cuticulares por espécime estudado. Comparação entre *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma circummaculata* (Tc) e *Triatoma pintodiasi* (Tpd).

4.5 Rede de Haplótipos

Dos 230 espécimes submetidos à amplificação e sequenciamento, apenas 52 geraram sequências com mais de 400 pares de bases. As sequências referentes a esses espécimes foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank, através da ferramenta de busca *Blast Search*, com o objetivo de confirmar a taxonomia das sequências obtidas.

Foi possível observar um total de sete haplótipos do gene *cytb*, entretanto as relações filogenéticas desse grupo não ficaram bem resolvidas (suporte estatístico baixo). A comparação da divergência genética entre os haplótipos revelou que a distância K2P entre indivíduos da mesma espécie variou de 0 – 6% e a média entre indivíduos de espécies diferentes variou entre 2 – 6% (Anexo III).

As amostras de *T. rubrovaria* provenientes de Canguçu e Pinheiro Machado compartilharam o mesmo haplótipo e que Santana do Livramento é o local que podemos encontrar a maior diversidade de haplótipos entre todas as localidades estudadas. Foram observados diversos haplotipos mas não foi possível verificar um haplótipo ancestral, devido desigual distribuição geográfica de todos os haplotipos observados. Porém é possível observar que essas populações devem ter sofrido uma expansão geográfica recente devido a forma na qual a rede está representada (Fig. 40).

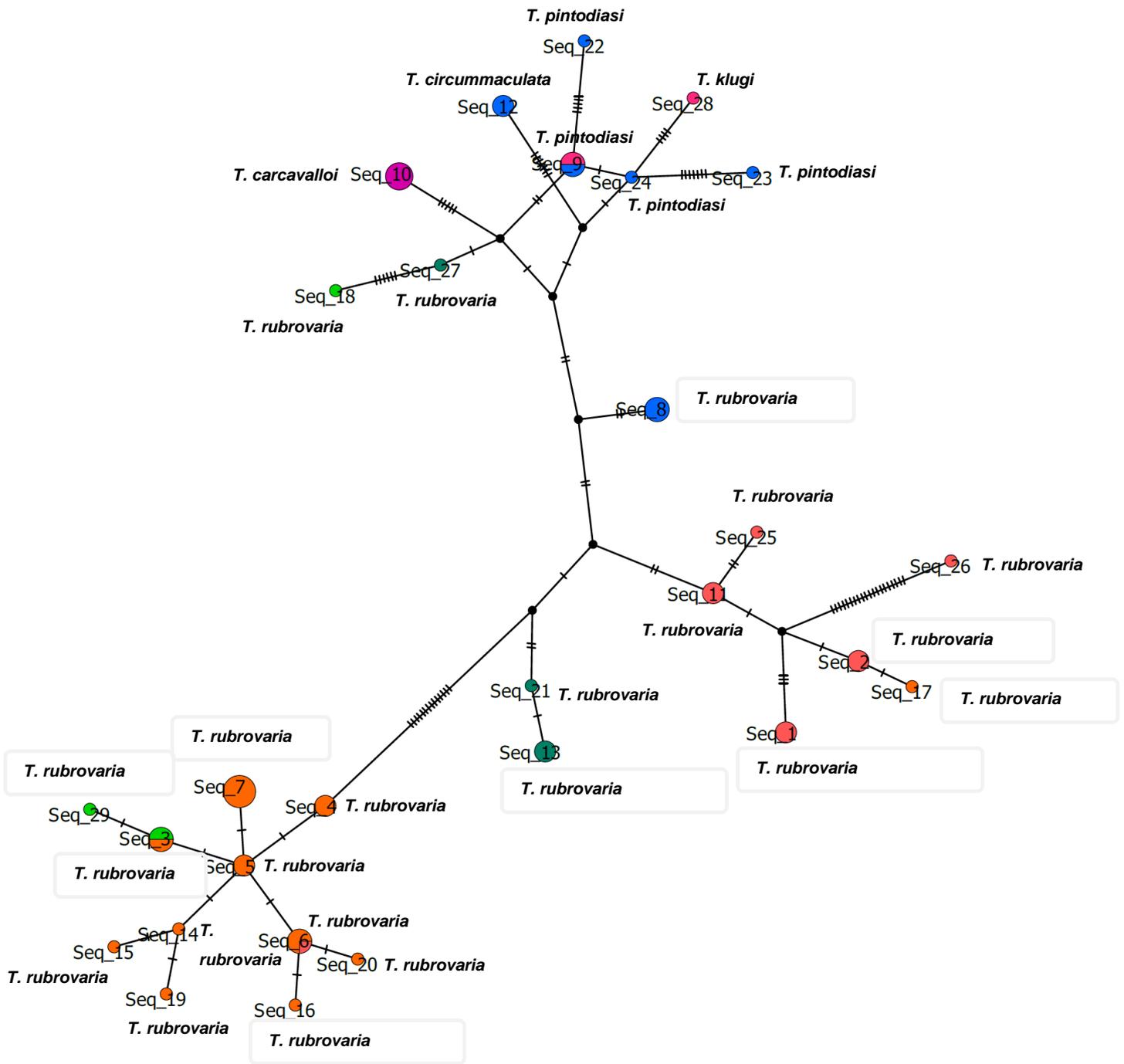


Figura 41. Árvore mostrando o agrupamento dos haplótipos.

5 DISCUSSÃO

Os primeiros relatos de ocorrência de triatomíneos no Estado do Rio Grande do Sul foram feitos por Arthur Neiva, em 1911, porém, somente em 1939 foi conhecido o primeiro caso de DC na região (Vinhaes e Dias 2000; Bedin 2009). Na década de 1980 o Rio Grande do Sul apresentava um dos maiores índices de infestação domiciliar e uma das taxas de soroprevalência mais altas do país (8,8%) (Silveira & Vinhaes 1998). Com o sucesso do programa de eliminação de *T. infestans* no estado espécies como *T. carcavalloi*, *T. circummaculata* e *T. rubrovaria*, antes consideradas primariamente silvestres e de pouca importância epidemiológica, vêm sendo frequentemente encontradas em domicílios e peridomicílios, aparecendo como potenciais transmissores da DC (Silva & Dias 2011).

T. carcavalloi foi descrito por Jurberg, Rocha & Lent (1998), com base em espécimes fêmeas coletadas em domicílios, de diferentes localidades do Rio Grande do Sul (Canguçu, Dom Feliciano, Jaguarão e Santana do Livramento). Ao examinar um espécime de 1946, depositado na Coleção Entomológica do Museu de História Natural de Nova York, foi possível notar que embora morfologicamente semelhante a *T. carcavalloi* esse espécime apresentava um padrão cromático diferente da descrição original. O mais interessante é que acompanhado do espécime existe uma observação do pesquisador Pedro Wygodzinsky dizendo: “*Isto não é circummaculata! Rostro! Tubérculos do pronoto muito próximo a rubrovaria, apenas com pequenos e laterais tubérculos no pronoto distinguíveis*” (Anexo IV). O mesmo foi notado para alguns espécimes depositados como *T. circummaculata*, na mesma dessa coleção, e que possuíam morfologia muito semelhante a *T. pintodiasi* (Jurberg et al. 2013). Cabe ressaltar que os espécimes estão depositados nessa coleção há pelo menos 30 anos, mantendo suas colorações praticamente originais. O presente trabalho descreve os diferentes padrões cromáticos encontrados para esta espécie. A única citação sobre essas diferenças, foi feita por Di Primio (1962), e Lent & Wygodzinsky (1979) que apontaram que *T. circummaculata* variava assim como *T. rubrovaria*.

Os espécimes *T. rubrovaria* coletados apresentaram uma extensa variação cromática no pronoto, asas e conexivos corroborando as informações de Lent (1942), Di Primio (1957) e Lent & Wygodzinsky (1979). Entretanto, quando comparados ao lectótipo, depositado na coleção entomológica de Berlim, nota-se que os espécimes

diferem não só no tamanho, na largura dos conexivos e principalmente no polimorfismo cromático do pronoto e corpo.

O holótipo de *T. rubrovaria* encontra-se desaparecido, por esse motivo Lent & Wygodzinsky (1979) designaram um lectótipo para a espécie, um inseto brasileiro estudado por Stål em 1859, classificado previamente como *T. rubroniger* e sinonimizado com *T. rubrovaria*. Foi possível observar uma designação errada do espécime, pois ao invés de lectótipos este na verdade deveria ter sido classificado como neótipo. Comparando todos os espécimes estudados foi possível observar que as alterações do pronoto e corpo são muito maiores do que os descritos na literatura por Lent (1942), Lent & Wygodzinsky (1979) e Almeida et al. (2002). O trabalho de Lent (1942) descreve as variações cromáticas com base na modificação da mancha de coloração negra e não no aumento ou diminuição das manchas vermelhas, contrariando o significado do nome da espécie, pois *rubrovaria* significa variação do vermelho, portanto, não sabemos ao certo se temos uma supressão da mancha vermelha ou uma expansão da mancha negra no pronoto desses insetos. Até o momento a melhor hipótese é uma supressão da cor vermelha, devido a um claro aumento de indivíduos com pronoto totalmente negro. Em alguns municípios só é possível encontrar esse padrão de pronoto (Almeida et al. 2002).

Existem poucos trabalhos na literatura investigando as questões envolvidas no polimorfismo cromático e qual a validade dessas alterações como caracteres diagnósticos, ou seja, o quanto essas diferenças seriam significativas para designação de novas espécies?

Noireau et al. (1998) chamaram a atenção para a importância da utilização de diferentes metodologias para descrição de novas espécies. Segundo (Dujardin et al. 1999) a definição de uma espécie não pode estar baseada unicamente na morfologia, é preciso entender a plasticidade fenotípica provocada por diferentes fatores e modificações ambientais.

Nossos resultados evidenciam uma clara separação entre os espécimes que apresentam morfologias muito semelhantes, porém cujos conexivos exibem colorações distintas como, amarelo, laranja e vermelho.

Portanto, para tentar compreender melhor as relações entre as espécies desse grupo, foi aplicada uma abordagem de taxonomia integrada utilizando morfologia, morfometria geométrica, hidrocarbonetos cuticulares e análises de DNA mitocondrial.

A primeira questão levantada foi: *T. pintodiasi* seria de fato uma espécie nova ou apenas um morfotipo de *T. circummaculata*? Em alguns municípios, como São

Jerônimo foram coletados apenas espécimes de *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*, o que pode representar uma sobreposição de espécies, e que estas podem estar mais aptas a ocupar mais rapidamente os nichos de *T. rubrovaria*. A comparação morfológica dos espécimes coletados apresentou muitas diferenças quando comparadas com a descrição original gerando dúvidas quanto a sua identidade taxonômica. Porém, os resultados da morfometria geométrica, associados aos HCs mostraram que *T. pintodiasi* parece ser uma linhagem independente, apresentando uma clara separação das demais espécies e uma sobreposição de seus espécimes. Estes dados corroboram as análises filogenéticas de Alevi et al. (2016) que confirmaram *status* específico desta espécie. Os dados de morfometria geométrica de cabeças indicam que nesse grupo possa haver mais outra espécie com características morfológicas próximas a *T. pintodiasi*, porém mais análises são necessárias.

Por outro lado, os resultados referentes a *T. circummaculata* foram contrários ao esperado. As análises de morfometria geométrica, tanto de asas quanto de cabeça, indicaram que os espécimes coletados no Brasil são na verdade, uma espécie diferente da descrita por Stål em 1859. Está foi a primeira vez que se utilizou a série tipo para uma análise diferente da taxonomia clássica. Os resultados de HCs mostraram que essa espécie difere de *T. pintodiasi* obtidos em campo, porém a comparação com a composição química de seu holótipo não foi possível. É notória a ausência de informações de ocorrência de *T. circummaculata*, durante um longo período, a última informação detalhada foi feita por Di Primio (1962), mostrando alguns padrões cromáticos desta espécie, e de acordo com suas pranchas (Anexo V) alguns dos espécimes apresentam morfologia muito semelhante a de *T. pintodiasi*. No trabalho de Silveira (2011) sobre o inquérito entomológico no Brasil no período de 1975-1983, não apresenta dados referentes a presença de *Triatoma circummaculata* no país levantando o questionamento do que pode ter ocorrido nessa região durante esses anos.

Rocha (2012), em sua tese, ressaltou o posicionamento de *T. rubrovaria* como espécie estreitamente relacionada a *T. circummaculata*, mas enfatizou a necessidade da associação de novas tecnologias para definição e agrupamento dessas espécies. Almeida et al. (2002) levantaram a hipótese de existirem duas populações distintas de *T. rubrovaria*, uma com indivíduos apresentando distintos padrões cromáticos e geneticamente similares e outra, proveniente de Canguçu, geneticamente isolada e de morfologia distinta. Entretanto, reanalizando algumas sequências de **Cytb** (de Canguçu, Santana do Livramento e Santiago) e comparando com os resultados obtidos

de outras localidades utilizando o mesmo marcador molecular, observou-se que podem existir diferentes populações, a primeira de Canguçu, uma segunda da localidade Santana do Livramento e, pelo menos mais três populações provenientes de Lavras do Sul, Caçapava do Sul e Santa Maria. Comparando os dados de biologia molecular com os de morfometria geométrica e hidrocarbonetos cuticulares podemos observar que os espécimes de cor amarela, distribuídos em diversas localidades, representam um morfotipo singular, que também é distinta de *T. klugi* (também apresenta coloração amarela). As diferenças de conformação de *T. rubrovaria* são tão abrangentes que não é possível identificar somente com os mapas fatoriais de componentes principais e análises discriminantes, a separação morfométrica entre *T. rubrovaria* e *T. klugi*. E apesar do distanciamento geográfico, dados moleculares sugerem que os espécimes de *T. rubrovaria* encontrados na localidade de Quevedos (coloração amarela) estão mais proximamente relacionados a *T. klugi* corroborando os dados de Justi et al. (2014).

A variabilidade genética de *T. rubrovaria* foi comparada pela primeira vez por Almeida et al. (2002) através das análises de isoenzimas, mais tarde Rocha (2009) constatou uma variabilidade entre três populações do Rio Grande do Sul utilizando o marcador **Cytb**. A autora sugeriu que este seria o mais adequado para analisar a variabilidade intrapopulacional, porém não foi possível comparar as sequências deste trabalho em nossos resultados. Apesar da rede de haplótipos gerar o máximo de informação possível no relacionamento entre as amostras, os dados obtidos do sequenciamento do gene **Cytb** para esse grupo são inconclusivos, pois a divergência é insuficiente para resolução da filogenia.

Segundo Kather & Martin (2012) e Braga et al. (2013), assim como as características morfológicas, os HCs podem ser considerados caracteres de valor taxonômico, indicando que essa metodologia pode ser utilizada para separação de espécies, pois alcenos e alcanos metil ramificados apresentam características discriminatórias. Nossos resultados mostram uma clara separação dos espécimes de *T. circummaculata*, *T. rubrovaria* e *T. pintodiasi* utilizando os HCs. Uma observação importante foi a presença de esqualeno em abundância na maioria dos cromatogramas, vale ressaltar que este composto não é produzido por insetos, sendo provavelmente adquirido durante a alimentação desses vetores em mamíferos. Como eles se expressam nos HCs ainda precisa ser analisado.

Como observados por Juarez et al. (2001) e Juárez & Calderón-Fernández (2007) uma característica dos triatomíneos é a presença de tetrametil alcanos, entretanto nos

espécimes analisados estes compostos sempre apareceram em abundâncias relativas baixas não sendo importante na diferenciação dessas espécies (Anexo III).

Como mencionado anteriormente, as amostras que foram analisadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade de Nevada, Reno, não puderam ser aproveitadas nessas análises. Entretanto, os cromatogramas gerados apresentaram agrupamentos de picos a partir de 30 minutos que segundo Gary Blomquist (informação pessoal) talvez sejam representativos do fenótipo de cor dessas espécies. Estes dados deverão ser reanalisados para aprofundamento nesta questão. Esses dados, embora preliminares, mostram grande potencial na diferenciação das espécies desse grupo. Outra possível aplicação dos HCs estaria relacionada ao desenvolvimento de novos inseticidas espécie-específico, pois a composição dos hidrocarbonetos da cutícula dos insetos está diretamente relacionada a resistência aos inseticidas, e quanto mais aprofundarmos os conhecimentos sobre sua composição e biossíntese mais próximos estaremos de torná-los vulneráveis (Calderón-Fernández et al. 2011, Qiu et al. 2012, Calderón-Fernández & Juárez 2013, Balabanidou et al. 2016).

6 CONCLUSÕES

- A morfometria geométrica diferenciou as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* dos diferentes morfotipos de *T. rubrovaria*.
- O resultado da morfometria geométrica mostrou que o espécime tipo de *T. circummaculata* é diferente dos encontrados no Estado do Rio Grande do Sul, sugerindo que os espécimes examinados sejam uma nova entidade taxonômica.
- Foi construída uma rede de haplótipos entre as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria* utilizando o marcador mitocondrial citocromo b, porém os dados de biologia molecular para esse grupo são inconclusivos, pois a divergência é insuficiente para resolução da filogenia.
- O perfil de hidrocarbonetos cuticulares permitiu a comparação das espécies de *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* e se mostrou como uma ferramenta útil na diagnose desse grupo de espécies de triatomíneos
- Pela primeira vez, em triatomíneos, foi possível analisar um espécime tipo de coleção utilizando a análise dos hidrocarbonetos cuticulares.

7 PERSPECTIVAS

- Revisão do subcomplexo *T. rubrovaria*
- Análise da coloração através dos hidrocarbonetos cuticulares
- Fazer uma análise com maior número de réplicas, utilizando na amostra insetos de coleção incluindo a série tipo.
- Utilizar a metodologia de hidrocarbonetos cuticulares para outras espécies crípticas.
- Elucidar a questão entre *T. rubrovaria* e *T. klugi*.
- Montar um banco de dados de acesso aberto com os perfis de hidrocarbonetos dos triatomíneos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Franch F, Monteiro F a 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77: 437–454.
- Alevi C, Guerra AL, Henrique C, Imperador CHL, Jurberg J, Ferraz F, Moreira F, Tercília M, Azeredo V De 2016. Mitochondrial Gene Confirms the Specific Status of *Triatoma pintodiasi* Jurberg , Cunha , and Rocha , 2013 (Hemiptera , Triatominae), an Endemic Species in Brazil. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*: 10–13.
- Almeida CE, Pacheco RS, Noireau F, Costa J 2002. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: isoenzymatic and chromatic patterns of five populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 829–834.
- Almeida CE, Peterson AT, Costa J, Duarte R, Lima MM, Locks M, Ao MB 2009. Could the bug *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia , Brazil ? *Med. Vet. Entomol.* 23: 410–417.
- Almeida CE, Vinhaes MC, Almeida JR de, Silveira a C, Costa J 2000. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 761–768.
- Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist G, Tittiger C, Juarez P, Mijailovsky SJ, Chalepakis G, Anthousi A, Lynd A, Antoine S, Hemingway J, Ranson H, Lycett GJ, Vontas J 2016. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles* ... Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 1–6.
- Bargues MD, Marcilla A, Dujardin JP, Mas-Coma S 2002. Triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi*: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 Suppl 1: S159–S164.
- Baruffa, G, Alcantara Filho A 1985. Inquérito sorológico e entomológico da infecção pelo *T. cruzi* na Região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil.pdf. *Ann Soc Belge Méd Trop* 1: 171–179.
- Bedin C, Mello F De, Stasiak T, Torres MA, Estima C, Ferreira CF, Sehn L 2009. *Boletim Epidemiológico*.
- Braga MV, Pinto ZT, Carvalho MM De, Blomquist GJ, Janeiro R De, Janeiro R De, Sombra US 2016. HHS Public Access. *Forensic Sci. Int.*: 1–21.

- Caldeira Brant, T, Laranja , FS, Bustamante, Fm, Leite Mello A 1957. Dados sorológicos e eletrocardiograficos obtidos em populações não selecionadas de zonas endêmicas de doença de Chagas no Estado do Rio Grande do Sul.pdf. *Rev. Bras. Malariol. e Doenças Trop.*: 139–148.
- Calderón-Fernández GM, Girotti JR, Juárez MP 2011. Cuticular Hydrocarbons of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae): Intraspecific Variation and Chemotaxonomy. *J. Med. Entomol.* 48: 262–271.
- Calderón-fernández GM, Juárez MP 2013. The cuticular hydrocarbons of the *Triatoma sordida* species subcomplex (Hemiptera : Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108: 778–784.
- Camargo, ME, Silva, GR, Castilho, EA SA 1984. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *rev Inst Med trop São Paulo* 26: 192–204.
- Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Galvão C, Steindel M, José C, Pinto C 2001. Nova Espécie do Complexo oliveirai (Nova Denominação para o Complexo matogrossensis) (Hemiptera , Reduviidae , Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul , Brasil. 96: 71–79.
- Dias JCP, Schofield CJ 1999. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 103–121.
- Dias JCP, Silveira a C, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97: 603–612.
- Dujardin JP 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infect. Genet. Evol.* 8: 875–890.
- Dujardin JP, Panzera P, Schofield CJ 1999. Triatominae as a Model of Morphological Plasticity under Ecological Pressure. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 223–228.
- Galvão C 2014. *Vetores da Doença de Chagas no Brasil*.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J 2003. A Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1–36.
- Galvão C, Dale C 2014. 9. Chaves de identificação para adultos. In: *Vetores da Doença Chagas no Bras.*,, pp. 171–208.
- Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Peterson a T 2012. Geographic distribution of chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *J. Trop.*

- Med.* 2012: 705326.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD 2001. PAST : PALEONTOLOGICAL STATISTICS SOFTWARE PACKAGE FOR EDUCATION AND DATA ANALYSIS. <http://palaeo-electronica.org> PAST 4: 1–9.
- Jaramillo N 2014. *Geometric Morphometrics Applied to the Study of Triatominae o f.*
- Juarez, Patricia, Blomquist Gary SC 2001. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus* , a Chagas disease vector. 129: 733–746.
- Juárez MP, Fernández GC 2007. Cuticular hydrocarbons of triatomines ☆. *Comp. Biochem. Physiol.* 147: 711–730.
- Jurberg J, Cunha V, Caileaux S, Raigorodski R, Lima MS, Rocha DS, Moreira FFF 2013. *Triatoma pintodiasi* sp . nov . do subcomplexo T . rubrovaria. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 4.
- Jurberg J, Rocha DS, Lorosa ES, Vinhaes M, Lent H 1998. Uma nova espécie de *Triatoma* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Entomol. y Vectores* 5: 310.
- Justi SA, Galvão C 2016. The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends Parasitol.* xx: 1–11.
- Justi SA, Russo C a M, Mallet JRDS, Obara MT, Galvão C 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasit. Vectors* 7: 149.
- Lent H 1942. Estudo sobre os Triatomíneos do Rio Grande do Sul com a descrição de uma nova espécie. *Rev. Bras. Biol.* 2: 219–231.
- Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: reduviidae), and their significance as vectors of Chagas Disease. *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 163: 123–520.
- Magaly C, Ramirez S, Evelia E, Blanco N, Marin RG, Alexander D, Mendez J, Rodríguez NO, Otálora-luna F, Aldana EJ 2015. Morphometric Analysis of the Host Effect on Phenotypical Variation of *Belminus ferroae* (Hemiptera : Triatominae). *Psyche (Stuttg)*. 2015: 1–12.
- Monteiro F a, Escalante a a, Beard CB 2001. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends Parasitol.* 17: 344–347.
- Monteiro F a., Peretolchina T, Lazoski C, Harris K, Dotson EM, Abad-Franch F, Tamayo E, Pennington PM, Monroy C, Cordon-Rosales C, Salazar-Schettino PM, Gómez-Palacio AM, Grijalva MJ, Beard CB, Marcet PL 2013. Phylogeographic Pattern and Extensive Mitochondrial DNA Divergence Disclose a Species Complex within the Chagas Disease Vector *Triatoma dimidiata*. *PLoS*

- Negl. Trop. Dis.* 8: e70974.
- Morel CM, Lazdins J 2003. Chagas disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 14–15.
- Nattero J, Piccinali RV, Lopes CM, Hernández ML, Abraham L, Lobbia PA, Rodríguez CS, Laura A, De C 2017. Morphometric variability among the species of the *Sordida* subcomplex (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. *Parasit. Vectors* 10: 1–14.
- Neiva A 1913. Informações sobre a biologia da Vinchuca, *Triatoma infestans* KLUG.pdf. : 24–31.
- Noireau F, Gutierrez T, Zegarra M, Flores R, Brenière F, Cardozo L, Dujardin JP 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera:Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Trop. Med. Int. Health* 3: 364–372.
- Paradis E, Claude J 2004. APE : Analyses of Phylogenetics and Evolution in R Language APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 2: 289–290.
- Patterson JS 2007. Comparative morphometric and molecular genetic analyses of triatominae (Hemiptera : Reduviidae).
- Pedroso D, Velleda C, Novicki A 2011. ESTUDO RETROSPECTIVO DE SORORREATIVIDADE PARA *Trypanosoma cruzi* EM DOADORES DE SANGUE DA REGIÃO NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL , BRASIL. 45: 161–168.
- Primio R Di 1957. Variações cromáticas de *Triatoma rubrovaria*. *An. Fac. Med. Porto Alegre*.
- Qiu Y, Tittiger C, Wicker-thomas C, Le G, Young S, Wajnberg E, Fricaux T 2012. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*: 1–6.
- R. Kather SJM 2012. Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool : advantages , limitations and technical aspects. *Physiol. Entomol.* 37: 25–32.
- R Development Core Team 2008. R.
- Rocha CS 2012. “Análise da relação filogenética entre *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha; Lent, 1998; *Triatoma circummaculata* Stal, 1859; *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent; Galvão, 2001 e *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no seq. 1843.
- Rohlf FJ 2005. tpsDig, V. 2.04.
- Schmunis G a 1999. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin

- America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 93–101.
- Schofield CJ, Dujardin JP 1997. Chagas disease vector control in Central America. *Parasitol. Today* 13: 141–144.
- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 110: 88–100.
- Schroeder H, Klotzbach H, Elias S, Augustin C, Pueschel K 2003. Use of PCR – RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera , Calliphoridae) on human corpses. *Forensic Sci. Int.* 132: 76–81.
- U. Jinbo, T. Kato MI 2011. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomol. Sci.* 14: 107–124.
- Vallejo G a, Guhl F, Schaub G a 2009. Triatominae-Trypanosoma cruzi/T. rangeli: Vector-parasite interactions. *Acta Trop.* 110: 137–147.
- WHO WHO 2017. *Integrating neglected tropical diseases.*
- Young B 2000. TCS : a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1659.

9 APÊNDICES E/OU ANEXOS

9.1 Anexo I

Comparações no complexo T. Rubrovaria

Silvia Justi - Modificado por Carolina Dale

10/27/2017

Loading the necessary libraries

Reading the fasta files

```
datacytb <-read.FASTA("Cyt_b_Dale.fasta")
summary(datacytb)
```

```
##           Length Class  Mode
## Seq_14 412      -none- raw
## Seq_4   412      -none- raw
## Seq_7   412      -none- raw
## Seq_7   412      -none- raw
## Seq_15  412      -none- raw
## Seq_16  412      -none- raw
## Seq_1   412      -none- raw
## Seq_2   412      -none- raw
## Seq_1   412      -none- raw
## Seq_29  412      -none- raw
## Seq_3   412      -none- raw
## Seq_7   412      -none- raw
## Seq_7   412      -none- raw
## Seq_7   412      -none- raw
## Seq_6   412      -none- raw
## Seq_17  412      -none- raw
## Seq_2   412      -none- raw
## Seq_18  412      -none- raw
## Seq_3   412      -none- raw
## Seq_4   412      -none- raw
## Seq_19  412      -none- raw
## Seq_5   412      -none- raw
## Seq_5   412      -none- raw
## Seq_6   412      -none- raw
## Seq_7   412      -none- raw
## Seq_20  412      -none- raw
## Seq_6   412      -none- raw
## Seq_3   412      -none- raw
## Seq_8   412      -none- raw
## Seq_10  412      -none- raw
## Seq_10  412      -none- raw
## Seq_21  412      -none- raw
## Seq_13  412      -none- raw
## Seq_13  412      -none- raw
## Seq_22  412      -none- raw
## Seq_23  412      -none- raw
## Seq_9   412      -none- raw
## Seq_9   412      -none- raw
## Seq_9   412      -none- raw
## Seq_24  412      -none- raw
```

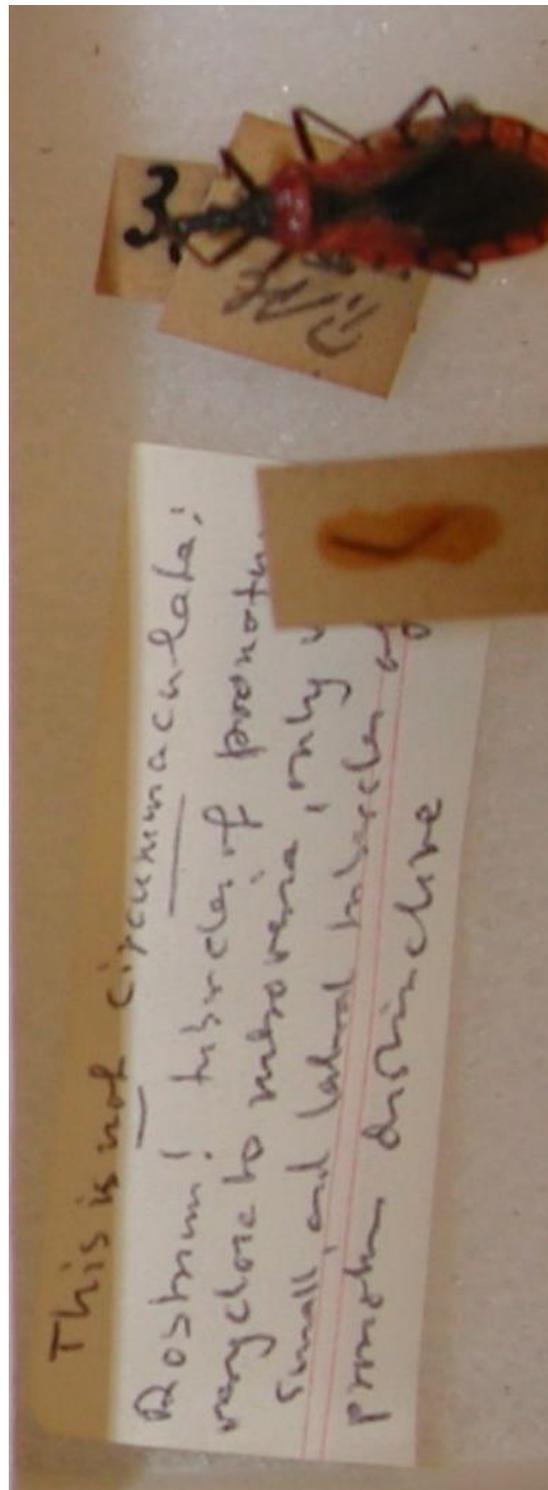
```
## Seq_8 412 -none- raw
## Seq_12 412 -none- raw
## Seq_10 412 -none- raw
## Seq_10 412 -none- raw
## Seq_12 412 -none- raw
## Seq_11 412 -none- raw
## Seq_25 412 -none- raw
## Seq_26 412 -none- raw
## Seq_11 412 -none- raw
## Seq_8 412 -none- raw
## Seq_27 412 -none- raw
## Seq_28 412 -none- raw
## Seq_12 412 -none- raw
```

Calculating the pairwise k2p distances between samples and making sure they are returned as matrix, so we can plot the distances later and saving as tables

```
dist_cytb <-dist.dna(datacytb, model = "K80", as.matrix = TRUE, pairwise.deletion = T)
summary(dist_cytb)
```

```
##      Seq_14      Seq_4      Seq_7
## Min. :0.000000 Min. :0.000000 Min. :0.000000
## 1st Qu.:0.004878 1st Qu.:0.004878 1st Qu.:0.004878
## Median :0.048384 Median :0.043065 Median :0.048384
## Mean   :0.032678 Mean   :0.029635 Mean   :0.032403
## 3rd Qu.:0.051065 3rd Qu.:0.045717 3rd Qu.:0.051065
## Max.   :0.078904 Max.   :0.073238 Max.   :0.078904
##      Seq_7      Seq_15      Seq_16
## Min. :0.000000 Min. :0.000000 Min. :0.000000
## 1st Qu.:0.004878 1st Qu.:0.007335 1st Qu.:0.007335
## Median :0.048384 Median :0.045717 Median :0.045717
## Mean   :0.032403 Mean   :0.031940 Mean   :0.031755
## 3rd Qu.:0.051065 3rd Qu.:0.048384 3rd Qu.:0.048384
## Max.   :0.078904 Max.   :0.076063 Max.   :0.076063
##      Seq_1      Seq_2      Seq_1      Seq_29
## Min. :0.000000 Min. :0.000000 Min. :0.000000 Min. :0.000000
## 1st Qu.:0.02488 1st Qu.:0.01980 1st Qu.:0.02488 1st Qu.:0.007322
## Median :0.04281 Median :0.04043 Median :0.04281 Median :0.050939
## Mean   :0.03890 Mean   :0.03406 Mean   :0.03890 Mean   :0.035011
## 3rd Qu.:0.05376 3rd Qu.:0.04838 3rd Qu.:0.05376 3rd Qu.:0.053627
## Max.   :0.05935 Max.   :0.05390 Max.   :0.05935 Max.   :0.081550
##      Seq_3      Seq_7      Seq_7
## Min. :0.000000 Min. :0.000000 Min. :0.000000
## 1st Qu.:0.004878 1st Qu.:0.004878 1st Qu.:0.004878
## Median :0.048384 Median :0.048384 Median :0.048384
## Mean   :0.032587 Mean   :0.032403 Mean   :0.032403
## 3rd Qu.:0.051065 3rd Qu.:0.051065 3rd Qu.:0.051065
## Max.   :0.078904 Max.   :0.078904 Max.   :0.078904
##      Seq_7      Seq_6      Seq_17      Seq_2
## Min. :0.000000 Min. :0.000000 Min. :0.000000 Min. :0.000000
## 1st Qu.:0.004878 1st Qu.:0.004878 1st Qu.:0.02229 1st Qu.:0.01980
## Median :0.048384 Median :0.048384 Median :0.04296 Median :0.04043
## Mean   :0.032403 Mean   :0.032494 Mean   :0.03648 Mean   :0.03406
## 3rd Qu.:0.051065 3rd Qu.:0.051065 3rd Qu.:0.05094 3rd Qu.:0.04838
## Max.   :0.078904 Max.   :0.078904 Max.   :0.05647 Max.   :0.05390
```

##	Seq_18	Seq_3	Seq_4	
##	Min. :0.00000	Min. :0.000000	Min. :0.000000	
##	1st Qu.:0.03491	1st Qu.:0.004878	1st Qu.:0.004878	
##	Median :0.04043	Median :0.048384	Median :0.043065	
##	Mean :0.04284	Mean :0.032587	Mean :0.029635	
##	3rd Qu.:0.05920	3rd Qu.:0.051065	3rd Qu.:0.045717	
##	Max. :0.06486	Max. :0.078904	Max. :0.073238	
##	Seq_19	Seq_5	Seq_5	
##	Min. :0.000000	Min. :0.000000	Min. :0.000000	
##	1st Qu.:0.007335	1st Qu.:0.002433	1st Qu.:0.002433	
##	Median :0.048384	Median :0.045717	Median :0.045717	
##	Mean :0.033555	Mean :0.030368	Mean :0.030368	
##	3rd Qu.:0.051065	3rd Qu.:0.048384	3rd Qu.:0.048384	
##	Max. :0.081761	Max. :0.076063	Max. :0.076063	
##	Seq_6	Seq_7	Seq_20	
##	Min. :0.000000	Min. :0.000000	Min. :0.000000	
##	1st Qu.:0.004878	1st Qu.:0.004878	1st Qu.:0.007322	
##	Median :0.048384	Median :0.048384	Median :0.050939	
##	Mean :0.032494	Mean :0.032403	Mean :0.034918	
##	3rd Qu.:0.051065	3rd Qu.:0.051065	3rd Qu.:0.053627	
##	Max. :0.078904	Max. :0.078904	Max. :0.081550	
##	Seq_6	Seq_3	Seq_8	Seq_10
##	Min. :0.000000	Min. :0.000000	Min. :0.00000	Min. :0.00000
##	1st Qu.:0.004878	1st Qu.:0.004878	1st Qu.:0.01980	1st Qu.:0.02744
##	Median :0.048384	Median :0.048384	Median :0.03001	Median :0.03759
##	Mean :0.032494	Mean :0.032587	Mean :0.03239	Mean :0.03714
##	3rd Qu.:0.051065	3rd Qu.:0.051065	3rd Qu.:0.04838	3rd Qu.:0.05376
##	Max. :0.078904	Max. :0.078904	Max. :0.06486	Max. :0.06486
##	Seq_10	Seq_21	Seq_13	Seq_13
##	Min. :0.00000	Min. :0.00000	Min. :0.00000	Min. :0.00000
##	1st Qu.:0.02744	1st Qu.:0.02234	1st Qu.:0.02488	1st Qu.:0.02488
##	Median :0.03759	Median :0.03780	Median :0.03519	Median :0.03519
##	Mean :0.03714	Mean :0.03298	Mean :0.03510	Mean :0.03510
##	3rd Qu.:0.05376	3rd Qu.:0.04572	3rd Qu.:0.04838	3rd Qu.:0.04838
##	Max. :0.06486	Max. :0.06764	Max. :0.07043	Max. :0.07043
##	Seq_22	Seq_23	Seq_9	Seq_9
##	Min. :0.00000	Min. :0.00000	Min. :0.00000	Min. :0.00000
##	1st Qu.:0.02978	1st Qu.:0.03759	1st Qu.:0.01729	1st Qu.:0.01729
##	Median :0.04009	Median :0.04281	Median :0.02744	Median :0.02744
##	Mean :0.04396	Mean :0.04826	Mean :0.03280	Mean :0.03280
##	3rd Qu.:0.06410	3rd Qu.:0.06701	3rd Qu.:0.05106	3rd Qu.:0.05106
##	Max. :0.08098	Max. :0.08404	Max. :0.06764	Max. :0.06764
##	Seq_9	Seq_24	Seq_8	Seq_12
##	Min. :0.00000	Min. :0.00000	Min. :0.00000	Min. :0.00000
##	1st Qu.:0.01729	1st Qu.:0.01980	1st Qu.:0.01980	1st Qu.:0.03001
##	Median :0.02744	Median :0.02488	Median :0.03001	Median :0.04043
##	Mean :0.03280	Mean :0.03115	Mean :0.03239	Mean :0.03772
##	3rd Qu.:0.05106	3rd Qu.:0.04838	3rd Qu.:0.04838	3rd Qu.:0.04838
##	Max. :0.06764	Max. :0.06486	Max. :0.06486	Max. :0.07043
##	Seq_10	Seq_10	Seq_12	Seq_11
##	Min. :0.00000	Min. :0.00000	Min. :0.00000	Min. :0.00000
##	1st Qu.:0.02744	1st Qu.:0.02744	1st Qu.:0.03001	1st Qu.:0.01478
##	Median :0.03759	Median :0.03759	Median :0.04043	Median :0.03519
##	Mean :0.03714	Mean :0.03714	Mean :0.03772	Mean :0.03213



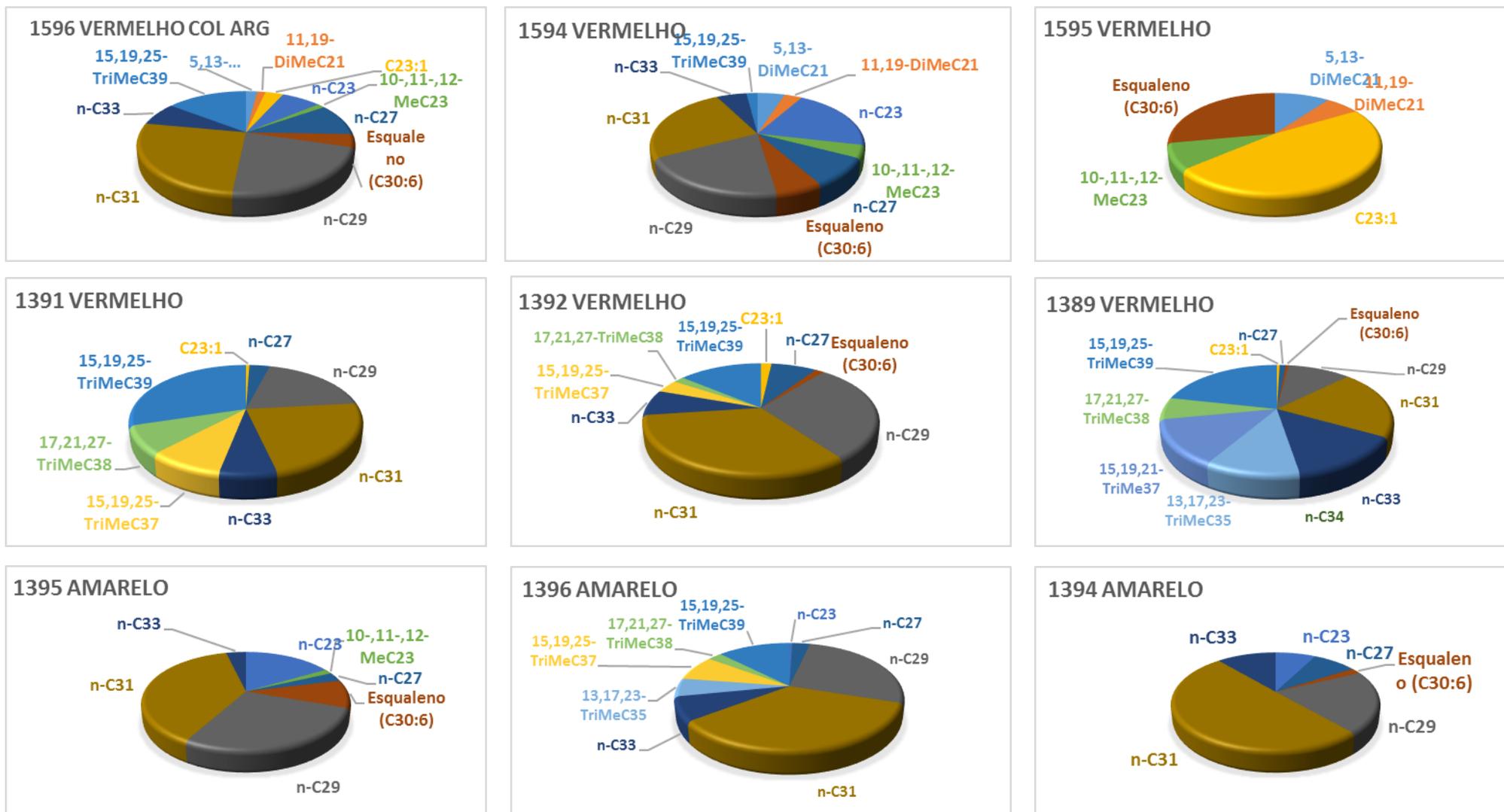
9.3 Anexo III

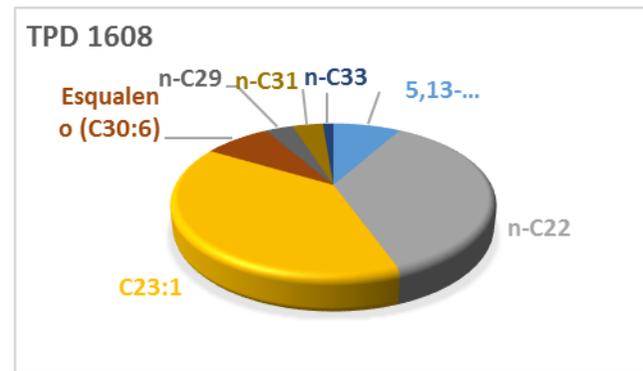
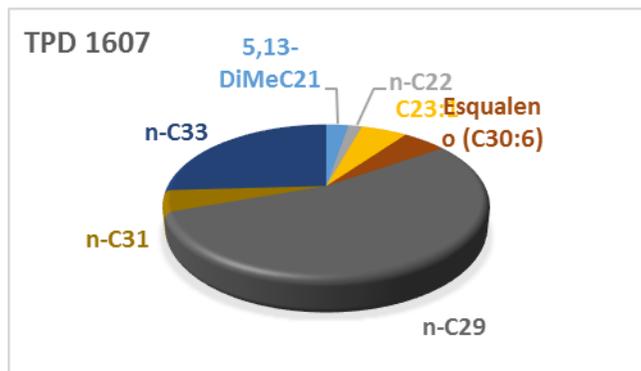
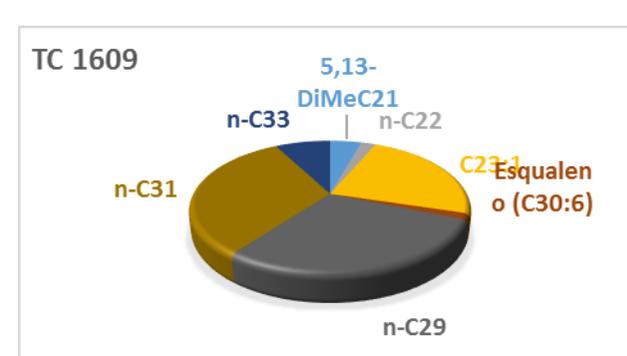
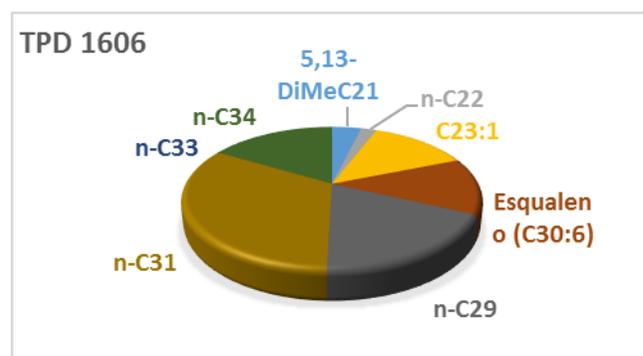
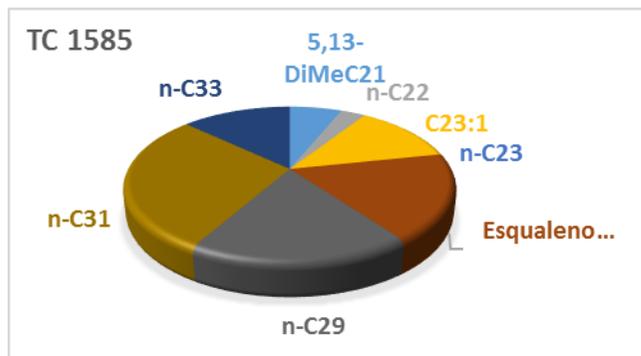
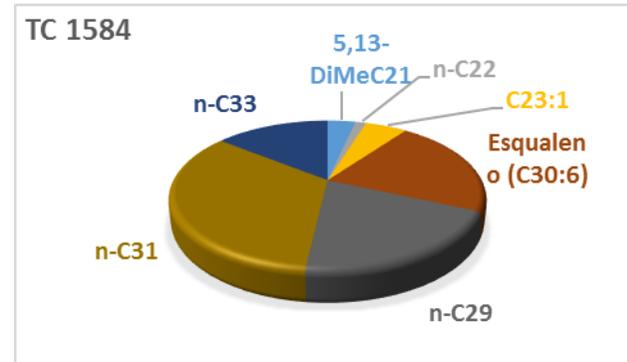
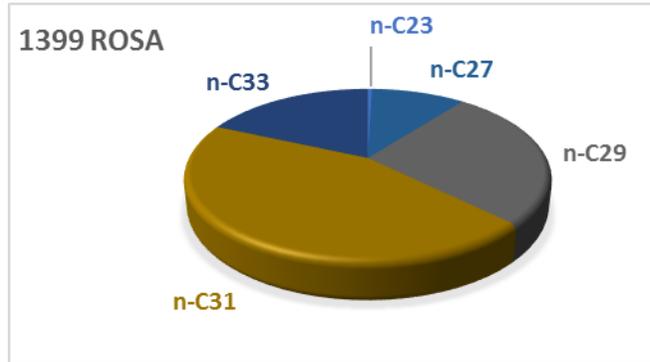
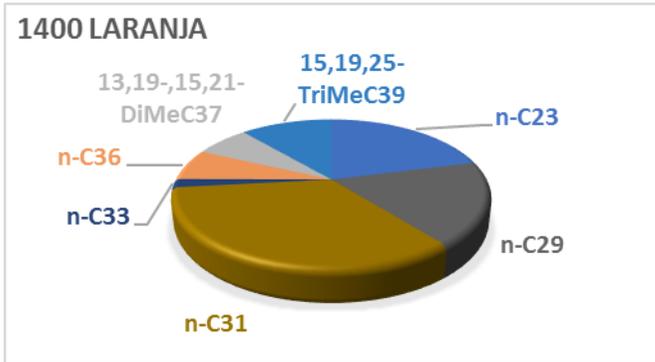
Tabela 5 - Porcentagens de hidrocarbonetos cuticulares majoritários por espécime estudado. Comparação entre *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma pintodiasi* e *Triatoma circummaculata*.

HCs	<i>Triatoma rubrovaria</i>											<i>Triatoma circummaculata</i>			<i>Triatoma pintodiasi</i>		
	1596 vermelho col arg	1595 vermelho	1594 vermelho	1391 vermelho	1392 vermelho	1389 vermelho	1395 amarelo	1396 amarelo	1394 amarelo	1400 laranja	1399 rosa	Tc 1584	Tc 1585	Tc 1609	Tpd 1606	Tpd 1607	Tpd .608
5,13-DiMeC21	1,10	7,32	4,25	--	--	--	--	--	--	--	--	3,19	4,87	3,49	3,23	1,33	6,65
11,19-DiMeC21	0,80	4,59	2,77	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>n</i> -C22	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,23	2,30	1,64	1,72	0,81	29,32
C23:1	1,76	34,16	--	0,48	1,67	0,37	--	--	--	--	--	4,76	9,89	18,50	11,01	2,74	31,62
<i>n</i> -C23	3,83	--	17,21	--	--	--	15,49	0,41	7,50	20,53	0,40	--	--	--	--	--	--
10-,11-,12-MeC23	0,74	5,93	3,42	--	--	--	1,46	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>n</i> -C27	5,44	--	7,65	2,83	7,21	0,84	2,78	2,51	8,21	--	9,34	--	--	--	--	--	--
Esqualeno (C30:6)	2,22	20,21	5,07	--	1,40	0,36	8,59	--	1,87	--	--	19,79	14,30	1,18	10,90	2,64	6,58
<i>n</i> -C29	11,76	--	16,69	15,77	27,55	8,39	25,90	21,77	20,38	17,66	24,85	18,50	14,48	23,18	15,66	26,65	2,75
<i>n</i> -C31	14,06	--	21,24	19,02	31,32	16,17	35,50	28,50	49,44	33,22	41,13	30,97	22,52	25,39	27,80	2,22	3,00
<i>n</i> -C33	3,97	--	4,69	5,48	7,10	11,24	3,49	5,94	11,04	1,76	17,01	13,10	10,25	6,17	--	12,72	1,04
<i>n</i> -C34	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	13,94	--	--
13,17,23-TriMeC35	--	--	--	--	--	8,76	--	4,52	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>n</i> -C36	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6,61	--	--	--	--	--	--	--
13,19-,15,21-DiMeC37	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6,62	--	--	--	--	--	--	--
15,19,25-TriMeC37	--	--	--	7,34	3,63	--	--	6,29	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15,19,21-TriMe37	--	--	--	--	--	10,62	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
17,21,27-TriMeC38	--	--	--	6,72	1,71	5,13	--	2,04	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15,19,25-TriMeC39	7,83	--	1,73	24,45	13,25	16,98	--	10,26	--	11,03	--	--	--	--	--	--	--

tracejado: não detectado ou abaixo de 0,1%; células em verde: porcentagens acima de 5%.

Gráfico 1. Porcentagens de hidrocarbonetos cuticulares majoritários por espécime estudado. Comparação entre *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma pintodiasi* e *Triatoma circummaculata*.





9.4 Anexo IV

Tabela 6 - Porcentagens dos hidrocarbonetos cuticulares encontrados em cada espécime estudado. Comparação entre *Triatoma rubrovaria* vermelho, amarelo, laranja e rosa, *Triatoma pintodiasi* e *Triatoma circummaculata*.

Hidrocarboneto	T	<i>Triatoma rubrovaria</i>						<i>Triatoma circummaculata</i>			<i>Triatoma pintodiasi</i>							
		1596 rm. col arg	15 15 rm.	15 14 rm.	13 11 rm.	13 12 rm.	13 13 rm.	1395 1395 arelo	1396 1396 arelo	1394 1394 arelo	140 140 ranja	13 13 rosa	Tc Tc 184	Tc Tc 185	Tc Tc 109	1506 1506 Tp	1507 1507 Tp	1608 1608 Tpd
<i>n</i> -C21	2	3,71	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	10								2,5									
5,15-DiMeC21	2	--	--	--	--	--	--	--	7	--	--	--	--	--	--	--	--	--
5,13-DiMeC21	2	7,1	4,1	--	--	--	--	--	--	--	3,1	4,1	3,1	3,1	1,1	--	--	--
	15	1,10	12,15	--	--	--	--	--	--	--	9,17	19,19	3,3	3,3	6,65			
10-,11-MeC21	2	--	--	--	--	--	2,75	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11,19-DiMeC21	2	4,1	2,1	--	--	--	--	--	--	--	1,1	2,1	2,1	2,1	1,1	--	--	--
	18	0,80	19,17	--	--	--	--	--	--	--	19,19	15,15	8,8	8,8	4,56			
<i>n</i> -C22	2	5,14	14,16	--	--	--	--	--	--	--	1,1	2,1	1,1	1,1	0,1	--	--	--
	10										13,10	14,14	2,1	1,1	29,32			
C23:1	2	34,1	0,1	1,1	0,1	--	--	--	--	--	4,1	9,1	18,1	1,1	2,1	--	--	--
	17	1,76	16,17	--	18,17	17,17	--	--	--	--	16,19	19,19	10,10	11,11	4,4	31,62		
<i>n</i> -C23	2	3,83	--	21,17	--	--	9,15,4	0,41	7,50	13,20,0	--	--	--	--	--	--	--	--
	10																	
10-,11-,12-MeC23	2	5,1	3,1	--	--	--	1,46	--	--	--	2,1	3,1	3,1	2,1	0,1	--	--	--
	14	0,74	13,12	--	--	--	--	--	--	--	12,18	10,10	9,9	7,7	4,67			
10,16-DimeC23	2	4,1	2,1	--	--	--	--	--	--	--	1,1	2,1	2,1	1,1	0,1	--	--	--
	16	0,72	18,15	--	--	--	--	--	--	--	15,18	14,14	6,6	9,9	3,06			
4-MeC23	2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,1	--	--	--
	17														3,3			
<i>n</i> -C24	2	2,1	0,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	10	2,48	14,17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>n</i> -C25	2	0,1	0,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	10	1,65	--	10,14	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
13-MeC25	2	3,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	14	--	1,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10-,11-,12-,13-MeC25	2	0,41	--	12,1	--	--	--	--	--	--	17,17	12,12	8,8	4,4	2,21			
	13																	
4-MeC25	2	2,1	1,1	--	--	--	--	--	--	--	0,1	1,1	1,1	1,1	0,1	--	--	--
	11	0,38	14,19	--	--	--	--	--	--	--	13,18	16,16	4,4	6,6	1,73			

11,21-DiMeC33; 13,33-DiMeC33	3 19	3,58	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3-MeC33	3 13	0,79	--	--	0,7	--	3,4	--	2,08	--	--	0,7	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C34	3 10	0,20	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,94	--	--	--	--
11-,12-,13-MeC34	3 17	0,36	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
13,17,23-TriMeC34	3 17	--	--	--	--	--	0,4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
9,17,25-TriMeC34	3 19	--	--	--	1,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C35	3 10	--	--	--	1,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11-,13-,15-,17-MeC35	3 10	0,81	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
9-,10-,11-,12-,13-,14-MeC35	3 18	--	--	--	--	--	0,3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11,21-,13,25-DiMeC35	3 17	2,82	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11,15,21-,11,15,23-,11,15,25-,11,15,27-MeC35	3 15	1,54	--	--	0,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
13,17,23-TriMeC35	3 19	--	--	--	--	--	8,6	--	4,52	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
x,y-DiMeC35	3 12	--	--	--	1,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C36	3 10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6,6	1	--	--	--	--	--	--	--	--
11,15,25-TriMe36	3 10	--	--	--	--	1,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C37	3 10	--	--	--	--	1,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11-,13-,15-,17-MeC37	3 16	0,55	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
7,11-DiMeC37	3 12	--	--	--	1,8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
13,21-,13-23-DiMeC37	3 10	0,96	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
13,17,25-,15,19,25-,15,19,27-TriMeC37	3 13	2,20	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
13,19-,15,21-DiMeC37	3 13	--	--	--	--	--	--	--	--	--	6,6	2	--	--	--	--	--	--	--	--
15,19,25-TriMeC37	3 16	--	--	--	7,4	3,3	--	--	6,29	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15,19,21-TriMe37	3 13	--	--	--	--	10,52	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

15,19,23-TriMeC37	3	74	0,34	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
16,22-DiMeC37	3	17	--	--	--	13	--	--	0,89	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C38	3	10	1,08	--	--	17	--	10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
x-MeC38	3	12	--	--	--	10	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
17,21,27-TriMeC38	3	12	--	--	--	12	11	13	--	2,04	--	--	--	--	--	--	--	--	--
3-MeC38	3	18	--	--	--	15	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
9,17-DiMeC38	3	17	--	--	--	15	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C39	3	10	0,89	--	--	--	--	17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
13-,15-,17-,19-MeC39	3	15	--	--	--	--	--	--	2,04	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11-,13-,15-,17-MeC39	3	13	--	--	--	13	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
9-,11-,13-MeC39	3	19	--	--	--	--	--	19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
11,21-,13,23-DiMeC39	3	17	3,43	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15,19-DiMeC39	3	12	--	--	--	19	17	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15,23-DiMeC39	3	17	--	--	--	--	--	11	--	3,87	--	--	--	--	--	--	--	--	--
15,19,25-TriMeC39	3	10	7,83	--	13	45	25	18	--	6	--	13	--	--	--	--	--	--	--
x,y-DiMeC39	3	18	--	--	--	--	--	--	2,41	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
16,22-DiMeC39	3	16	0,57	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
x,y-DiMeC39	3	17	--	--	--	18	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C40	4	10	0,95	--	--	--	--	14	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C41	4	10	--	--	--	11	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
n-C42	4	10	--	--	--	19	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

tracejado: não detectado ou abaixo de 0,1%

