

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Vagner José Mendonça

“Análise da relação filogenética entre *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002 e *T. brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
VAGNER JOSÉ MENDONÇA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Parasitologia, na área de Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M523a

Mendonça, Vagner José

Análise da relação filogenética entre *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002 e *T. brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear / Vagner José Mendonça. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: João Aristeu da Rosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. DNA mitocondrial. 2. Filogenia. 3. Parasitologia molecular. 4. Triatoma. I. Rosa, João Aristeu da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Phylogenetics relationships within the *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002 and *T. brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae) using on sequencing of the nuclear and mitochondrial genes.

Palavras-chave em inglês: Mitochondrial DNA; Phylogeny; Molecular parasitology; Triatoma.

Titulação: Mestre em Parasitologia.

Banca examinadora: João Aristeu da Rosa, Mara Cristina Pinto, Maurício Bacci Júnior.

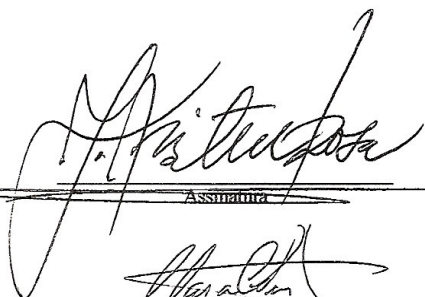
Data da defesa: 26/07/2007.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 26 de Julho de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa



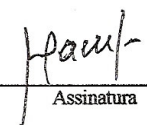
Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Mara Cristina Pinto



Assinatura

Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior



Assinatura

Prof^ª. Dr^ª. Urara Kawazoe

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Furtado dos Reis

Assinatura

Agradeço e dedico este trabalho:

- Aos meus pais José e Aparecida, pela presença e apoio em todos os momentos da minha vida, dando-me força e encorajamento para buscar todos os objetivos que almejo.

- Às minhas irmãs Denise e Adriana, que com suas experiências muito me auxiliaram nessa caminhada, e aos meus sobrinhos Caike, Michelle, Morgana e Miguel, pela juventude e muito amor que nos fazem acreditar na continuidade da vida.

- Ao meu avô Horácio e sua esposa Teresa, pela intensa admiração que tenho por eles e pela imensa força concedida nesta fase de minha vida.

- À minha noiva Fernanda que sempre ao meu lado muito me ensinou por conta da sua fibra e dedicação em todas as circunstâncias da vida.

Agradecimentos:

- Ao orientador Prof. Dr. João Aristeu da Rosa pela dedicada orientação e empenho com que conduziu este projeto, sempre me apoiando e incentivando-me a realizar as tarefas.
- À Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, responsável pelo Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e Vetores da FCFAr, UNESP, pela confiança depositada para o desenvolvimento do projeto em seu laboratório, pelos conhecimentos teóricos e práticos transmitidos e principalmente pela amizade construída.
- Ao doutorando Marco Túlio Alves da Silva, Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP, Araraquara, pelo companheirismo, ensinamentos e dedicação no desenvolvimento do projeto.
- À técnica Maria Zenaide Tita Fernandes da disciplina de Parasitologia da FCFAr, UNESP, pelo apoio, amizade e admiração.
- Aos técnicos João Luis Molina Gil e João Maurício Nóbrega da Silva Filho do Insetário de Triatominae localizado no Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA/USP) pelo fornecimento de exemplares de *Triatoma brasiliensis* e informações relevantes do material entomológico utilizado.
- À Pesquisadora Dra. Jane Margaret Costa do Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Entomologia, que cedeu exemplares da espécie *Triatoma melanica* utilizados nas análises.
- Ao Renato Freitas de Araújo, da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia que propiciou a coleta de *Triatoma sherlocki*.

- Ao Raimundo Gonçalves Dantas Filho, Gilberto Alves de Brito, Gilton Alves da Mota e Pedro Evangelista do Sacramento Filho da Secretaria da Saúde do Estado da Bahia, que auxiliaram na coleta de *Triatoma sherlocki* realizada em 23/07/2003 no distrito de Santo Inácio, Bahia.
- À Secretaria de Saúde do Estado da Bahia que forneceu o transporte de Salvador para Santo Inácio, bem como liberou a equipe que auxiliou na coleta.
- Às pós-graduandas Joyce Aparecida Martins e Greiciane Gaburro Paneto, do Laboratório de Paternidade da disciplina de Imunologia da FCFAr, UNESP, pelo sequenciamento realizado para as amostras estudadas.
- Ao Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior do Centro de Estudos de Insetos Sociais, do Instituto de Biologia da UNESP/Rio Claro, pela disponibilidade em auxiliar nas análises filogenéticas realizadas.
- Ao doutorando Joaquim Martins do Centro de Estudos de Insetos Sociais, do Instituto de Biologia da UNESP/Rio Claro, pela disponibilidade em auxiliar nas análises realizadas e pelo conhecimento teórico e prático transmitidos.
- À Profa. Dra. Mara Cristina Pinto da disciplina de Parasitologia da FCFAr, UNESP, pelo imenso apoio concedido e dedicação durante todo o processo de desenvolvimento do projeto.
- À Profa. Dra. Márcia Aparecida da Silva Graminha da disciplina de Parasitologia Clínica do departamento de Análises Clínicas da FCFAr, UNESP, pelos primeiros conceitos e conhecimentos transmitidos a respeito dessa linha de pesquisa.
- Às professoras Drs. Ana Maria Guaraldo e Marlene Tiduko Ueta do Departamento de Parasitologia da UNICAMP pela imensa gratidão por todo apoio e carinho que muito me auxiliaram para uma formação digna.

- À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida e ao auxílio destinado para o desenvolvimento do projeto.
- À FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP), pelo financiamento de parte do projeto.
- Aos secretários Marco Antônio de Oliveira do Departamento de Parasitologia da UNICAMP e à Aparecida Bernadete Rocateli Jesus do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAr/UNESP pelo apoio técnico e serviços de secretarias.
- À funcionária Sebastiana Cândida da Silva da recepção da FCFAr/UNESP pela amizade e consideração aos auxílios prestados.
- Aos amigos Ricardo e Laerte, pelo acolhimento e consideração durante as idas à Campinas.
- Aos pós-graduandos Júlio César Miné e Cláudia Solano Rocha pela amizade, companheirismo e solidariedade que muito auxiliaram na estruturação e discussão do projeto.
- Às Professoras Drs. Eliana Maria Zanotti-Magalhães, Silmara Marques Allegretti e Urara Kawazoe do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biologia, UNICAMP, pela participação e contribuição no Exame Geral de Qualificação e que muito auxiliaram na discussão do projeto.

SUMÁRIO

Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xiv
Lista de abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
I. Introdução	1
I.1 Doença de Chagas	1
I.2 Triatominae, os vetores	6
I.3 Sistemática e marcadores moleculares	9
I.4 <i>Triatoma sherlocki</i>	13
I.5 <i>Triatoma brasiliensis</i>	14
II. Objetivos	16
III. Materiais e Métodos	17
III.1 Insetos	17
III.2 Tampões e soluções	18
III.3 Extração do DNA genômico	18
III.4 Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)	19
III.5 Iniciadores	20
III.6 Eletroforese convencional	22
III.7 Purificação dos fragmentos amplificados	22
III.8 Reação de ligação e clonagem em vetor comercial	23
III.9 Preparação de bactérias ultracompetentes	23
III.10 Reação de transformação	24
III.11 Extração de DNA plasmidial de bactéria (Miniprep)	24
III.12 Sequenciamento	25
III.13 Análises filogenéticas	26
IV. Resultados	27
IV.1 Extração do DNA genômico	27
IV.2 Genes mitocondriais	28

	• Citocromo b (<i>cytb</i>)	28
	• Grande subunidade ribossomal (<i>16S</i>)	47
IV.3	Genes nucleares	57
	• Grande subunidade ribossomal D2 (<i>28S</i>)	57
	• Espaçador Interno Transcrito 2 (ITS-2)	64
V.	Discussão	72
VI.	Conclusões	77
VII.	Referências Bibliográficas	78
VIII.	Anexos	90
	Anexo I	90
	Anexo II	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	DNA ribossomal	11
Figura 2	DNA mitocondrial	12
Figura 3	DNAg de <i>T. sherlocki</i> , <i>T. brasiliensis</i> (CTA 076 – SESA) e <i>T. melanica</i> .	27
Figura 4	PCR do gene do citocromo b de <i>T. sherlocki</i> , <i>T. brasiliensis</i> (CTA 076 – SESA) e <i>T. melanica</i> .	28
Figura 5	Miniprep das bactérias transformadas com o citocromo b de <i>T. sherlocki</i> e <i>T. brasiliensis</i> (CTA 076 – SESA).	29
Figura 6	PCR da miniprep para confirmação da ligação do gene do citocromo b do <i>T. sherlocki</i> e <i>T. brasiliensis</i> (CTA 076 – SESA) no vetor.	30
Figura 7	Alinhamento das seqüências do gene do citocromo b das espécies <i>T. sherlocki</i> , <i>T. brasiliensis</i> (CTA 076 – SESA), haplótipos de <i>T. brasiliensis</i> (Monteiro <i>et al.</i> , 2004), <i>Rhodnius robustus</i> e <i>Arilus cristatus</i> .	31
Figura 8	Filogenia inferida a partir do alinhamento das seqüências do gene do citocromo b construída com algoritmo <i>Neighbor Joining</i> e parâmetro <i>p-distance</i> envolvendo as espécies <i>T. sherlocki</i> , <i>T. brasiliensis</i> (CTA 076 – SESA), haplótipos do <i>T. brasiliensis</i> (Monteiro <i>et al.</i> , 2004), <i>R. robustus</i> e <i>A. cristatus</i> .	35
Figura 9	Filogenia inferida baseada em parâmetro Máxima Parcimônia do alinhamento das seqüências do gene do citocromo b das espécies <i>T. sherlocki</i> , <i>T. brasiliensis</i> (CTA 076 – SESA), haplótipos de <i>T. brasiliensis</i> (Monteiro <i>et al.</i> , 2004), <i>R. robustus</i> , <i>P. megistus</i> e <i>A. cristatus</i> .	37
Figura 10	Alinhamento das seqüências do gene do citocromo b das espécies <i>T. sherlocki</i> , <i>T. brasiliensis</i> (CTA 076 – SESA), haplótipos H e I de <i>T. brasiliensis</i> (Monteiro <i>et al.</i> , 2004), outras espécies dos gêneros <i>Triatoma</i> , <i>Dipetalogaster</i> , <i>Panstrongylus</i> (tribo Triatomini), <i>Rhodnius</i> , <i>Psammolestes</i> (tribo Rhodniini) e <i>A. cristatus</i> .	38
Figura 11	Filogenia inferida baseada em parâmetro <i>Kimura-2</i> do alinhamento das seqüências do gene do citocromo b das espécies <i>T. sherlocki</i> , <i>T. brasiliensis</i>	41

(CTA 076 – SESA), haplótipos H e I de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) e de outras espécies do gênero *Triatoma*, *Dipetalogaster* e *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

- Figura 12** Filogenia inferida baseada em parâmetro Máxima Parcimônia do alinhamento das seqüências do gene do citocromo b das espécies *T. sherlocki* *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), haplótipos H e I de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), outras espécies do gênero *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*. **43**
- Figura 13** Alinhamento das seqüências de 133 aminoácidos do gene do citocromo b observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 - SESA), haplótipos H e I do *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster* e *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*. **44**
- Figura 14** Filogenia inferida baseada em parâmetro *p-distance* das seqüências de 133 aminoácidos do gene do citocromo b das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), haplótipos H e I do *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster* e *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*. **45**
- Figura 15** PCR do gene da grande subunidade ribossomal (*16S*) em *T. sherlocki*, *T. melanica* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA). **47**
- Figura 16** Miniprep das bactérias transformadas com o da grande subunidade ribossomal (*16S*) *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica*. **48**
- Figura 17** PCR da miniprep para confirmação da ligação do gene da grande subunidade ribossomal (*16S*) do *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica* no vetor. **48**
- Figura 18** Alinhamento das seqüências do gene da grande subunidade ribossomal (*16S*) das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo

Triatomini), *Rhodnius*, *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

- Figura 19** Filogenia inferida baseada em parâmetro *Kimura-2* construídas a partir do alinhamento das seqüências do gene da grande subunidade ribossomal (16S) das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*. **52**
- Figura 20** Filogenia inferida baseada em parâmetro Máxima Parcimônia a partir das seqüências alinhadas do gene da grande subunidade ribossomal (16S) das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, outras espécies do gênero *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*. **53**
- Figura 21** Filogenia inferida baseada em parâmetro Máxima Parcimônia a partir das seqüências alinhadas dos genes do citocromo b e da grande subunidade ribossomal (16S) das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, outras espécies do gênero *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*. **55**
- Figura 22** PCR do gene da grande subunidade ribossomal (28S) de *T. sherlocki*, *T. melanica* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA). **57**
- Figura 23** Miniprep das bactérias transformadas com o gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) de *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica*. **58**
- Figura 24** PCR da miniprep para confirmação da ligação do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) de *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica* no vetor. **59**
- Figura 25** Alinhamento das seqüências do gene da grande subunidade ribossomal (28S) das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, *R. robustus*, *R. prolixus*, *R. nasustus* e *Corythucha sp.* **60**
- Figura 26** Filogenia inferida com algoritmo *Neighbor Joining* utilizando parâmetro *Kimura-2* a partir do alinhamento das seqüências do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* **62**

(CTA 076 - SESA), *T. melanica*, *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. nasutus* e *Corythucha sp.*

- Figura 27** Filogenia inferida baseada em parâmetro Máxima Parcimônia a partir das seqüências alinhadas do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, *R. robustus*, *R. prolixus*, *R. nasutus* e *Corythucha sp.* **63**
- Figura 28** PCR do gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) de *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica*. **64**
- Figura 29** Miniprep das bactérias transformadas com o gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) de *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA). **65**
- Figura 30** PCR da miniprep para confirmação da ligação do gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) de *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) no vetor. **66**
- Figura 31** Alinhamento das seqüências do gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) das espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, outras espécies da Tribo Triatomini (*D. maxima* e *P. megistus*) e *R. prolixus*. **67**
- Figura 32** Filogenia inferida com algoritmo *Neighbor Joining* utilizando parâmetro *Kimura-2* a partir do alinhamento das seqüências do gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) nas espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 - SESA), *T. melanica*, outras espécies da Tribo Triatomini (*D. maximus* e *P. megistus*) e *R. prolixus*. **69**
- Figura 33** Filogenia inferida baseada em parâmetro Máxima Parcimônia a partir das seqüências alinhadas do gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) nas espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, outras espécies da Tribo Triatomini (*D. maximus* e *P. megistus*) e *R. prolixus*. **70**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Código de acesso no GenBank das seqüências utilizadas nos alinhamentos dos genes mitocondriais e nucleares para inferir possíveis relações filogenéticas entre diversas espécies de triatomíneos. Disponível em: “National Center for Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov).	90
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius

CaCl₂: cloreto de cálcio

CI: Índice de Consistência

Cyt b: citocromo b

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EDTA: Ethylene Diamine Tetracetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ETS: espaçador externo transcrito

g: força da gravidade

gDNA: DNA genômico

HI: Índice de Homoplasia

H₂O: água

IGS: espaçador intergênico

ILD: Incongruence Length Difference

IPTG: isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside

ITS: espaçador interno transcrito

Kb: Kilobase (1000 pares de bases)

KCl: Cloreto de potássio

KOAc: Acetato de Potássio

LSU: subunidade maior do gene do RNA ribossomal

M: molar

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

MOPS: 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

mtDNA: DNA mitocondrial

mtlsubr: grande subunidade ribossomal do genoma mitocondrial

μL: microlitro
μM: micromolar
NaCl: Cloreto de sódio
NaOAc: Acetato de sódio
ng: nanograma
nm: nanômetro
OD: optical density
PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony
pb: pares de bases
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pDNA: DNA plasmidial
PM: Marcador de peso molecular
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
RC: Índice de Consistência Rescalonado
rDNA: DNA ribossomal
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
RI: Índice de Retenção
RNA: Ácido ribonucléico
rpm: rotações por minuto
SESA: Serviço Especial de Saúde de Araraquara
SSU: subunidade menor do gene do RNA ribossomal
Tris-HCl: Tris-Ácido clorídrico
U: unidade
UV: luz ultravioleta
V: Volts

RESUMO

Triatomíneos silvestres coletados por Cerqueira em 1975 em Santo Inácio/BA foram estudados por Papa *et al.* (2002) que concluíram tratar-se de uma nova espécie, denominada *T. sherlocki* ao compará-la com outros Triatominae. No intuito de ampliar o conhecimento dessa nova espécie e inferir relação filogenética para as espécies da subfamília Triatominae foram sequenciados genes nucleares, *ITS-2* e *28S*, e mitocondriais, *citocromo b* e *16S*, de *T. sherlocki* e *T. brasiliensis*. As seqüências foram alinhadas no programa Clustal W do BioEdit e as relações filogenéticas construídas utilizando metodologias de distâncias com os parâmetros p-distance e Kimura-2 do algoritmo Neighbor-Joining, do programa MEGA 3.1, e Máxima Parsimônia, do programa PAUP 4.1. A filogenia baseada nos dois genes mitocondriais revelou que a espécie *T. sherlocki* é estritamente relacionada com a espécie *T. melanica*, e que *T. brasiliensis* aparece como espécie-irmã dessas duas, exceção para a análise de Parcimônia do gene *16S* que apresenta *T. melanica* como espécie-irmã da relação mais estreita entre *T. sherlocki* e *T. brasiliensis*. *P. megistus* e *T. infestans* aparecem relacionadas com espécies norte-americanas nas filogenias inferidas do gene *16S* e das seqüências dos aminoácido do *citocromo b*, respectivamente. A filogenia baseada no gene nuclear *28S* revelou uma politomia envolvendo as espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* e *T. melanica*. Essa filogenia foi subestimada pelo baixo número de espécies presentes na árvore. Essa mesma relação ocorreu na filogenia do gene do *ITS-2* na análise baseada em Parcimônia. A análise de distância desse gene revelou a proximidade entre *T. sherlocki* e *T. brasiliensis*, com *T. melanica* como espécie-irmã. Essa filogenia apresentou as espécies *T. maculata*, *T. brasiliensis* e *T. infestans* estritamente relacionadas com espécies de triatomíneos norte-americanas. Algumas espécies como *T. infestans* e *P. megistus* apresentaram mais de uma topologia dependendo do gene analisado, sendo necessários mais estudos para definir uma posição filogenética dessas espécies. A proximidade de *T. sherlocki* com os haplótipos de *T. brasiliensis*, principalmente com a espécie *T. melanica*, pode inferir uma possível filogeografia a partir de ancestrais de *T. brasiliensis*, tratando-se portanto de espécies derivadas.

ABSTRACT

Wild triatomines collected by Cerqueira in 1975 in Santo Inácio, BA, Brazil were studied by Papa *et al.* (2002), who observed morphological differences from other species of the Triatominae, concluding that they represented a new species, named *Triatoma sherlocki*. Mitochondrial (*cytochrome b* and *16S*) and nuclear (*ITS-2* and *28S*) gene sequencing of *T. sherlocki* and *T. brasiliensis* was carried out with the aim of learning more about the new species and its phylogenetic relationship to the species of the Triatominae subfamily. The sequences were aligned with the Clustal W application of the BioEdit freeware program and the phylogenetic relationship inferred by estimating distances with the Kimura 2-parameter and p-distance methods of the Neighbor-Joining algorithm in the MEGA 3.1 program and Maximum Parsimony (MP) method of the PAUP 4.1 program. The phylogeny based on the two mitochondrial genes disclosed that *T. sherlocki* and *T. melanica* were closely related and that *T. brasiliensis* was a sister species of the two, with the exception that in for the Parsimony analysis of the *16S* gene, *T. melanica* appeared as a sister species of the clade formed by *T. sherlocki* and *T. brasiliensis*. The species *Panstrongylus megistus* and *T. infestans* are related to North American species in phylogenetic analyses of the large subunit ribosomal RNA mitochondrial gene (*16S*) and the amino acid sequences of *cytochrome b*, respectively. The phylogeny based on the large subunit ribosomal D2 (*28S*) nuclear gene revealed to a polytomy involving *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* and *T. melanica*. This phylogeny was underestimated due to the small number of species present in the tree. This same relationship occurred in the phylogeny of internally transcribed spacer 2 (*ITS-2*) nuclear gene, in analysis based on Maximum Parsimony. The analysis of distance in this gene revealed proximity between *T. sherlocki* and *T. brasiliensis*, with *T. melanica* as sister species. This phylogeny showed *T. maculata*, *T. brasiliensis* and *T. infestans* to be closely related to North American triatomines. Certain species, such as *T. infestans* and *P. megistus*, exhibited more than one topology with different genes, and further study is needed to define the phylogenetic positions of these species. The proximity of *T. sherlocki* to the *T. brasiliensis* haplotypes, especially with the species *T. melanica*, may reveal a possible phylogeography originating from *T. brasiliensis* ancestors, thus implying derived species.

I. INTRODUÇÃO

I.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanosomíase americana foi descrita pelo médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas em 1909, que descreveu praticamente todos os aspectos da doença, como o agente causador, o transmissor, o modo de transmissão da doença, a existência de vertebrados funcionando como reservatórios silvestres e domésticos do parasito e ainda a patogenia e sintomatologia que a mesma pode causar ao homem, esclarecendo assim os aspectos básicos da epidemiologia da doença. A doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, e é transmitida para os vertebrados principalmente por meio das fezes de insetos da subfamília Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) contaminadas com as formas infectantes do *T. cruzi* (Chagas, 1909; Dias, 2000).

Todas as espécies da subfamília Triatominae são suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* e consequentemente potenciais vetores do protozoário. A infecção ocorre a partir da alimentação com sangue de mamífero infectado, sendo todos os estádios ninfais sujeitos a ingerirem o parasito, uma vez que a hematofagia é obrigatória em todas as fases de vida dos triatomíneos (Dias, 2000).

Segundo dados recentes da Organização Mundial de Saúde, estima-se que existam entre 16 e 18 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* na América Latina e aproximadamente 120 milhões vivendo sob risco de transmissão. Apesar do decréscimo da taxa de incidência nos últimos 20 anos, de 700.000 a 800.000 nos anos 80 para 200.000 atualmente, a doença de Chagas é um dos problemas de saúde pública mais importante da América Latina (WHO, 2002, 2005).

A prevalência de infecção por *T. cruzi* na população, entre os anos 1980-1985, de países que mantém programas de controle da doença de Chagas foi de 10,0% na Argentina, 4,2% no Brasil, 3,4% no Uruguai e 3,0% na Venezuela. Nos países onde programas de controle têm sido recentemente organizados, a infecção por *T. cruzi* na população no mesmo período foi de 24,0% na Bolívia, 30,0% na Colômbia e 16,6% na Guatemala. Países onde não existem programas de controle para a doença de Chagas, a infecção por *T. cruzi* na população no mesmo período foi de 11,7% na Costa Rica, 10,7% no Equador e 20,0% em El Salvador (WHO, 2002).

A estimativa de infectados por *T. cruzi* em países não endêmicos, como é o caso dos Estados Unidos, onde supõe estarem vivendo entre 100.000 e 370.000 pessoas infectadas; do Japão, com 150.000; da Austrália, com 80.000, e da Europa, com 250.000. Tais estimativas são decorrentes principalmente da emigração e pela falta de triagem em bancos de doação de sangue nesses países (Schmuñis, 2000).

Nas zonas rurais da América Latina, o principal mecanismo de transmissão da doença de Chagas são as fezes de triatomíneos contaminadas com o *T. cruzi*, que penetram no hospedeiro por meio de escoriações, pequenas feridas ou pelas mucosas, correspondendo 80% a 90% dos casos da doença (Aras *et al.*, 2003).

A frequência de infecção de seres humanos por meio do vetor está relacionada ao nível sócio-econômico da população e à capacidade de domiciliação dos triatomíneos. O ciclo doméstico da doença de Chagas humana é definido por fatores antrópicos, no qual uma série de condições ecológicas e político-sociais aproximou populações humanas do ciclo enzoótico ao longo dos anos no Novo Continente. Deslocamentos humanos, ocorridos principalmente nos séculos XVIII e XIX, propiciaram contatos entre homens, vetores, agentes e reservatórios, tendo como consequência o aparecimento de inúmeras enfermidades, como a tripanosomíase, a leishmaniose e a malária (Schmuñis, 2000; Dias, 2000).

Têm-se registro da doença de Chagas na região Andina desde o período Pré-Colombiano, onde foram encontradas múmias Chilenas e Peruanas com lesões típicas da doença (Rothhammer *et al.*, 1985). A presença do *T. cruzi* nas múmias foi confirmada por meio de seqüências de fragmentos amplificados do genoma que correspondiam ao protozoário (Guhl *et al.*, 1999).

De modo geral, a doença de Chagas emerge de um contexto ecológico intimamente relacionado à forma de viver e à história natural de seu agente etiológico com seus reservatórios superiores (mamíferos) e com os insetos vetores. A doença de Chagas ocorre como enzootia há muitos séculos no ambiente silvestre do Continente Americano, afetando o ser humano num ciclo particular, doméstico, decorrente de migrações, de invasão do ambiente natural e de múltiplas ações de caráter antrópico (Dias & Coura, 1997).

Antes da alteração ambiental provocada pelo homem, o *T. cruzi* era encontrado somente no meio silvestre, circulando entre vetores e mamíferos do ambiente natural. Após a devastação florestal e ocupação desses ecótopos, o homem passou a fazer parte desse ciclo. Vivendo em casas mal construídas e em estado precário, o homem ofereceu aos triatomíneos condições

propícias à colonização. Muitas espécies adaptaram-se ao domicílio e essa condição é primordial para a ocorrência da tripanosomíase americana. Desta forma, a transmissão vetorial, por meio das fezes dos triatomíneos infectadas pelo *T. cruzi*, passou a ser o mecanismo primário de difusão da doença. É claramente perceptível que a distribuição da doença quase sempre acompanha a distribuição da pobreza, e, por seu caráter crônico e rural, não é tratada com a atenção merecida (Vinhaes & Dias, 2000; Silveira, 2000).

A expansão da doença de Chagas humana é um produto da ocupação errática e da colonização desprogramada na América Latina. Essa teoria é sustentada baseada em três elementos principais: a) profundas ações sobre o meio natural, como queimadas e desmatamentos extensivos promovendo a abertura dos espaços naturais e carreando para ecótopos artificiais reservatórios e vetores silvestres da tripanosomíase americana; b) existência de ranchos e outras vivendas de má qualidade propiciando a adaptação dos vetores ao processo de domiciliação; c) migrações e grandes deslocamentos populacionais, carreadores da própria infecção e de vetores com alta capacidade de domiciliação (Martins, 1968; Forattini, 1980; Dias, 1988).

Sendo a doença de Chagas uma zoonose, sua erradicação torna-se utópica. Sempre haverá o risco de domiciliação de vetores silvestres e da infecção humana acidental (Silveira & Vinhaes, 1999). Devido ao grande número de reservatórios selvagens e domésticos, e conseqüente inviabilidade de seu esgotamento, aliado ainda à indisponibilidade de vacinas e drogas para tratamento da fase crônica da doença, a única possibilidade de combate à doença, reside na redução ou interrupção da transmissão vetorial, focada no controle de populações domiciliadas (Silveira, 2000).

Como exemplos clássicos da expansão da doença de Chagas humana, determinada por elementos históricos e sociais, mencionam-se a dispersão do *T. infestans* a partir da invasão espanhola, do incremento das lavouras e do mercado do café, possibilitando a urbanização desse vetor na Bolívia e no Peru mediante intensa migração rural e sua dispersão para as regiões petrolíferas da Argentina. Intensas modificações no ambiente geraram importantes deslocamentos populacionais, ensejando a progressiva colonização e dispersão de triatomíneos nativos, levando em consideração as más condições de habitação (Dias & Borges-Dias, 1979). De modo similar, a domiciliação de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 na casa rural venezuelana e a dispersão de *T. dimidiata* Latreille, 1811 por lenha na América Central evidenciam questões ecológicas ligadas a fatores comportamentais e político-sociais (Dias, 2007).

Além da transmissão por meio do vetor, a segunda forma mais importante de transmissão é a transfusional e está presente também em países onde a transmissão pelo vetor é rara ou não existe, caso dos Estados Unidos e do Canadá, respectivamente. Nesses países foram documentados casos da doença pela via transfusional envolvendo doadores de sangue que tinham origem em países endêmicos para a tripanosomíase americana (Leiby *et al.*, 2002).

Mediante mudanças importantes no sistema de produção e intensa migração, a doença se urbanizou em grande velocidade e indivíduos infectados se dispersaram para áreas não endêmicas da América do Norte e Europa, levando-se riscos de transmissão transfusional (Dias & Borges-Dias, 1979; Schmuñis & Dias, 2000).

Estima-se que cerca de 70% dos “chagásicos brasileiros” vivam no espaço urbano, estando 50% desse grupo em fase latente da doença, aumentando o risco de propagação em bancos de doação de sangue que não realizam triagem (Moraes-Souza, 1999). No Brasil existem seis milhões de doadores de sangue por ano, dos quais se supõem que 7% tenham sorologia positiva para Chagas, provavelmente sendo responsáveis por cerca de 20.000 pessoas que contraem a doença em consequência de transfusões sangüíneas, aproximadamente 10% da incidência global anual estimada para o Brasil (Storino *et al.*, 1993). Nas próximas décadas, certamente o meio rural estará ainda mais esvaziado, diminuindo-se as densidades de indivíduos suscetíveis nas zonas rurais (Dias, 2007).

Outra forma de contágio é a transmissão congênita descrita em países como a Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Guatemala, Honduras, Paraguai, Uruguai e Venezuela, cuja incidência de recém-nascidos infectados, filhos de mães com sorologia positiva, foi de 2-3% entre os anos de 1980-85 (Schmuñis, 2000).

A contaminação por via oral do *T. cruzi* é um meio de transmissão menos convencional que as descritas anteriores. A transmissão ocorre de forma acidental por meio da ingestão de alimentos contaminados pelas fezes de vetores contendo as formas infectantes do protozoário. No caso dos animais, esses podem se infectar ao lamberem a pele com fezes de triatomíneos contaminadas ou pela ingestão de tais insetos infectados. Mães infectadas podem transmitir formas evolutivas do parasito durante a amamentação, seja pelo próprio leite ou por meio de escoriações ou inflamações do mamilo (Moreno & Carcavallo, 1999).

A prioridade ao combate da doença de Chagas sempre foi renegada devido ao seu caráter crônico e rural, acometendo populações carentes, sem condição de reivindicação de suas

necessidades. Senão por compromisso social, estudos de custo-benefício mostram a importância do combate à doença (Silveira, 2000).

A doença de Chagas produz perdas sociais importantes nas áreas endêmicas, em termos de mortalidade, absenteísmo, incapacidade laboral e custos médico-sociais, números esses geralmente ignorados por políticos e governos, tanto em virtude da evolução crônica e pouca visibilidade da doença como, principalmente, pelo anonimato da população exposta ou afetada pela doença (Dias & Coura, 1997).

Estudos têm demonstrado que a doença de Chagas humana representa altos custos financeiros nas áreas afetadas, sendo que os investimentos em sua prevenção podem alcançar excepcionais taxas de retorno econômico e social (Akhavan, 2000). Não obstante, frente à realidade política da globalização, esse argumento tem se mostrado muito débil e pouco eficaz quanto à priorização dos programas de controle, devido principalmente a dois fatores: a) o próprio “valor específico” da população infectada, que se mostra anônima e distante do mercado formal de trabalho e não tem representatividade política, e b) a pequena visibilidade dos efeitos benéficos dos programas em curto prazo, pois a doença tem evolução longa e geralmente silenciosa (Schmuñis & Dias, 2000).

No Brasil, os dados obtidos a partir de inquéritos de soro-prevalência na população e inquéritos entomológicos, no ano de 1975, quando se delimitou uma área de risco de transmissão domiciliar de 36% e uma taxa de prevalência de 4,2% na população rural, estimularam a criação da **Iniciativa Cone Sul** em 1991, cujo principal objetivo dos países participantes, Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai é o combate ao principal vetor, o *Triatoma infestans*, além da redução do risco de transmissão por transfusão sanguínea (Dias *et al.*, 2000; Vinhaes & Dias, 2000).

O sucesso da **Iniciativa Cone Sul** foi constatado pela redução da área de distribuição do principal vetor, o *Triatoma infestans*, e pelo declínio nas taxas de infecção de crianças nascidas desde o início do programa (Schmuñis, 2000; Silveira & Vinhaes, 1999). Os progressos alcançados incluem o certificado de interrupção da transmissão vetorial e transfusional da doença de Chagas no Uruguai, Chile e em sete estados, antes endêmicos, do Brasil (Dias *et al.*, 2002a). O sucesso do Cone Sul estimulou outras iniciativas na América Central e na região do Pacto Andino, possibilitando notáveis avanços na interrupção da transmissão na Venezuela (WHO, 1999).

Estima-se que, nos próximos 10 anos, haja um retorno de U\$45 dólares para cada dólar investido no combate à transmissão da doença de Chagas nos países participantes da **Iniciativa Cone Sul**. No Brasil, para cada dólar investido em prevenção, são salvos U\$ 17,50 em custo médico (Moncayo, 1999).

O Word Bank, em 1993, calculou uma perda anual de 2.740.000 indivíduos que deixaram de exercer suas funções habituais, por mortalidade ou incapacidade devido à doença de Chagas, somando um prejuízo anual de US\$ 6,5 bilhões na economia dos países da América Latina (Schofield & Dias, 1999).

O aquecimento global do planeta e seus possíveis impactos preocupam pesquisadores de diversas áreas. Os impactos das mudanças climáticas sobre a saúde humana têm sido muito discutidos. Com referência à doença de Chagas, as prováveis alterações na biologia dos insetos vetores seriam modificações na distribuição geográfica das espécies, alterações no mecanismo de dispersão pelo vôo, aumento do número de repastos e da probabilidade de infecção/transmissão, aceleração do ciclo biológico e crescimento populacional (Dias *et al.*, 2002).

I.2 Triatominae, os vetores

Os triatomíneos são insetos classificados na ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae (Lent & Wygodzinsky, 1979), cuja primeira espécie descrita da subfamília Triatominae é conhecida atualmente como *Triatoma rubrofasciata* De Geer, 1773 (Lent & Wygodzinsky, 1979). Compreende uma subfamília de grande interesse médico e ecológico, caracterizada pela hematofagia obrigatória, compartilhada apenas pelos Cimicidae Latreille, 1804, Polychtenidae Westwood, 1874 e alguns Lygaeidae Schilling, 1829 (Schaefer, 2003).

As espécies de Triatominae podem ser encontradas em ecótopos silvestres como ambientes rochosos, palmeiras, troncos de árvores, ninhos de pássaros, nesses ambientes animais como os marsupiais, canídeos, felídeos, roedores, entre outros funcionam como fontes alimentares e mantendo o ciclo silvestre do protozoário *T. cruzi*. No peridomicílio os triatomíneos podem colonizar ambientes como os galinheiros, currais, chiqueiros, utilizando como fonte alimentar animais domésticos e silvestres que se aproximam das moradias (roedores e marsupiais). Os triatomíneos também podem ser encontrados no interior das moradias humanas

por insetos com forte tendência a domiciliação, tendo o homem e os mamíferos domésticos como fontes alimentares (Moreno & Carcavallo, 1999).

São predominantes em regiões tropicais e neotropicais, desde o paralelo 41°N (Estados Unidos) até o paralelo 46°S (Patagônia). Algumas espécies estão distribuídas pelos outros continentes, como é o caso das espécies do gênero *Linshcosteus* Distant, 1904 que são encontradas na Índia, e da espécie *Triatoma rubrofasciata* que apresenta distribuição cosmopolita (Dias, 2000; Galvão *et al.*, 2003).

O número de espécies e gêneros de Triatominae tem mudado em função de revisões e dos novos enfoques e ferramentas com os quais os estudos são realizados. Atualmente são admitidas 140 espécies da subfamília Triatominae que são agrupadas em 18 gêneros e seis tribos. Duas dessas tribos apresentam os gêneros mais importantes: Rhodniini Pinto, 1926 (gêneros *Rhodnius* Stal, 1859 e *Psammolestes* Bergroth, 1911) e Triatomini Jeannel, 1919 (gêneros *Triatoma* Laporte, 1832, *Panstrongylus* Berg, 1879, *Eratyrus* Stal, 1859, *Dipetalogaster* Usinger, 1939, *Hermanlenticia* Jurberg & Galvão, 1997, *Meccus* Stal, 1859, *Mepraia* Mazza, Gajardo & Jörg, 1940 e *Paratriatoma* Barber, 1938). As outras quatro tribos (Alberproseniini Martinez & Carcavallo, 1977, Carvenicolini Usinger, 1944, Linshcosteini Carcavallo, Jurberg, Lent, Noireau & Galvão, 2000 e Bolboderini Usinger, 1944) têm menor importância epidemiológica e algumas não apresentam espécies domiciliadas. O gênero *Triatoma* é o mais representativo da subfamília com 69 espécies descritas, as quais estão agrupadas em nove complexos de acordo com características morfológicas e biogeográficas (Schofield, 2000; Galvão *et al.*, 2003; Forero *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2006; Galvão & Angulo, 2006; Costa & Felix, 2007; Sandoval *et al.*, 2007).

A plasticidade fenotípica dos Triatominae nos dá a impressão de uma freqüente resposta adaptativa a novos habitats (Dujardin *et al.*, 2000), fato esse observado pelo grande número de haplótipos e subespécies encontradas para a subfamília.

Considerando-se as três linhas de evolução dos insetos, Holometabola, Polyneoptera e Paraneoptera, os hemípteros descendem do último, com fósseis encontrados desde o início do Permiano há aproximadamente 250 milhões de anos. Aparentemente os ancestrais eram insetos sugadores de seiva (Terra, 1988). Outros pesquisadores sustentam a hipótese de que os triatomíneos tenham evoluído a partir de ancestrais predadores, porém essa questão da ancestralidade dos triatomíneos é dificultada pela ausência de registro fóssil (Lukashevich & Mostovski, 2003).

De acordo com a origem da subfamília Triatominae muito se tem discutido a respeito da ancestralidade. A hipótese do monofiletismo é sustentada para a subfamília levando em consideração caracteres apomórficos, surgidos apenas uma vez dentro da família Reduviidae Latreille, 1807, que são o rostro reto e fino apoiado na gula, cujo terceiro segmento pode fletir para cima durante a alimentação; antenas inseridas lateralmente e sempre filiformes e ausência de glândulas abdominais dorsais. Em relação aos que apóiam a origem polifilética para a subfamília sustenta a hipótese do comportamento e dos hábitos alimentares de certos triatomíneos e suas relações estreitas com determinados hospedeiros vertebrados, indicando origem independente para o grupo (Carcavallo *et al.*, 1999).

As espécies de Triatominae foram tradicionalmente descritas e têm sido identificadas por meio de chaves entomológicas, sendo classificadas principalmente com base em critérios morfológicos, levando em consideração a cor do conexivo, a forma, às dimensões do exoesqueleto e a genitália do macho (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Devido a grande biodiversidade encontrada para a subfamília Triatominae e as semelhanças morfológicas que as espécies apresentam entre elas, as torna um grupo de difícil classificação apresentando algumas espécies com o status taxonômico questionado (Garcia *et al.*, 1998).

Outras metodologias são capazes de auxiliar na identificação e classificação dos triatomíneos como morfometria, citogenética, retrocruzamentos e técnicas de biologia molecular (Monteiro *et al.*, 2001), esta última fornecendo informações importantes sobre as relações filogenéticas, uma vez que seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos apresentam um número muito elevado de caracteres, muito utilizados para determinar padrões de ramificação na filogenia (Futuyma, 1992).

O conhecimento do relacionamento e história evolutiva de diferentes espécies de Triatominae é de considerável importância, principalmente no que diz respeito à distribuição geográfica, epidemiologia e controle dos vetores.

I.3 Sistemática e marcadores moleculares

O impacto mais imediato de *A Origem das Espécies* foi fornecer uma estrutura conceitual para o estudo da morfologia comparada, embriologia descritiva, paleontologia e biogeografia, porque as “relações” entre organismos passaram a ser, então, compreendidas como significando ancestralidade comum ao invés de afinidades no esquema da criação. Recentemente, os dados da sistemática foram enriquecidos pela biologia molecular, podendo não somente comparar os fenótipos dos organismos, mas também as seqüências de seu DNA (Futuyma, 1992).

Com o intuito de auxiliar na pesquisa sobre a filogenia dos Triatominae, algumas técnicas moleculares, como o RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (García *et al.*, 1998; Pacheco *et al.*, 2003), seqüenciamento de genes nucleares (Monteiro *et al.*, 2000; Bargues *et al.*, 2002; Marcilla *et al.*, 2002) e mitocondriais (García & Powell, 1998; Lyman *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2000; 2004; Hypsa *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2004) e RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) (Justino, 2004), têm sido aplicadas.

Análises moleculares têm revolucionado a ciências biológicas, principalmente pela sua ampla aplicação dentro de diversas áreas da pesquisa científica. A correta identificação das entidades biológicas e suas possíveis relações filogenéticas e evolutivas possibilitam estudos de epidemiologia, comportamento, fisiologia, intervenções de controle e monitoramento de vetores entre outros (Abad-Franch & Monteiro, 2005).

Seqüenciamento de fragmentos de genes selecionados permite a avaliação direta de polimorfismos do DNA, fornecendo informações valiosas para inferência filogenética e avaliação de parentesco entre organismos e populações. Diferentes segmentos do genoma nuclear e mitocondrial evoluem em taxas diferentes. Regiões que apresentem uma taxa de evolução mais rápida são apropriadas para estudo de organismos estritamente relacionados, ao passo que regiões mais conservadas são mais apropriadas para comparação entre táxons mais divergentes (Abad-Franch & Monteiro, 2005).

O seqüenciamento de DNA mitocondrial e nuclear é muito utilizado, pois proporciona uma maior fidelidade, uma vez que a evolução ocorre nas moléculas fornecendo uma grande quantidade de dados. Como consequência dessa nova técnica de biologia molecular, muitos projetos genoma já foram concluídos e outros se encontram em andamento. Atualmente são 297

genomas completamente sequenciados, dos quais 235 são de bactérias, 23 são de arqueobactérias e 39 são de eucariôtos (Liolios *et al.*, 2006).

O marcador molecular é um método que mede o tempo de divergência das diferenças nucleotídicas entre duas seqüências. Para isso supõe-se que a substituição nucleotídica numa determinada seqüência ocorra a uma taxa constante (Bargues *et al.*, 2000).

O DNA não codificador apresenta taxas de evolução superiores ao DNA que codifica para proteínas. Outra característica do DNA não codificador é a ocorrência de *indels* com maior frequência. A taxa de substituição de um gene é um bom indicativo de sua importância funcional e a comparação das taxas entre diferentes genes fornece informações valiosas sobre fatores históricos e demográficos (Muse, 2000).

Fragmentos de genes nucleares são geralmente mais conservados que genes mitocondriais. Por essa razão eles são ferramentas importantes para se analisar diversidade e relações filogenéticas em nível específico. DNA ribossomal tal como o espaçador interno transcrito (ITS) pode ser informativo para análise populacional (Hillis *et al.*, 1996).

O DNA ribossomal é uma região muito conservada e está presente em todos os organismos. Seus genes codificam o RNA ribossomal, que combinados com proteínas ribossomais formam os ribossomos, estruturas necessárias para a síntese de proteínas (Hillis & Dixon, 1991).

Os genes ribossomais estão agrupados como unidades em tandem que nos insetos apresentam de 100 a 1000 cópias por genoma (Coleman, 2003). Esses multigenes, com potencial para variações entre as repetições, podem ser usados para estudos filogenéticos. Um processo chamado evolução ajustada torna rapidamente homogênea as múltiplas cópias resultando em mínima variação intragenômica, podendo o multigene ser considerado e tratado como um simples gene (Bargues *et al.*, 2000; Coleman, 2003).

A evolução sincronizada do DNA ribossomal dentro das espécies resultou no uso dos espaçadores internos não só para reconstruções filogenéticas, mas também como marcador molecular para a diferenciação das espécies, incluindo espécies crípticas e próximas (Marcilla *et al.*, 2002).

Cada unidade do DNA ribossomal consiste de regiões conservadas transcritas, nas quais estão os genes para as subunidades 18S, 5,8S e 28S do ribossomo, dois espaçadores internos transcritos, ITS-1 e ITS-2 (“Internal Transcript Spacers”), dois espaçadores externos transcritos,

5' ETS e 3' ETS ("External Transcript Spacers") ou espaço intergênico (IGS) separadas por um espaçador não transcrito (Hillis & Dixon, 1991; Paskewitz *et al.*, 1993) (Figura 1).

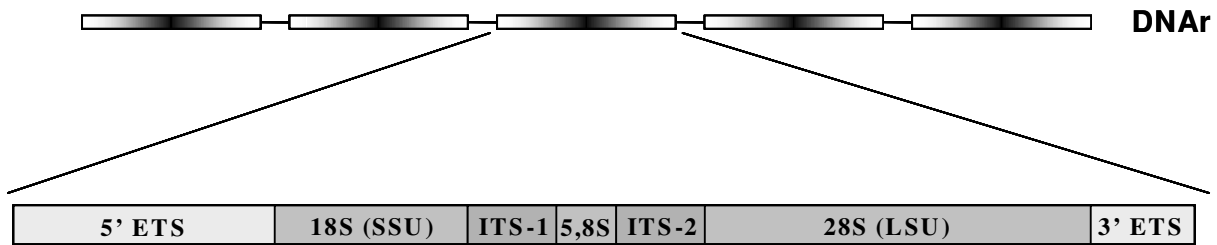


Figura 1: Diagrama ilustrando a organização do DNA ribossomal (rDNA) no genoma eucariótico típico (retângulos cinzas) e seu RNA primário transcrito. Abreviações: ETS, espaçador externo transcrito; SSU, subunidade menor do gene do RNA ribossomal; LSU, subunidade maior do gene do RNA ribossomal. ITS, espaçador interno transcrito. Adaptado de Coleman, 2003.

A região ITS possui uma taxa de substituição nucleotídica mais rápida que a da região 18S, tendo, portanto, uma evolução mais rápida. A taxa de evolução lenta da região 18S permite que relações muito antigas (com aproximadamente 100 milhões de anos) sejam estudadas, já a região ITS-2 permite estudos de relações mais recentes (de 50 milhões de anos). Por possuir sub-regiões mais conservadas, o ITS-2 é preferencialmente escolhido para estudos de filogenia e como marcador molecular (Bargues *et al.*, 2000; Coleman, 2003).

As mitocôndrias, assim como os cloroplastos, são organelas próprias de células eucarióticas, e que teriam surgido a partir de eventos de endossimbiose (simbiogênese) entre uma célula hospedeira e células procarióticas. As evidências que sustentam tal teoria são que: a) as proteínas presentes nas organelas são mais semelhantes aos procarióticos do que aos eucarióticos; b) as organelas possuem genoma próprio, com organização semelhante ao genoma procariótico; c) os RNAs são mais semelhantes aos de procarióticos; d) as organelas são semi-independentes, com capacidade de replicação; e e) membrana dupla ao redor das organelas (Oliveira & Menck, 2001).

DNA mitocondrial (mtDNA) corresponde a um genoma relativamente simples, de herança materna (sem recombinação) e que apresenta taxa de evolução dez vezes mais rápida que as substituições do DNA nuclear, tornando-o uma ferramenta valiosa em estudos de genética populacional, evolução molecular e relações filogenéticas. Os erros de replicação e as altas concentrações de compostos de oxigênio, capazes de danificar o DNA, aliados a um sistema de

reparo ineficiente, parecem ser os responsáveis pelo acúmulo de mutações no DNAm (Avise *et al.*, 1987).

O genoma mitocondrial completo foi seqüenciado em algumas espécies de Diptera como *Anopheles gambiae* Giles, 1926 (Beard *et al.*, 1993), *A. funestus* Giles, 1900 (Krzywinski *et al.*, 2006), *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Lewis *et al.*, 1995) e *D. yakuba* Burla, 1954 (Clary & Wolstenholme, 1985), em duas espécies de Coleoptera como *Pyrocoelia rufa* Olivier, 1886 (Bae *et al.*, 2004) e *Crioceris duodecimpunctata* Linnaeus, 1758 (Stewart & Beckenbach, 2003), em uma espécie de Hymenoptera, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Crozier & Crozier, 1993), em uma espécie de Lepidoptera, *Bombyx mandarina* Moore, 1872 (Yukuhiro *et al.*, 2002) e uma espécie de Hemiptera, *Triatoma dimidiata* (Dotson & Beard, 2001) (figura 2).

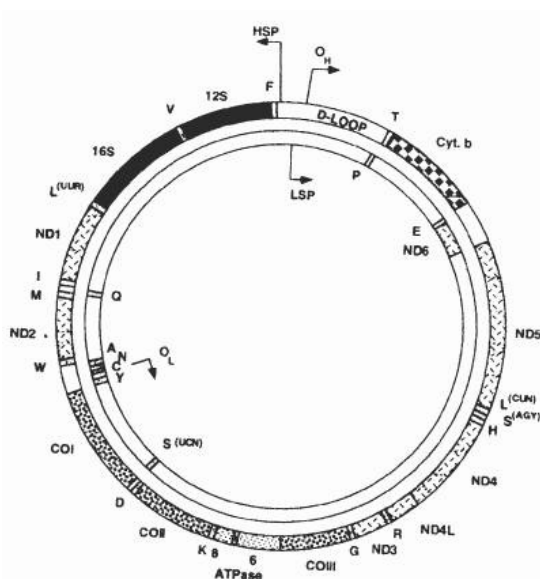


Figura 2. Ilustração de um DNA mitocondrial típico de um eucarioto mostrando os genes que os compõem e as respectivas posições.

Nos metazoários, o DNA mitocondrial contém dois genes que codificam para RNA ribossomal, 22 para RNA transportador e 13 para RNA mensageiro, que são responsáveis na síntese de proteínas diretamente envolvidas na cadeia da respiração celular (Dotson & Beard, 2001).

Entre os principais genes seqüenciados do DNA mitocondrial estão o citocromo b, as subunidades I, II e III do citocromo oxidase, a grande subunidade ribossomal (16S) e a pequena

subunidade ribossomal (12S). Muitas dessas seqüências estão disponíveis em bancos de dados, como o GenBank.

Diferentes fragmentos de genes mitocondriais que codificam para citocromo-oxidase I (Garcia & Powell, 1998), citocromo b e grande subunidade ribossomal (Lyman *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2000) foram seqüenciados e mostraram-se úteis em estudos filogenéticos de alguns membros de Triatominae.

I.4 *Triatoma sherlocki*

“Triatomíneos silvestres” foram coletados em Santo Inácio, Bahia no dia 23 de Agosto de 1975 e mantidos em colônia iniciada em quatro de setembro do mesmo ano no Laboratório de Triatomíneos e Culicídeos da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP) (Cerqueira, 1982).

Na época de sua coleta, tais “triatomíneos silvestres” foram encontrados em ecótopos naturais a cerca de 250 metros de distância da área urbana de Santo Inácio. O local da captura é rochoso, desprovido de vegetação, situada a uma altitude de 473m e habitada por lacertídeos e roedores silvestres, alguns infectados por *Trypanosoma cruzi*, o mesmo acontecendo entre os triatomíneos (Cerqueira, 1982).

O Estado da Bahia, assim como todo o Nordeste brasileiro é área de distribuição geográfica da espécie *T. brasiliensis*, que assemelha-se ao “triatomíneos silvestre” em alguns aspectos morfológicos (Galvão *et al.*, 2003).

Como resultado do trabalho de Cerqueira (1982), que realizou intercruzamento desse “triatomíneo silvestre” com *T. brasiliensis*, *T. lenti* Sherlocki & Serafim, 1967 e *T. infestans*, cruzamentos de híbridos e retrocruzamentos, ele chegou à conclusão de que se tratava de uma subespécie de *T. brasiliensis*, denominado de *T. brasiliensis santinacensis*, levando em consideração que a espécie *T. brasiliensis*, além de ocorrer em Santo Inácio, Bahia, apresenta formas cromáticas intermediárias.

Em 2002, esses “triatomíneos silvestres” foram levados ao Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos – Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), onde foi realizada análise morfológica comparativa das estruturas fállicas, do escutelo, do pronoto, do conexivo e das asas anteriores e posteriores com *T. lenti* Sherlock &

Serafim, 1967, tendo sido classificados como uma nova espécie denominada *T. sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002 (Papa *et al.*, 2002).

T. sherlocki é uma espécie recentemente descrita proveniente de Santo Inácio, Bahia. Essa espécie apresenta características peculiares como os hemiélitros reduzidos e anéis de cor laranja avermelhado nos fêmures e manchas no conexivo, características essas que podiam situá-lo próximo à espécie *T. lenti*, diferindo dessa pelas características do pronoto, escutelo e cabeça (Papa *et al.*, 2002).

Pelo fato de *T. sherlocki* estar mais proximamente relacionado com *T. brasiliensis* e *T. lenti*, baseado em características morfológicas, e que essas duas espécies ainda necessitam de mais estudos para poder se tomar uma decisão quanto ao complexo ao qual estão inseridas (Carcavallo *et al.*, 2000), estudos visando à caracterização morfométrica e molecular de *T. sherlocki*, estarão contribuindo para estudos filogenéticos dos Triatominae.

1.5 *Triatoma brasiliensis*

T. brasiliensis é o vetor mais importante da doença de Chagas no Nordeste brasileiro, distribuídos pelos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Maranhão e Sergipe. É uma espécie muito bem adaptada às altas temperaturas e ao clima seco da região apresentando variações cromáticas (Forattini, 1980; Galvão *et al.*, 2003).

Essa variação cromática induziu no passado à descrição de duas subespécies: *T. brasiliensis melanica* Neiva & Lent, 1941 e *T. brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956. Lent & Wygodzinsky (1979) consideram essas variações como *T. brasiliensis*, alegando que formas intermediárias são freqüentes no ambiente natural.

Estudos conduzidos para esclarecer esses diferentes padrões cromáticos foram realizados levando-se em consideração morfologia (Costa, 1997), biologia (Costa & Marchon-Silva, 1998), ecologia (Costa *et al.*, 1998; 2002) e sequenciamento de DNA mitocondrial (Monteiro *et al.*, 2004), sugerindo quatro formas distintas (*brasiliensis*, *juazeirensis*, *macromelasoma* e *melanica*) como entidades taxonômicas, constituindo o complexo de espécies *T. brasiliensis*.

Recentemente duas formas cromáticas de *T. brasiliensis* foram consideradas espécies, *Triatoma juazeirensis* Costa & Felix, 2007, que foi distinguido das outras espécies do complexo

T. brasiliensis pela coloração escura do pronoto e pelo fêmur completamente escuro, e *Triatoma melanica* Costa, Argolo & Felix, 2006.

Frequentemente *T. brasiliensis* pode invadir ambientes domésticos assumindo importante papel na transmissão do *T. cruzi*, uma vez que estão associados com uma grande variedade de vertebrados dos quais muitos freqüentam o peridomicílio, como é o caso de alguns roedores, aves e marsupiais (Vitta *et al.*, 2007).

II. OBJETIVOS

Clonar e sequenciar genes nucleares e mitocondriais de *T. sherlocki* e *T. brasiliensis*;

Inferir as relações filogenéticas entre *T. sherlocki* e *T. brasiliensis* com espécies da subfamília Triatominae, cujas seqüências estejam disponíveis em bancos de dados de domínio público.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Insetos

Os exemplares de *T. sherlocki* utilizados foram obtidos de colônia mantida no insetário de Triatominae da disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara. A colônia teve início a partir da coleta realizada em julho de 2003 no distrito de Santo Inácio, município de Gentio do Ouro, localizado na Chapada Diamantina, região Centro-Nordeste do Estado da Bahia (11° 06' 55'' S e 42° 46' 30'' W).

Os insetos foram coletados pelo Professor Dr. João Aristeu da Rosa da disciplina de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP, que contou com o auxílio e apoio da Secretaria de Saúde do referido Estado. A coleta foi realizada em ambiente silvestre e os insetos foram encontrados sob pedras. Desde então a colônia é mantida com alimentação semanal utilizando-se camundongos albinos.

Os exemplares de *T. brasiliensis* utilizados foram obtidos da colônia de código CTA 076 oriunda do Estado do Piauí, que é mantida no Insetário de Triatominae da Faculdade de Saúde Pública/USP, localizado no Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA) desde 1984. Tais triatomíneos são mantidos com alimentação em patos.

T. melanica é proveniente de uma colônia do Laboratório da Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), mantidas desde 2004 com alimentação em camundongos normais. Foram coletados pela Pesquisadora Dra. Jane Costa, da referida instituição, em Espinosa, Norte de Minas Gerais, em ambiente silvestre e pedregoso.

Por meio das análises morfológicas *T. sherlocki* assemelha-se em muitos aspectos com a espécie *T. lenti* que inicialmente se havia o interesse em se trabalhar com essa espécie também. Porém, a indisponibilidade de colônias de *T. lenti* em outras instituições de pesquisas e a dificuldade de se encontrar essa espécie em seu ambiente natural impediu que essa análise fosse realizada.

III.2 Tampões e soluções

- GET
50mM Glicose, 10mM EDTA pH 8,0, 25mM Tris-HCl pH 8,0
- LB
triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%
- “Save Money”
50mM MgCl₂, 1M Tris-HCl, pH 9,0
- SOB
triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 7H₂O 10mM
- “Solução de lise” (preparada na hora do uso)
0,2N NaOH, 1,0% SDS
- TAE 50X
Tris-base 2M, Ácido Acético Glacial 5,71% e EDTA 50mM
- Tampão de lise
10mM Tris-HCl, pH 8,0, 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS
- TE
10mM Tris-HCl, pH 7,6, 1mM EDTA

III.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico (DNAg) dos triatomíneos foi extraído segundo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). O tecido de escolha para a extração foi o da musculatura da perna, por ser esse livre de microrganismos contaminantes e simbiontes. O DNAg foi extraído de um organismo adulto, ou ninfa de 5º estágio, de cada espécie onde foram excisadas as seis pernas de cada exemplar com auxílio de instrumentos cirúrgicos previamente esterilizados. Para evitar contaminação das pernas, tomou-se o cuidado de higienizá-las previamente com hipoclorito de sódio.

As pernas foram trituradas em tubos eppendorfs adicionado de 400µL de tampão de lise contendo 500µg/mL de proteinase K. Esse produto lisado e homogeneizado foi incubado a 55°C por 4 horas, sendo misturado a cada 15 – 30 minutos em *shaker* e retornado ao banho.

Após a lise das estruturas do exoesqueleto e das membranas celulares, a extração do DNAg seguiu-se com a adição de igual volume de fenol, que foi misturado e centrifugado a 12.000g por 3 minutos a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para novo tubo eppendorf, seguindo-se de duas novas extrações com 200µl de fenol + 200µl clorofórmio/isoamílico (24/1) e 400ul de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1), respectivamente, nas mesmas condições de centrifugação descrita anteriormente; em cada passo transferindo o sobrenadante para novo tubo eppendorf. A fase aquosa separada após a última centrifugação foi precipitada com 1/10 do volume de 4M de acetato de amônio e 2,5 volumes de etanol 100% gelado, sendo formado o *pellet* após centrifugação a 13.000g por 10 minutos a 4°C, seguida de remoção cuidadosa do sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado com 1mL de etanol 70% e centrifugado nas mesmas condições descritas acima, com remoção cuidadosa do sobrenadante. O DNA precipitado foi seco a vácuo e em seguida dissolvido em 70µL de tampão TE e armazenado em geladeira a 4°C.

A integridade do DNAg foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (5µL de DNA + 4,0µL de água Milli Q + 1,0µL Dye Front 6X) corado com brometo de etídeo. O DNA foi diluído de forma que ficasse numa concentração dentro do intervalo de 100 – 400ng/µL.

III.4 Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction)

A reação em cadeia da polimerase usa dois oligonucleotídeos como iniciadores para síntese de seqüências específicas de DNA. Um iniciador “forward” anela-se à fita positiva do DNA enquanto um iniciador “reverse” liga-se à fita negativa. A região flanqueada sofre um aumento exponencial do número de cópias através da repetição de ciclos de polimerização e desnaturação (Bangham, 1991).

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador PTC - 100™ Programmable Thermal Controller. A reação foi realizada em um volume final de 50µL e utilizou-se dos seguintes componentes: ~100ng de DNAg (molde), 100µM de dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 10 picomoles de cada iniciador, 2mM de cloreto de magnésio, 1U de enzima Taq polimerase em tampão 10X. As reações foram ajustadas para 50µL com água Milli Q estéril.

As condições da PCR variaram de acordo com o gene. Para a amplificação dos genes mitocondriais foram necessárias as seguintes condições: um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos compreendendo desnaturação (94°C, 45 segundos), anelamento (50°C, 45 segundos) e extensão (72°C, 1 minuto) finalizando com um ciclo a 72°C por 7 minutos. As condições para a amplificação do gene da grande subunidade ribossomal (28S) diferiu das dos genes mitocondriais na temperatura de anelamento, ocorrendo a 53°C. Já para a amplificação do gene do Espaçador Interno Transcrito 2 (*ITS-2*), esse ocorreu a uma temperatura de anelamento de 56°C por 2 minutos, o mesmo tempo da etapa de desnaturação, demais condições mantiveram-se as mesmas.

Para confirmar que a amplificação ocorrida não se tratava de DNA exógeno, outra reação de PCR, composta por todos os componentes menos o DNA molde, foram executadas (controles negativos de amplificação).

Após a padronização de amplificação de determinado gene, uma segunda PCR foi realizada utilizando a enzima “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen), que, durante a polimerização, possui um mecanismo de reparo, minimizando dessa forma a adição de bases nucleotídicas erradas. A amplificação dos genes com a nova Taq foi realizada de acordo com as condições previamente padronizadas para cada fragmento e com os mesmos componentes, tomando-se o cuidado nas concentrações requeridas para essa nova amplificação.

A confirmação da amplificação de determinado gene foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Foram aplicados para essa confirmação 9µL de amostra e 1µL de Dye Front 6X, além de um Peso Molecular para referência do tamanho do fragmento que foi amplificado.

III.5 Iniciadores

Os iniciadores utilizados nas amplificações dos fragmentos correspondentes ao gene que codifica para o citocromo b (*cytb*) e à grande subunidade ribossomal (*16S*) foram aqueles utilizados por Lyman *et al.* (1999).

Para o fragmento mitocondrial do citocromo b:

Forward: 5' – GGA CAA ATA TCA TTT TGA GGA GCA ACA G – 3'

Reverse: 5' – ATT ACT CCT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G – 3'

Para o fragmento mitocondrial da grande subunidade ribossomal (16S):

Forward: 5' – CRC CTG TTT AAC AAA AAC AT – 3'

Reverse: 5' – AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA – 3'

Os iniciadores utilizados na amplificação do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) foram utilizados por Porter & Collins (1996):

Forward: 5' – GCG AGT CGT GTT GCT TGA TAG TGC AG – 3'

Reverse: 5' – TTG GTC CGT GTT TCA AGA CGG G – 3'

Para amplificação da região do Espaçador Interno Transcrito 2 (*ITS-2*) foram utilizados os oligonucleotídeos descritos por Porter & Collins (1991):

CP16: 5' – GCG GGT ACC ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA – 3'

CP17: 5' – GCG CCG CGG TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG – 3'

Outros primers para a amplificação do Espaçador Interno Transcrito 2 (*ITS-2*) também foram testados, aqueles utilizados por Almeyda-Aritgas *et al.* (2000):

Forward: 5' – GTG TCG ATG AAG AAC GCA G – 3'

Reverse: 5' – TCT ATG CTT AAA TTC AGG GG – 3'

Bachellerie & Liang (1993):

Forward A: 5' – GTG AAC CTG CGG AAG GAT CA – 3'

Reverse B1: 5' – ATC CTG GTT AGT TTC TTT TCC T – 3'

Forward C: 5' – GTC GAT GAA GAA CGC AG – 3'

Os iniciadores utilizados para seqüenciamento foram:

M13 Forward: 5' – TGT AAA ACG ACG GCC – 3'

M13 Reverse: 5' – CAG GAAACA GCT ATG ACC – 3'

Os primers utilizados para as amplificações dos genes foram ressuspensos em volume adequado com água Milli Q estéril de tal forma que a concentração final fosse de 10,0 picomoles. Em relação aos iniciadores utilizados para o seqüenciamento, a concentração final foi de 1,6 picomoles.

III.6 Eletroforese convencional

A separação eletroforética do DNA foi feita em gel de agarose, corado com brometo de etídeo (0,5µL para cada 25mL de gel). A velocidade de corrida ocorreu a 100V por 25 minutos em tampão TAE 1X. A preparação do gel, condições de corrida e coloração do DNA seguem a metodologia descrita por Sambrook *et al.* (1989).

Géis de diferentes concentrações foram confeccionados dependendo do tamanho do produto a ser submetido à eletroforese. As concentrações variaram de 1,5% para produtos de PCR, 1% para produto de miniprep e 0,8% para DNAg.

Após a corrida, visualizou-se o gel em um transiluminador de luz UV Fisher Scientific™ e a obtenção da imagem foi feita utilizando o programa Multi Analyst em aparelho Fluor-S™ Multimager da Bio-Rad.

III.7 Purificação dos fragmentos amplificados

Os fragmentos amplificados com a “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity” (Invitrogen) foram purificados utilizando “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) para em seguida serem clonados. A purificação ocorreu com todo o produto amplificado com a “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity”.

Colocou-se a coluna GFX dentro do tubo coletor e adicionou-se 500µL de *Capture Buffer* e transferindo em seguida toda a solução de DNA amplificada, homogeneizando cuidadosamente. Cada amostra foi centrifugada a 14.000rpm por 30 segundos. Descartou-se o fluxo que passou e a coluna GFX foi colocada novamente no tubo coletor adicionando-se 500µL de *Wash Buffer* centrifugando nas mesmas condições descritas acima. Após a centrifugação, descartou-se o tubo coletor e a coluna GFX foi transferida para um novo tubo eppendorf de 1,5mL. Adicionou-se 50µL de tampão TE (ou água Milli Q estéril) e incubou-se a amostra por um minuto a temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente a 14.000rpm por um minuto e o fluxo que passou contém seu DNA purificado.

A purificação do produto amplificado foi confirmada em eletroforese de gel de agarose 1,5%.

III.8 Reação de ligação e clonagem em vetor comercial

Os produtos de PCR foram ligados no vetor pGEM[®]-T Easy (Promega). A quantidade de DNA utilizada na ligação é calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{tamanho do vetor (Kb)}} \times \text{razão molar} = \text{ng do inserto}$$

A ligação foi realizada utilizando 5µL de tampão, 0,5µL do vetor, 1µL de T4 DNA ligase e o inserto, que depende de sua concentração. A reação foi feita para um volume final de 10µL, completando com água Milli Q estéril.

A razão molar utilizada foi 10: 1 (inserto/vetor). A reação de ligação foi incubada “overnight” a 4°C.

III.9 Preparação de bactérias ultracompetentes

Bactérias ultracompetentes foram preparadas a partir da inoculação de uma colônia de *Escherichia coli* da linhagem DH5α em tubo de cultura contendo 5mL de meio LB. Esse inóculo foi posteriormente incubado “overnight” (12 a 16 horas) em *shaker* a 180rpm a 37°C.

O inóculo, enfim, foi diluído em 50mL de meio SOB pré-aquecido, em erlenmeyer e incubado em *shaker* a 180rpm a 37°C até que as bactérias atingissem uma OD_{600nm} = 0,6. Após atingir a OD necessária a cultura contendo as bactérias no meio SOB foi mantida em gelo por 10 minutos para cessar o crescimento das mesmas. O meio foi transferido para um frasco falcon estéril de 50mL e submetido à centrifugação a 2.500g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, utilizando-se uma pipeta estéril, as células foram suspensas cuidadosamente em 16mL de TB, resfriado em gelo. As bactérias suspensas foram mantidas no gelo por 10 minutos. Em seguida centrifugadas nas mesmas condições descritas acima e novamente o sobrenadante foi descartado sendo as bactérias suspensas em 4mL de TB, resfriado em gelo, contendo 0,3mL de DMSO, mantendo as mesma no gelo por 10 minutos. Em seguida, as bactérias foram aliquotadas

em eppendorfs contendo de 100 a 200µL da solução e congeladas em nitrogênio líquido antes de armazená-las no freezer a -80°C (Sambrook *et al.*, 1989).

III.10 Reação de transformação

Para a reação de transformação, foi misturado cuidadosamente 2µL da reação de ligação (~50ng), contendo o inserto ligado ao vetor, com 50µL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂ 60mM; MOPS 10mM, pH 7; glicerol 15%; esterilizada por filtração). A essa mistura foi adicionado 50µL de células ultracompetentes, homogeneizando com cuidado, incubando-as no gelo por 30 minutos. Em seguida foi dado um choque térmico a 42°C por 2 minutos (tendo o cuidado para não balançar o tubo) e colocadas no gelo novamente por mais 2 minutos, deixando mais 2 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 485µL de SOB aquecido (37°C), 5µL de glicose 1M e 10µL de MgCl₂ 1M (colocar a glicose e o MgCl₂ primeiro, em seguida colocar o SOB, com cuidado, escorrendo pela parede do tubo) incubando-as a 37°C sob agitação (150rpm) por uma hora e meia.

O plaqueamento foi realizado com 200µL dessa cultura em placas de Petri contendo meio LB Ágar com X-gal (20mg/mL), IPTG (1M) e ampicilina (25mg/mL) incubando a 37°C “overnight” (Sambrook *et al.*, 1989).

III.11 Extração de DNA plasmidial de bactéria (Miniprep)

Cada colônia positiva crescida na placa foi repicada e inoculada em tubo de cultura contendo 5mL de LB com ampicilina 100µg/mL por 16-18 horas em agitador a 200 rpm, 37°C. De cada inóculo positivo foram aliquoteadas 0,5mL da solução contendo as bactérias transformadas com mais 0,5ml de glicerol 40% e armazenadas em freezer a -80°C. O restante do meio contendo as bactérias transformadas foi centrifugado por 30 segundos a fim de formar um *pellet* com as bactérias, descartando o meio. O *pellet* foi ressuspenso em 100µL de Tampão GET em vórtex, em seguida adicionou-se 200µL de “solução de lise” (preparar na hora) e incubou-se no gelo por 5 minutos. Adicionou-se 150µL de 3M de Acetato de Potássio (KOAc) e incubou-se no gelo por mais 5 minutos, em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos a 4°C a 14000rpm para formar *pellet* dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo

tubo eppendorf e adicionou-se 1mL de etanol absoluto sendo a amostra incubada por 15 minutos em freezer a -80°C. Nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 14000rpm a 4°C para que se forme *pellet* do DNA/ plasmidial sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com etanol 1mL de 70% que foi centrifugado por 5 minutos a 14000rpm a 4°C, descartando o sobrenadante. O *pellet* resultante da centrifugação foi seco a vácuo e ressuspensão em 100µL de RNase A 200µg/mL que foi incubado a 37°C por uma hora. A Miniprep seguiu com a adição de 100µL de fenol sendo a amostra submetida a um vigoroso vórtex por um minuto, e a separação das fases ocorreu por meio de centrifugação a 14000rpm a temperatura ambiente por 2 minutos. A fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo eppendorf e o DNA foi precipitado com a adição de 1/10 do volume de solução 3M de NaOAc pH 5,2 e dois volumes de etanol absoluto, sendo as amostras incubadas por 15 minutos em freezer a -80°C. O *pellet* foi formado por centrifugação a temperatura ambiente a 14000rpm por 15 minutos, descartando o sobrenadante, sendo o pellet lavado posteriormente pela adição de 1mL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 14000rpm a temperatura ambiente. Novamente o sobrenadante foi descartado e a solução seca brevemente a vácuo, sendo o *pellet* dissolvido em 50µL de TE (Sambrook *et al.*, 1989).

A confirmação da extração do DNA plasmidial foi visualizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0% contendo 5µL de amostra na corrida.

A confirmação da ligação do produto amplificado com o vetor foi realizada por meio de uma PCR utilizando os primers “M13 Forward” e “M13 Reverse”, específicos do vetor, que se anelam a aproximadamente 100 pares de bases do sítio de ligação do inserto, gerando um fragmento de 200 pares de bases a mais que o produto realmente apresenta. Essa PCR foi confirmada em eletroforese em gel de agarose 1,5%.

III.12 Seqüenciamento

Após a confirmação, por meio de PCR do DNA plasmidial, da ligação do inserto com o vetor, o mesmo foi submetido a uma PCR se seqüenciamento. A reação de seqüenciamento a partir do DNA plasmidial foi realizada com o kit BygDye™ (DNA Sequencing Kit, BigDye™ Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems) utilizando-se 2µL do DNA plasmidial (pDNA), 2µL de água MilliQ estéril, 2µL de iniciador “M13 Forward” ou “M13 Rerverse”

(1,6picomoles), 2µL de tampão Save Money e 2µL de BigDye. Cada reação utiliza apenas um primer, ou seja, duas reações para cada clone (F e R), ocorrendo a partir das duas extremidades para gerar seqüências consenso (seqüenciar diferentes clones para obter significado estatístico).

As condições para essa PCR foram as seguintes: 96°C por 2 minutos, 40 ciclos de 96°C por 30 segundo, 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos, finalizando a 4°C.

O produto da PCR de seqüenciamento foi precipitado pela adição de 80µL de Isopropanol 75% e transferido para novo tubo eppendorf. As amostras foram conservadas em temperatura ambiente por 15 minutos ao abrigo da luz. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm por 15 minutos em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado em seguida 1mL de etanol 70% para lavar as amostras e centrifugadas a 14000rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram armazenadas por 15 minutos a 37°C para secarem. As amostras foram ressuspensas em 2µL de *loading buffer*.

As amostras foram processadas em seqüenciador automático ABI 377. A análise das seqüências foi realizada com o auxílio do software “Sequence analysis”.

III.13 Análises filogenéticas

As seqüências geradas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal W, disponível na Internet, do BioEdit (Hall, 1999) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando-se análises de Parcimônia com o programa de análise filogenética PAUP 4.1 (Swofford, 1998) (www.paup.csit.fsu.edu) e análises de distância com o programa MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

A escolha dos táxons externos para as filogenias inferidas nos diferentes genes analisados ocorreu em função da disponibilidade das seqüências das diferentes espécies adicionadas nas reconstruções propostas.

IV. RESULTADOS

IV.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico (DNAg) foi extraído de três espécies de triatomíneos, *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica*, utilizando para tal o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) com a técnica de fenol/clorofórmio. O produto final da extração foi ressuspenso em 70µL de tampão TE 1X e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, onde foi possível visualizar e avaliar a integridade e a qualidade do DNAg extraído (Figura 3).

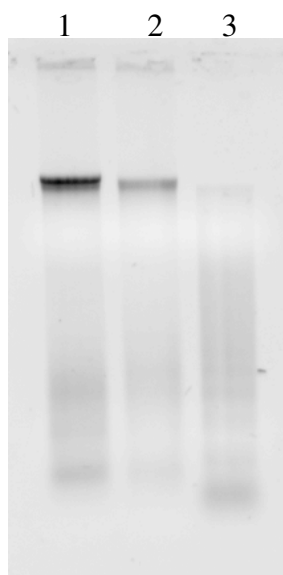


Figura 3. Eletroforese visualizando a extração do DNAg realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo de 1 – *T. sherlocki*; 2 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e 3 – *T. melanica*.

Para cada amostra foram aplicados no gel 5µl de DNAg extraído.

A menor quantidade de DNAg presente no gel para *T. melanica* (Figura 3) pode ser devido à utilização de ninfa de 5º estágio para a extração, diferentemente de *T. sherlocki* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), para os quais foram utilizados exemplares adultos no procedimento. Outra possibilidade da qualidade e quantidade da extração do DNAg de *T. melanica* pode ser devido a estocagem do material que se encontra armazenado em álcool absoluto.

IV.2 Genes mitocondriais

- **Citocromo b (*cytb*)**

A amplificação do gene mitocondrial do citocromo b ocorreu sob temperatura de anelamento de 50°C, gerando um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases para *T. sherlocki* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) (Figura 4).

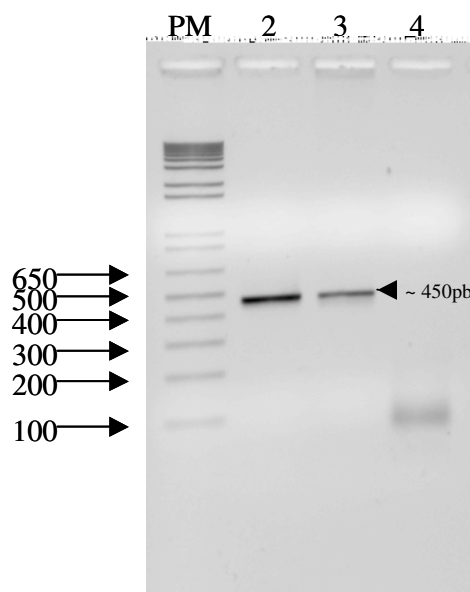


Figura 4. Eletroforese da amplificação do gene mitocondrial do citocromo b executada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 2 – *T. sherlocki*; 3 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e 4 – controle negativo.

O produto amplificado e purificado foi clonado em vetor p-GEM T Easy (Promega) e a transformação realizada em bactéria *Escherichia coli* Escherich, 1885, linhagem DH5α.

Dezessete colônias de bactérias transformadas com o vetor contendo o inserto (citocromo b) de *T. sherlocki* cresceram e 10 delas foram submetidas à extração do DNA plasmidial (Miniprep). A eficiência foi mais baixa para as bactérias transformadas com o vetor contendo o inserto do *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), apenas sete colônias cresceram e todas foram submetidas à extração do DNA plasmidial (Figura 5).

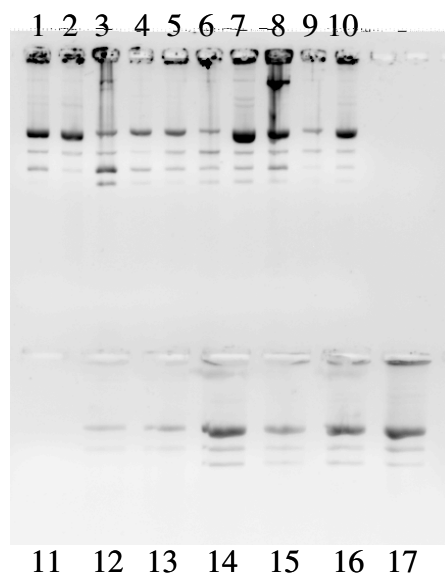


Figura 5. Eletroforese das colônias de bactérias transformadas com o citocromo b executada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo da miniprep. 1 a 10 – *T. sherlocki* e 11 a 17 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

A extração do DNA plasmidial das 10 colônias contendo possivelmente o inserto do citocromo b de *T. sherlocki* foi positiva e facilmente visualizado em gel de agarose. Já para *T. brasiliensis* a extração foi positiva para seis colônias, não sendo possível visualizar a extração em uma amostra, podendo se tratar de um falso positivo ou algum outro problema durante o processo de extração.

Para se confirmar a ligação do inserto ao vetor, realizou-se uma PCR das minipreps de todas as colônias submetidas à extração do DNA plasmidial. As condições para esta PCR foram as seguintes: 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando a 72°C por 7 minutos.

Os *primers* utilizados para amplificação da região onde o inserto se liga ao vetor, com a finalidade de confirmar a ligação do inserto ao vetor foram os oligonucleotídeos “M13 Forward” e “M13 Reverse”, que flanqueiam o inserto (~ 100 pares de bases do sítio de ligação do inserto) gerando um fragmento 200 pares de bases a mais que o inserto, isto é, para o citocromo b, um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases (Figura 6).

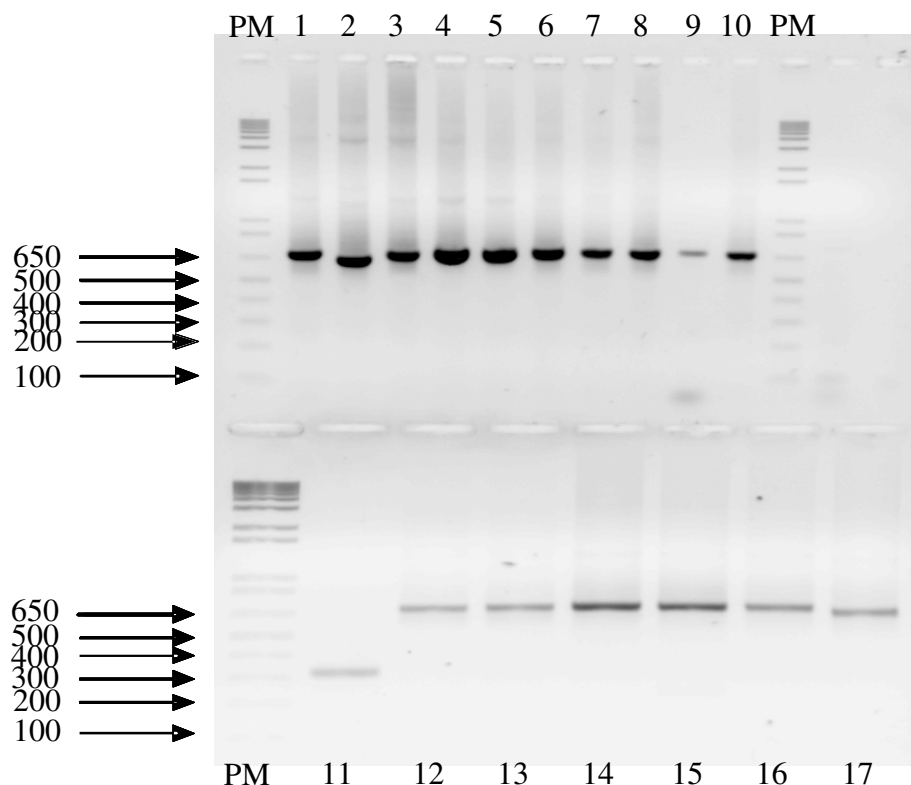


Figura 6. Eletroforese da miniprep para confirmação da ligação do inserto no vetor executada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo da PCR. PM – Marcador de peso molecular 1KB plus; 1 a 10 – *T. sherlocki* e 11 a 17 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

Todas as Minipreps, tanto das colônias contendo o inserto de *T. sherlocki* quanto os das colônias contendo o inserto de *T. brasiliensis* foram submetidas à PCR para confirmação da ligação do inserto no vetor. Todas as amostras contendo o inserto de *T. sherlocki* foram positivas, visto pelo tamanho do fragmento gerado a partir da PCR. Em relação ao *T. brasiliensis* seis amostras foram positivas e uma negativa, a mesma que não foi possível visualizar o produto da Miniprep, chegando-se à conclusão que o inserto não se ligou ao vetor nessa amostra, tratando-se de um falso positivo.

A PCR de seqüenciamento foi realizada nas amostras de 1 a 5 para *T. sherlocki* e de 12 a 17 para *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

As seqüências geradas apresentaram um fragmento de 414 pares de bases para as duas espécies estudadas, excluindo os iniciadores. Tais seqüências foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados de seqüências não redundantes do “National Center for

Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Anexo I, Tabela 1) e alinhadas utilizando o programa Clustal W do BioEdit (Hall, 1999), gerando uma sequência de 399 pares de bases.

As espécies utilizadas no alinhamento foram *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), haplótipos de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), *Rhodnius robustus* Larrouse, 1927 e *Arilus cristatus* (Linnaeus), (Figura 7).

Os códigos de acesso no GenBank estão disponíveis na Tabela 1 do Anexo I.

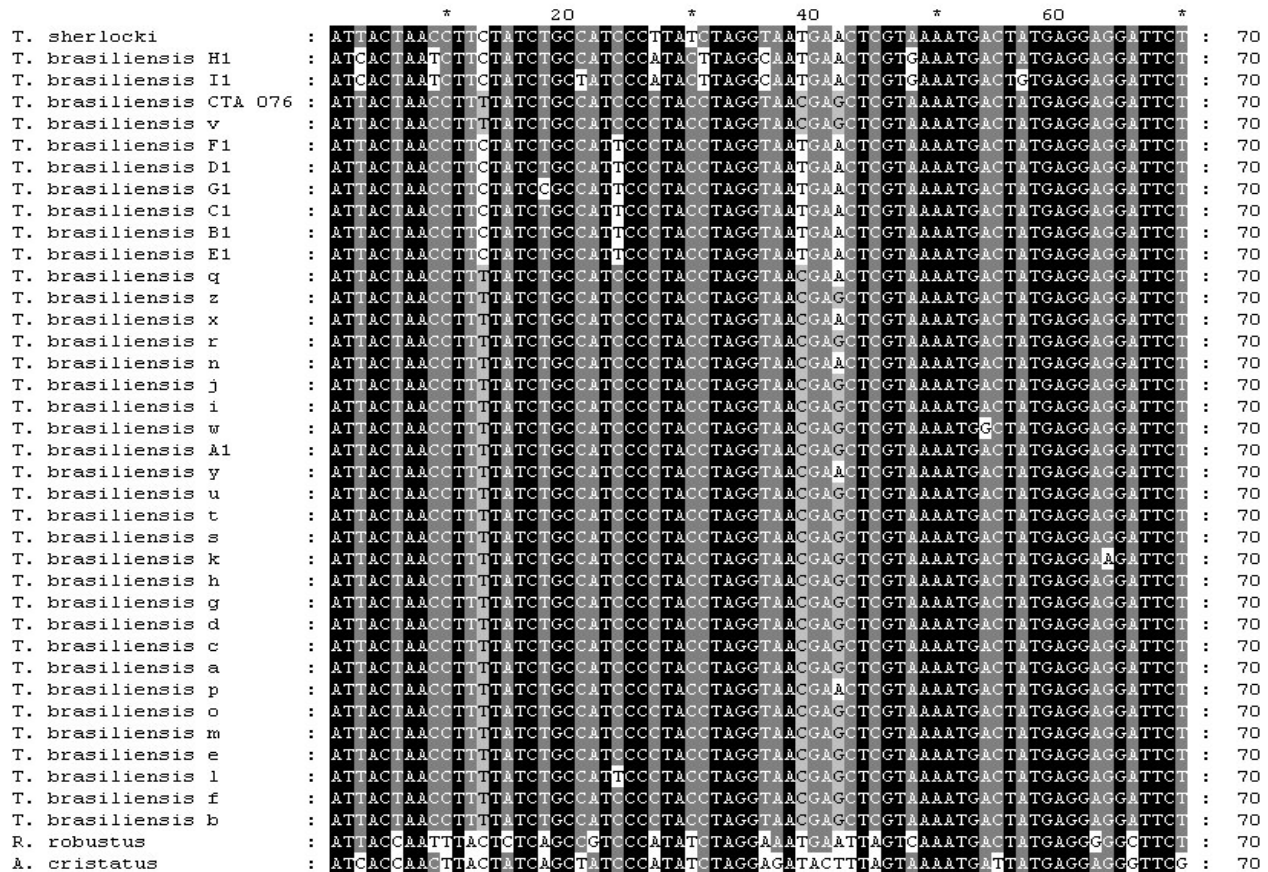


Figura 7. Alinhamento das sequências do gene mitocondrial do citocromo b apresentando um fragmento de 399 pares de bases envolvendo as espécies, *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), haplótipos de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), *R. robustus* e *A. cristatus*.

		360	*	380	*	
T. sherlocki	:	AGTAACCCAGTCCATATCCAACTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis H1	:	AGTAACCCAGTCCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis I1	:	AGTAACCCAGTCCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis CTA 076	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis v	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis F1	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis D1	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis G1	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis C1	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis B1	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis E1	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis q	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis z	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis x	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis r	:	AGTAACGCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis n	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis j	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis i	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis w	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis A1	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis y	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis u	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis t	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis s	:	AGTAACGCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis k	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis h	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis g	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis d	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis c	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis a	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis p	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis o	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis m	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis e	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis l	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis f	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
T. brasiliensis b	:	AGTAACCCAGTTCACATTCAACCTGAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		
R. robustus	:	CGTAACCCAGTACATATTCAACCAAGAAATGATACTTCCTATTTGCCTAC	:	399		
A. cristatus	:	AGTAACCCAGTACATATTCAACCAAGAAATGATACTTCCTATTTGCATAT	:	399		

Continuação da figura 7

Por meio do alinhamento foi possível observar que a sequência do citocromo b do *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) é idêntica à sequência do citocromo b do haplótipo “v” (Monteiro *et al.*, 2004) proveniente do Ceará e identificada como a subespécie *T. brasiliensis brasiliensis*. Já a sequência do citocromo b do *T. sherlocki* foi muito próxima às sequências dos haplótipos “H” e “I” (Monteiro *et al.*, 2004) provenientes do Norte de Minas Gerais e identificadas como a subespécie *T. brasiliensis melanica*. A identidade entre essas duas espécies, *T. sherlocki* e *T. brasiliensis melanica* foi de 91% em relação aos nucleotídeos.

A partir desse alinhamento foi proposta uma árvore filogenética envolvendo *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 - SESA), todos os haplótipos de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), *R. robustus* e *A. cristatus* (Figura 8).

As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA 3.1 e as relações filogenéticas construídas baseadas na metodologia de distância a partir de algoritmo *Neighbor Joining* com parâmetros *p-distance* e *Kimura 2-p*.

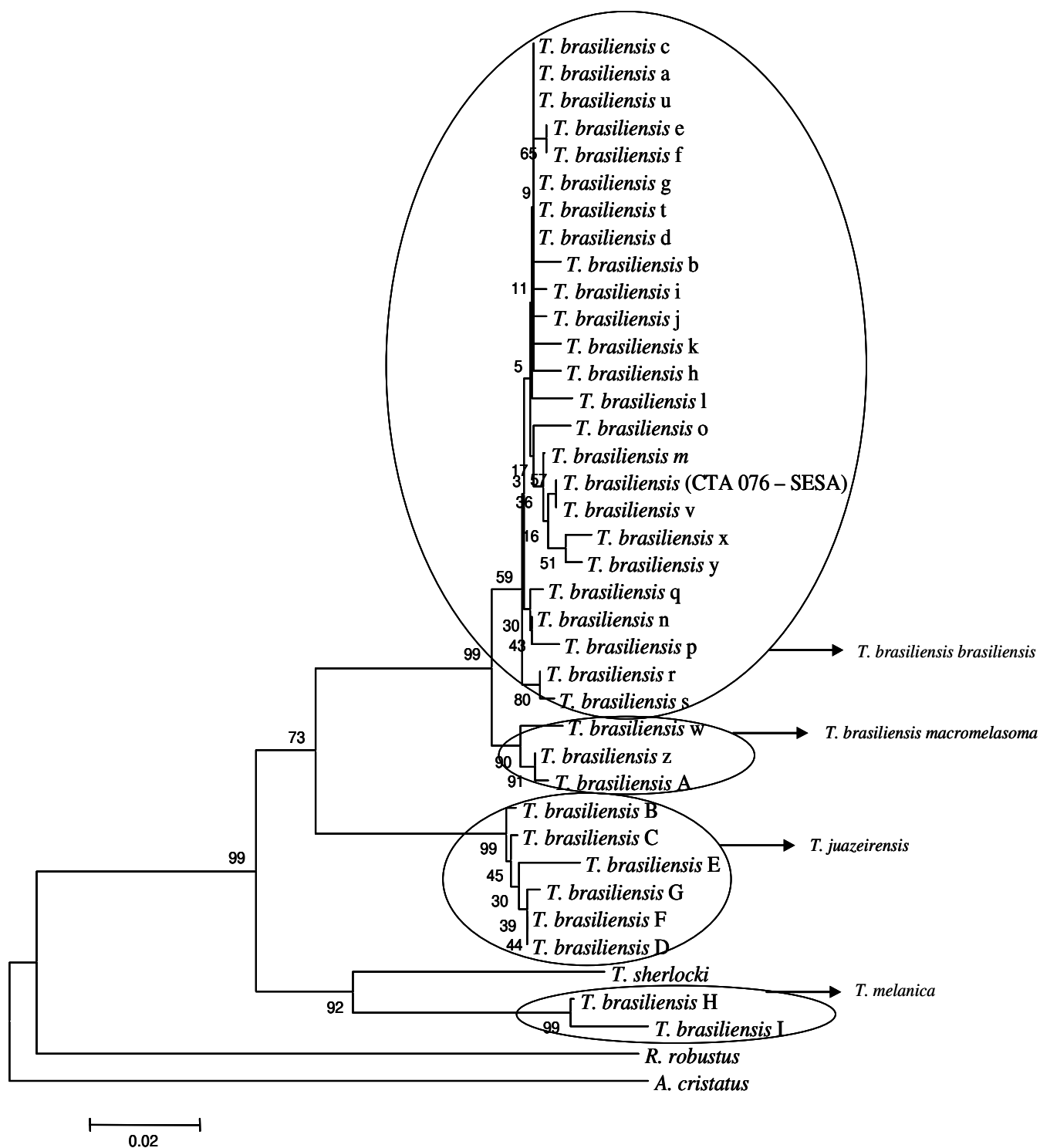


Figura 8. Árvore filogenética proposta construída a partir de metodologia de distância utilizando algoritmo *Neighbor Joining* e parâmetro *p-distance* a partir do alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do citocromo b envolvendo as espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), haplótipos do *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), *R. robustus* e *A. cristatus*.

T. sherlocki aparece estritamente relacionado com o haplótipo “H” e “I” de *T. brasiliensis* (correspondente à subespécie *T. brasiliensis melanica*) e formando um clado distinto dos demais. O outro clado apresenta-se subdividido onde os haplótipos B, C, E, G, F e D (correspondente à subespécie *T. brasiliensis juazeirensis*) estão agrupados aparecendo como grupo-irmão de uma segunda subdivisão envolvendo os haplótipos w, z e A (correspondente à subespécie *T. brasiliensis macromelasoma*) e os haplótipos c, a, u, e, f, g, t, d, b, i, j, k, h, l, o, m, v, x, y, q, n, p, r e s (correspondentes à subespécie *T. brasiliensis brasiliensis*). *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) apresentando a mesma seqüência que o haplótipo v, enquadra-se no clado da subespécie *T. brasiliensis brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004).

Rhodnius robustus e *A. cristatus* ficaram bem definidos como grupo externo, evidenciando um grupo monofilético para todas as subespécies de *T. brasiliensis* e também para *T. sherlocki*.

A árvore filogenética construída baseada em metodologia de distância utilizando o modelo *Kimura 2-p* apresentou a mesma topologia da árvore inferida baseada no modelo de *p-distance*.

Uma segunda topologia foi inferida baseada em Máxima Parcimônia utilizando para isso o programa PAUP 4.0 BETA (Swofford, 1998) (Figura 9). As espécies utilizadas para isso foram *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), os haplótipos de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) e *R. robustus*, *P. megistus* Burmeister, 1835 e *A. cristatus* como táxons externo.

O índice de Bremer mostrado nos nós da árvore indica o suporte do clado e nesse caso reflete em uma filogenia consistente.

A melhor árvore encontrada por parsimônia necessitou de 306 passos apresentando os valores de CI = 0,686; RI = 0,774; RC = 0,531 e HI = 0,314.

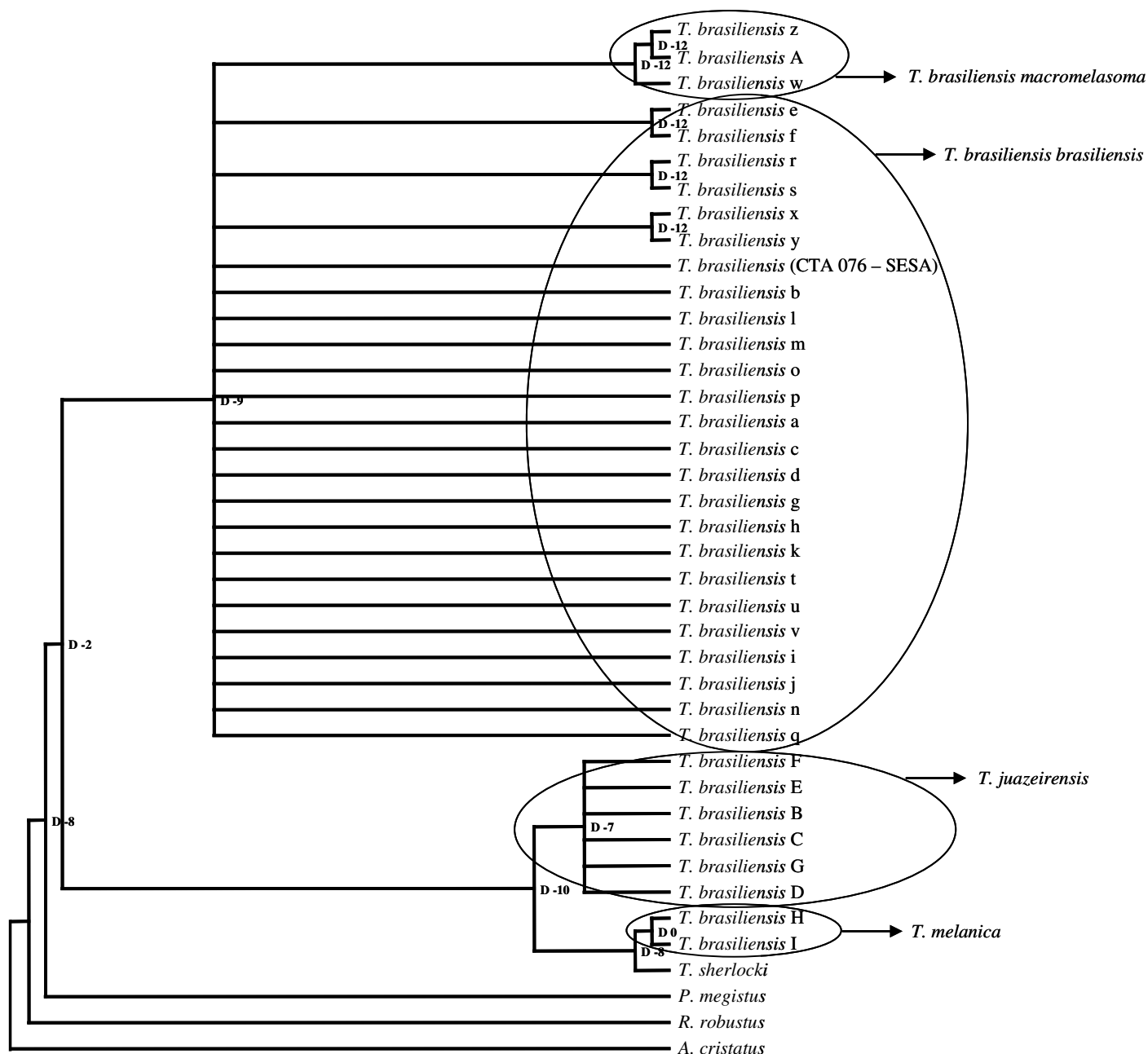


Figura 9. Topologia inferida baseada no método de Máxima Parcimônia envolvendo as espécies *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), os haplótipos de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), *R. robustus*, *P. megistus* Burmeister, 1835 e *A. cristatus* como grupo externo, a partir do alinhamento de 399 pares de bases do gene mitocondrial do citocromo b.

As subespécies *macromelasoma* e *brasiliensis* formaram uma dicotomia, enquanto que *T. juazeirensis* e *T. melanica* ficaram bem definidos como o táxons-irmãos. Essa diferença aparente

mostra bem a distinção dessas duas espécies com as outras duas subespécies, o que pode refletir no seu novo status taxonômico.

As espécies definidas como grupo-externo enraizou de maneira evidente o clado formado pelas espécies *T. juazeirensis* como clado irmão da relação *T. melanica* e *T. sherlocki*. A filogenia foi bem suportada pelo Índice de Bremer.

Por essa metodologia, a topologia se mostrou semelhante à encontrada por distância, com exceção da dicotomia formada pelas subespécies *macromelasoma* e *brasiliensis*. *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) permaneceu fazendo parte do clado representado pela subespécie *brasiliensis* e *T. sherlocki* se mostrou estritamente relacionado filogeneticamente com a espécie *T. melanica*.

Outro alinhamento envolvendo alguns gêneros das duas principais tribos da subfamília Triatominae, Rhodniini (*Rhodnius* e *Psammolestes*) e Tiatomini (*Triatoma*, *Panstrongylus* e *Dipetalogaster*), foi realizado com a finalidade de inferir uma filogenia mais ampla para o grupo, incluindo os haplótipos “H” e “I” de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), *T. sherlocki* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) utilizando como táxon externo *A. cristatus* (Figura 10).

		*	20	*	40	*	60	*																																												
T. sherlocki	:	ATT	ACTA	AAC	CTT	CT	AT	CT	TGC	CA	T	CC	CT	T	AT	CT	AG	GT	A	A	T	G	A	CT	CG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70						
T. brasiliensis H	:	AT	C	A	C	T	A	A	T	C	T	T	C	T	A	T	C	T	G	C	C	A	T	T	G	G	C	A	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	G	A	G	G	A	T	T	C	:	70
T. brasiliensis I	:	AT	C	A	C	T	A	A	T	C	T	T	C	T	A	T	C	T	G	C	C	A	T	T	G	G	C	A	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	G	A	A	T	G	A	G	G	A	T	T	C	:	70
T. brasiliensis CTA 076	:	ATT	ACT	A	A	C	CT	TT	T	T	C	T	G	C	A	T	CC	CT	AC	CT	AG	GT	A	A	C	G	CT	CG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70			
T. infestans	:	ATT	ACT	A	A	C	CT	TT	T	T	C	T	G	C	A	T	CC	CT	AC	CT	AG	GT	A	A	C	G	CT	CG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70			
T. rubida sonoriana	:	ATT	ACC	A	A	TT	T	A	T	T	C	T	G	C	A	T	CC	CT	AT	CT	AG	GT	A	A	A	T	G	CT	AG	GT	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	T	T	C	:	70					
T. protracta	:	ATT	ACT	A	A	C	T	ACT	AT	C	C	G	G	G	TT	CC	CT	AT	CT	AG	GT	A	A	C	G	A	AT	T	G	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	T	T	C	:	70					
T. dimidiata	:	ATT	ACC	A	A	T	C	T	A	A	T	C	C	G	C	T	AT	CC	CT	ACT	AT	AG	GT	A	A	C	G	AT	T	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70	
T. recurva	:	ATT	ACT	A	A	TT	T	A	A	T	C	T	G	C	C	A	T	CC	CT	AT	CT	G	G	A	A	T	G	AT	CT	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	G	T	T	C	:	70	
T. sanguisuga	:	ATT	ACT	A	A	TT	T	A	A	T	C	T	G	C	C	A	T	CC	CT	ACT	AT	AG	GT	A	A	C	G	AT	T	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	G	G	TT	C	:	70			
T. picturata	:	ATT	ACC	A	A	CT	T	G	AT	A	T	C	T	G	C	T	AT	CC	CT	AT	CT	AG	GT	A	A	C	G	AT	CT	AG	T	C	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70
T. sordida	:	ATT	ACC	A	A	CC	T	CC	CT	AT	C	C	G	C	A	T	CC	CT	AT	CC	CT	AG	GT	A	A	C	G	CT	CG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	G	A	T	T	C	:	70			
T. nitida	:	ATT	ACT	A	A	TT	T	A	T	T	C	T	G	C	A	A	T	CC	CT	AT	T	AG	GT	A	A	C	G	CT	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70		
T. pallidipennis	:	ATT	ACC	A	A	CC	T	A	A	T	C	T	G	C	A	T	CC	CT	AC	CT	AG	GT	A	A	C	G	CT	AG	T	C	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70		
T. phyllosoma	:	ATT	ACA	A	A	TT	T	A	A	T	C	T	G	C	A	T	CC	CT	AC	CT	AG	GT	A	A	C	G	CT	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70			
P. megistus	:	ATT	ACT	A	A	CC	T	ACT	AT	C	G	C	A	A	T	CC	CT	ACT	AT	AG	GT	A	A	T	G	A	A	T	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	T	T	C	:	70					
D. maximus	:	ATT	ACT	A	A	CC	T	CC	CT	AT	C	T	G	C	A	A	T	CC	CT	AT	T	AG	GT	A	A	C	G	AT	CT	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	G	G	TT	C	:	70			
Psa. coreodes	:	AT	ACT	A	A	TT	T	G	CT	AT	C	A	G	CT	AT	CC	CT	AC	CT	AG	GT	A	A	C	G	AT	G	A	AT	T	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	G	G	TT	T	C	:	70	
R. brethesi	:	AT	C	A	C	A	A	CC	T	AT	T	AT	C	A	G	CT	AT	CC	CT	AT	T	AG	GT	A	A	C	G	AT	CT	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	CT	T	C	:	70		
R. pictipes	:	AT	C	A	C	A	A	CC	T	AT	T	AT	C	A	G	CT	AT	CC	CT	AT	T	AG	GT	A	A	C	G	AT	CT	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	CT	T	C	:	70		
R. ecuadoriensis	:	AT	C	A	C	A	A	TT	T	AT	T	C	T	G	C	A	T	CC	CT	AT	CT	AG	GT	A	A	C	G	AT	CT	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	A	T	T	C	:	70	
R. neglectus	:	ATT	ACT	A	A	TT	T	ACT	CT	C	A	G	CC	AT	CC	CT	AT	T	AG	GT	A	A	C	G	AT	G	A	AT	T	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	CT	T	C	:	70		
R. robustus	:	ATT	ACC	A	A	TT	T	ACT	CT	C	A	G	CC	T	CC	CT	AT	CT	AG	GT	A	A	C	G	AT	G	A	AT	T	AG	T	C	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	G	CT	T	C	:	70		
A. cristatus	:	ATT	ACC	A	A	CT	ACT	AT	C	A	G	CC	AT	CC	CT	AT	CT	AG	GT	A	A	C	G	AT	G	A	CT	AG	T	AG	T	A	A	A	T	G	A	CT	AT	G	A	G	G	A	G	CT	T	C	:	70		

Figura 10. Alinhamento das seqüências do gene mitocondrial do citocromo b gerando um fragmento de 399 pares de bases envolvendo as espécies *T. sherlocki*, haplótipos de H e I de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e de outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

		80	*	100	*	120	*	140	
T. sherlocki	:	CGGTTGATAAAGCTACCCCTAACACGATTCTTTGGCTTCCACTTTCCTTCTACCGCTTTATCATTGGCCGCCCT	:	140					
T. brasiliensis H	:	CTGTTGATAAAGCCACTCTAACACGATTTTTGGCCCTCCATTTCCCTCCCTACCATTTTATTATGGCCGCCCT	:	140					
T. brasiliensis I	:	CTGTTGATAAAGCCACTCTAACACGATTTTTGGCCCTCCATTTCCCTCCCTACCATTTTATTATGGCCGCCCT	:	140					
T. brasiliensis CTA 076	:	CGGTTGATAAAGCTACTTTAACACGATTCTTTGGCCCTTCACTTCCCTCCCTACCATTTTATTATGGCTGCCCT	:	140					
T. infestans	:	CTGTTGATAAAGCCACATTAACACGATTCTTTGGCCCTCCACTTTCCCTCCCTACCATTTTATTATGGCCGCCAT	:	140					
T. rubida sonoraiana	:	CGGTTGATAAAGCCACATTAACACGATTCTTTGGCCCTACACTTTCTTCTTCCATTTTATCATTGGCAGCTAT	:	140					
T. protracta	:	CGGTAGATAAAGCCACCTTAACCGGATTCTTTGGCCCTTACACTTTCTATACCTTTTATTATGGCAGCCCT	:	140					
T. dimidiata	:	CTGTAGATAAAGCCACCTTAACCGGATTCTTTGGCCCTTCACTTTCTCCCTACCGCTTTTATTATGGCAGCCAT	:	140					
T. recurva	:	CTGTAGATAAAGCCACCCCTAACCGGATTCTTTGGCCCTTCACTTTCTTTTGGCCCTTTTATTATGGCAGCCAT	:	140					
T. sanguisuga	:	CTGTTGATAAAGCCCTTAACCTCGATTCTTTTGGCCCTTACACTTTCCTTCTACCGCTTTTATTATGGCAGCCAT	:	140					
T. picturata	:	CGGTAGATAAAGCCACATTAACCGGATTCTTTTGGCCCTTCACTTTCTTTTACCGCTTTTATTATGGCAGCTAT	:	140					
T. sordida	:	CGGTAGATAAAGCCACCTTAACACGATTCTTACGCCCTCCACTTCCCTCCCTCCGCTTTATCATGGCTACCCCT	:	140					
T. nitida	:	CGGTTGATAAAGCCACATTAACCTCGATTCTTTTGGCCCTTACACTTTCTCCCTCCGATTTTATTATGGCAGCAAT	:	140					
T. pallidipennis	:	CTGTAGATAAAGCCACATTAACCGGATTCTTTTGGCCCTCCACTTTCTACTACCGCTTTTATTATGGCAGCTAT	:	140					
T. phyllosoma	:	CGGTAGATAAAGCCACATTAACCTCGATTCTTTTGGCCCTTCACTTTCCTACTACCGCTTTTATTATGGCAGCCAT	:	140					
P. megistus	:	CAGTAGATAAAGCTACATTAACCTCGATTCTTTTGGCTTCCACTTTCCTTTTACCTTTTCATTATTTGGCAGCCCT	:	140					
D. maximus	:	CGGTTGATAAAGCCACTCTAACCTCGATTCTTTTGGCCCTTACACTTTCCTTTTACCTTTTATTATTTGGCAGCTTT	:	140					
Psa. coreodes	:	CTGTAGATAAAGCCACATTAACCTCGATTCTTTTGGCTTCCACTTTCCTTTTACCATTCATTATTTGGCAGCTTT	:	140					
R. brethesi	:	CTGTAGATAAAGCCACATTAACCTCGATTCTTTTGGCTTCCACTTTCCTTTTACCATTCATTATTTGGCAGCTTT	:	140					
R. pictipes	:	CTGTAGATAAAGCCACATTAACCTCGATTCTTTTGGCCCTCCACTTTCCTTTTACCATTCATTATTTGGCAGCTTT	:	140					
R. ecuadoriensis	:	CGGTTGATAAAGCCACATTAACCTCGATTCTTTTGGCCCTTACACTTTTATTACCTTTTATTATTTGGCTGCCCT	:	140					
R. neglectus	:	CGGTGATAAAGCCACATTAACCGGATTCTTTTGGCTTTCATTTTCCCTCCCTCCGCTTTTATTATGGCCGCAT	:	140					
R. robustus	:	CAGTTGATAAAGCCACATTAACCGGATTCTTTTGGCTTTCATTTTCCCTCCCTCCGCTTTTATTATGGCTGCAT	:	140					
A. cristatus	:	CAGTAGATAAAGCCACACTCACTCGATTCTTTTACATTTACATTTTCTTTTACCATTTTATCCCTGGCAGCAAT	:	140					
		*		160	*	180	*	200	*
T. sherlocki	:	CACGATAATCCACTCTCTTTCTTTACATTCACACAGGATCCACAAATCCATTAGGATTAACAGAACTCTC	:	210					
T. brasiliensis H	:	CACAATAATCCATCTTCTATTCTCTACACCAACAGGATCTAATAACCCATTAGGATTAACAGAACTCTC	:	210					
T. brasiliensis I	:	CACAATAATCCATCTTCTATTCTCTACACCAACAGGATCTAATAACCCATTAGGATTAACAGAACTCTC	:	210					
T. brasiliensis CTA 076	:	CACAATAGTCCATCTACTATTCTCTACACCAACAGGATCTAATAATCCATTAGGATTAACAGAACTCTC	:	210					
T. infestans	:	AACAATAATTCATCTATTATTTTACATTCACACAGGATCAAGTAATCCGCTTAGGATTAACAGAACTCTC	:	210					
T. rubida sonoraiana	:	AGTAATAGTTCATCTCCTATTTTTACACCAACAGGATCTAGCAACCCATTAGGATTAAGTAGAACTTT	:	210					
T. protracta	:	AGTTATGATTCACCTCTTATTCTCTCATCAACAGGATCTAGTAACCCCTTTGGGACTTCAAGGAAACTTT	:	210					
T. dimidiata	:	GGTAATAATCCACTCTCTATTTTTCATCAACAGGATCCAGAAATCCATTAGGATTAACAGAACTTT	:	210					
T. recurva	:	AGTAATAATTCATCTCTTATTCTCTACATCAACAGGATCAAGAAACCCCTTTAGGATTAACAGAACTCTC	:	210					
T. sanguisuga	:	AGTAATAATCCATCTTTTATTTTACACCAACAGGATCCAGAAACCCGATTAGGATTAAGTAGAACTTT	:	210					
T. picturata	:	AGTAATAATTCACCTCTTATTTTTCATCAACAGGATCAAGAAACCCCTTAGGGTTAAACAGAAATTTT	:	210					
T. sordida	:	CACAATAATCCACTTACTATTCTCTACCAACAGGCTCAAGAAACCCGCTAGGACTTAACAGAACTCTC	:	210					
T. nitida	:	AGTAATAATTCACCTCTCTATTTTTCATCAACAGGATCAAGCAACCCATTAGGATTAACAGAACTTT	:	210					
T. pallidipennis	:	AGTGATAATTCACCTCTTATTTTTCATCAACAGGATCAAGAAACCCCTTAGGGTTAAACAGTAATTTT	:	210					
T. phyllosoma	:	AGTAATAATTCATCTCTTATTTTTCATCAACAGGATCAAGAAACCCCTCTAGGACTTAACAGAACTTT	:	210					
P. megistus	:	AGTAATGATTCATCTACTATTTTTCATCAACTGGATCTAGAAATCCCTTAGGACTTAACAGAACTTT	:	210					
D. maximus	:	AGTAATAATTCATCTCCTTTTCTCTCATCAACAGGTTCTAGAAACCCCTTAGGGATTAACAGAACTTT	:	210					
Psa. coreodes	:	AACATAATTCATTTATTTTCTCTCATCAACAGGATCTAGAAACCCCTTAGGGCTAAGGAGAGACTTA	:	210					
R. brethesi	:	AACATAATTCATTTATTTTTCATCAACAGGATCTAATAACCCGTTAGGATTAACAGAACTTTA	:	210					
R. pictipes	:	AACATAATTCATTTATTTTTCATCAACAGGATCTAACAACCCCTTAGGATTAACAGAACTTTA	:	210					
R. ecuadoriensis	:	AACATAAGTACACTCTTATTTTTCACCAACAGGTTCTAATAACCCCTTAGGGATTAACAGAACTTTA	:	210					
R. neglectus	:	AACATAAGTCCACTATTTATTTTACCAACAGGCTCCAGAAACCCCTTAGGGTTAACAGAACTTTA	:	210					
R. robustus	:	AACCATAATCCACTTATTTATTTTACCAACAGGCTCCAGAAACCCCTTAGGGTTAACAGAACTTTA	:	210					
A. cristatus	:	AACAATAATTCACTTACTTTTCTCTCATCAACAGGATCAATAATCCATTAGGGCTAACAGAACTTTA	:	210					
		220	*	240	*	260	*	280	
T. sherlocki	:	GACAAAATCCCATTTCCACCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					
T. brasiliensis H	:	GACAAAATCCCATTTCCACCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					
T. brasiliensis I	:	GACAAAATCCCATTTCCACCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					
T. brasiliensis CTA 076	:	GACAAAATCCCATTTCCATCCCTATTCTCAACTAAGGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					
T. infestans	:	GACAAAATCCCATTTCCACCCCTATTCTCTCAATCAAGGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					
T. rubida sonoraiana	:	GATAAAATCCCATTTCCATCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					
T. protracta	:	GATAAGATTCATTTCCATCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					
T. dimidiata	:	GATAAAATCCCATTTCCATCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCCCTAACCTTTAATATAT	:	280					
T. recurva	:	GATAAAATCCCATTTCCACCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCTTTGACCTTTAATATAT	:	280					
T. sanguisuga	:	GATAAGATTCATTTCCATCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCCGCTAACATTAATATAT	:	280					
T. picturata	:	GACAAAATTCATTTCCACCCCTACTTCTCGATTAAGGACTTAATAGGAGTATCCCTAACCTTTAATATAT	:	280					
T. sordida	:	GATAAAATCCCATTTCCACCCCTACTTCTCAATTAAGGACTTAATAGGGGTTTCACTACACTTATATATAT	:	280					
T. nitida	:	GATAAAATTCCTTTTCCACCCCTACTTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCTCTAACCTTTAATATAT	:	280					
T. pallidipennis	:	GATAAAATTCCTTTTCCACCCCTACTTCTCGATTAAGGACTTAATAGGAGTATCCCTAACCTTTAATATAT	:	280					
T. phyllosoma	:	GACAAAATTCCTTTTCCACCCCTACTTCTCAATCAAGGACTTAATAGGAGTATCCCTAACCTTTAATATAT	:	280					
P. megistus	:	GATAAAATTCATTTCCATCCCTACTTCTCAATCAAGGACTTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					
D. maximus	:	GATAAGATTCATTTCCATCCCTACTTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCTTTGACCTTTAATATAT	:	280					
Psa. coreodes	:	GACAAAATTCCTTTTCCACCCCTACTTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATAGTATTACATTAATATAT	:	280					
R. brethesi	:	GATAAAATCCCATTTTCCACCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATATTACCTATTAATATAT	:	280					
R. pictipes	:	GATAAAATCCCATTTTCCACCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATATTACCTATTAATATAT	:	280					
R. ecuadoriensis	:	GACAAAATCCCATTTTCCACCCCTATTCTCTCAATTAAGGACTTAATAGGAGTATCTATTACCTATTAATAT	:	280					
R. neglectus	:	GATAAAATTCCTTTTCCACCCCTACTTCTCAATTAAGGACTTAATAGGGGTTATTATTACCTATTAATATAT	:	280					
R. robustus	:	GATAAAATTCCTTTTCCATCCCTACTTCTCAATTAAGGACTTTATAGGAGTATATTACCTATTAATATAT	:	280					
A. cristatus	:	GATAAAATCCCATTTCCACCCCTACTTCTCTCAATCAAGGACTTAATAGGAGTATCAATTACATTAATATAT	:	280					

Continuação da figura 10

			*	300	*	320	*	340	*	
T. sherlocki	:	TCATCATACTTAATTTATGAGAACCAAGAAATCTAGGAGACCCAGAAAAC	TTT	CATTCCGCGCAAAACCCATT	:	350				
T. brasiliensis H	:	TCATCATACTTAATTTATGAGAACCAAGAAATCCTGGGAGACCCAGAAAAC	TTT	CATTCCGAGCAAAATCCATT	:	350				
T. brasiliensis I	:	TCATCATACTTAATTTATGAGAACCAAGAAATCCTGGGAGACCCAGAAAAC	TTT	CATTCCGAGCAAAATCCATT	:	350				
T. brasiliensis CTA 076	:	TTATTATACCTTAACCTTATGGGAACCAAGAAATTTTGGGAGATCCAGAAAAT	TTT	TATCCGAGCAAAACCCATT	:	350				
T. infestans	:	TTATCCTACTTAACCTTATGAGAACCAAGAAATTTTGGGAGATCCAGAAAAT	TTT	TATCCGAGCAAAATCCACT	:	350				
T. rubida sonoriانا	:	TCATTATATTAAATTTATGAGAACCAAGAAATCTAGGAGATCCAGAAAAT	TTT	TATCCGAGCAAAATCCATT	:	350				
T. protracta	:	TTATTATATTAAACCTCTGAGAACCAAGAAATCCTGGGAGACCCAGAAAAC	TTT	TATCCCTGCTAAATCCACT	:	350				
T. dimidiata	:	TCATCCTCCTCAGTCTATGAGAAGCTCCAAATTTTAAATAGACCCAGAAAAC	TTT	TATCCCTGCAAAACCCACT	:	350				
T. recurva	:	TTATCTTTATTAGTCTTTGAGAAGGCCCTATTCTTATAGACCCAGAAAAC	TTT	CATTCCCTGCAAAATCCCTCT	:	350				
T. sanguisuga	:	TTATTCTATTAAAGCTTTATGGAGAGGCCCAATTTCTAATAGACCCAGAAAAT	TTT	TATCCCTGCAAAACCCATT	:	350				
T. picturata	:	TAATCTTTATTAAAGCTTTATGAGAAGGCCCAATTTTAAATAGACCCAGAAAAC	TTT	CATTCCCTGCAAAATCCATT	:	350				
T. sordida	:	TCATCCTACTTAACCTATGAGAAGCCCGCTCCTCGGAGATCCAGAAAAC	TTT	CATCCGAGCAAAACCCACT	:	350				
T. nitida	:	TTATTATATTAAATTTATGAGAAGCTCGAAATTTTGGGAGATCCGAAAAC	TTT	TATCCCGCAAAATCCATT	:	350				
T. pallidipennis	:	TTATCCTATTAAAGCTTTATGAGAAGGCCCAATTTTAAATAGACCCAGAAAAC	TTT	CATTCCCTGCAAAATCCATT	:	350				
T. phyllosoma	:	TCATCCTGCTTAAGCCTATGAGAAGGCCCAATTTTAAATAGACCCAGAAAAC	TTT	TATCCCGCGCAAAACCCATT	:	350				
P. megistus	:	TTATTATATTAAATCTTTGAGAGGCCCGCTATTTTGGGAGATCCAGAAAAC	TTT	TATCCGAGCAAAATCCGTTT	:	350				
D. maximus	:	TCATTCTACTCAGCCTATGAGAAGCTCGAAATTTCTAGGAGATCCGAAAAC	TTT	TATCCCTGCAAAACCCGCT	:	350				
Psa. coreodes	:	TTATTTTATTAAATTTATGAGAAGCCCGGACTTCTAGGAGATCCAGAAAAC	TTT	TATCCCTGCAAAATCCACT	:	350				
R. brethesi	:	TTATCTTTATTAAATTTATGAGAAGCAAGAAATCTTGGGAGACCCAGAAAAT	TTT	TATCCGAGCAAAACCCGCT	:	350				
R. pictipes	:	TTATCTTTACTAAATTTATGAGAAGCAAAATCTTGGGAGACCCAGAAAAT	TTT	TATCCGAGCAAAATCCACT	:	350				
R. ecuadoriensis	:	TTATTCTTTTAAATTTATGAGAAGCAAGAAATTTTGGGTGATCCAGAAAAT	TTT	TATCCGAGCAAAACCCGCT	:	350				
R. neglectus	:	TTATTTTATTAAATCTCTGAGAGCCAGAAATCTAGGAGATCCAGAAAAC	TTT	TATCCGAGCAAAACCCGCT	:	350				
R. robustus	:	TTATTTTATTAAATCTCTGAGAAGCAAGAAATCTAGGAGATCCAGAAAAC	TTT	TATCCGAGCAAAACCCACT	:	350				
A. cristatus	:	TTATTATATTAAACATTATTGAGAAGCAAGAAATCTATTAGGAGATCCGAAAAT	TTT	TATCCCTGCTAGCCCAATT	:	350				

			360	*	380	*	
T. sherlocki	:	AGTAACCCAGTCCATATCCAAACCTGAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. brasiliensis H	:	AGTAACCTCCAGTCCACATTCAAACCTGAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. brasiliensis I	:	AGTAACCCAGTCCACATTCAAACCTGAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. brasiliensis CTA 076	:	AGTAACCTCCAGTTCACATTCAAACCTGAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. infestans	:	AGTTACCCAGTTCACATTCAAACCTGAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. rubida sonoriانا	:	AGTTACACCAAGTACATATTCAACCAAGAAATGATATTTCCTATTTCGATAT	:	399			
T. protracta	:	AGTTACACCAAGTACACATTCAAACCTGAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. dimidiata	:	AGTTACACCAAGTACATATTCAACCAAGAAATGATATTTCCTATTTCGATAT	:	399			
T. recurva	:	AGTTACACCAAGTACATATTCAACCAAGAAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. sanguisuga	:	AGTAACACCAAGTCCACATTCAAACCAAGAAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. picturata	:	AGTTACACCAAGTACATATTCAACCAAGAAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. sordida	:	GGTGACCCAGTACACATTCAGCCTGAATGATATTTCCTATTTCGATAT	:	399			
T. nitida	:	AGTTACACCAAGTACATATTCAACCAAGAAATGATATTTCCTATTTCGATAT	:	399			
T. pallidipennis	:	AGTTACACCAAGTGCATATTCAACCAAGAAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
T. phyllosoma	:	AGTGACACCAAGTGCATATTCAAGCCAGAAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
P. megistus	:	AGTTACTCCAGTTCATATTCAAGCCTGAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
D. maximus	:	AGTAACGCCAGTTCACATTCAAACCAAGAAATGATACTTCTATTTCGATAT	:	399			
Psa. coreodes	:	TGTGACCCCTGTTCATATCCAAACCAAGAAATGATATTTCCTATTTCGCTAT	:	399			
R. brethesi	:	CGTAACACCAAGTTCATATTCAACCAAGAAATGATACTTCTATTTCGCTAT	:	399			
R. pictipes	:	CGTAACACCAAGTTCATATTCAACCAAGAAATGATACTTCTATTTCGCTAT	:	399			
R. ecuadoriensis	:	CGTTACTCCAGTTCATATCCAAACCAAGAAATGATATTTCCTATTTCGCTAT	:	399			
R. neglectus	:	CGTAACCCCTGTGCATATCCAAACCAAGAAATGATATTTCCTATTTCGCTAT	:	399			
R. robustus	:	CGTAACCTCCGTCATATTCAACCAAGAAATGATACTTCTATTTCGCTAT	:	399			
A. cristatus	:	AGTAACCCAGTTCATATTCAACCAAGAAATGATATTTCCTATTTCGCTAT	:	399			

Continuação da figura 10

O alinhamento das seqüências gerou um fragmento de 399 pares de bases. Nesse alinhamento não foram inseridos gaps e o mesmo se mostrou mais polimórfico em relação ao alinhamento envolvendo apenas os haplótipos de *T. brasiliensis*.

A relação filogenética baseada em metodologia de distância foi proposta e construída a partir de algoritmo *Neighbor Joining* e modelos de *p-distance* e *Kimura 2-p* baseada nas seqüências alinhadas das espécies envolvidas na figura 10 (Figura 11).

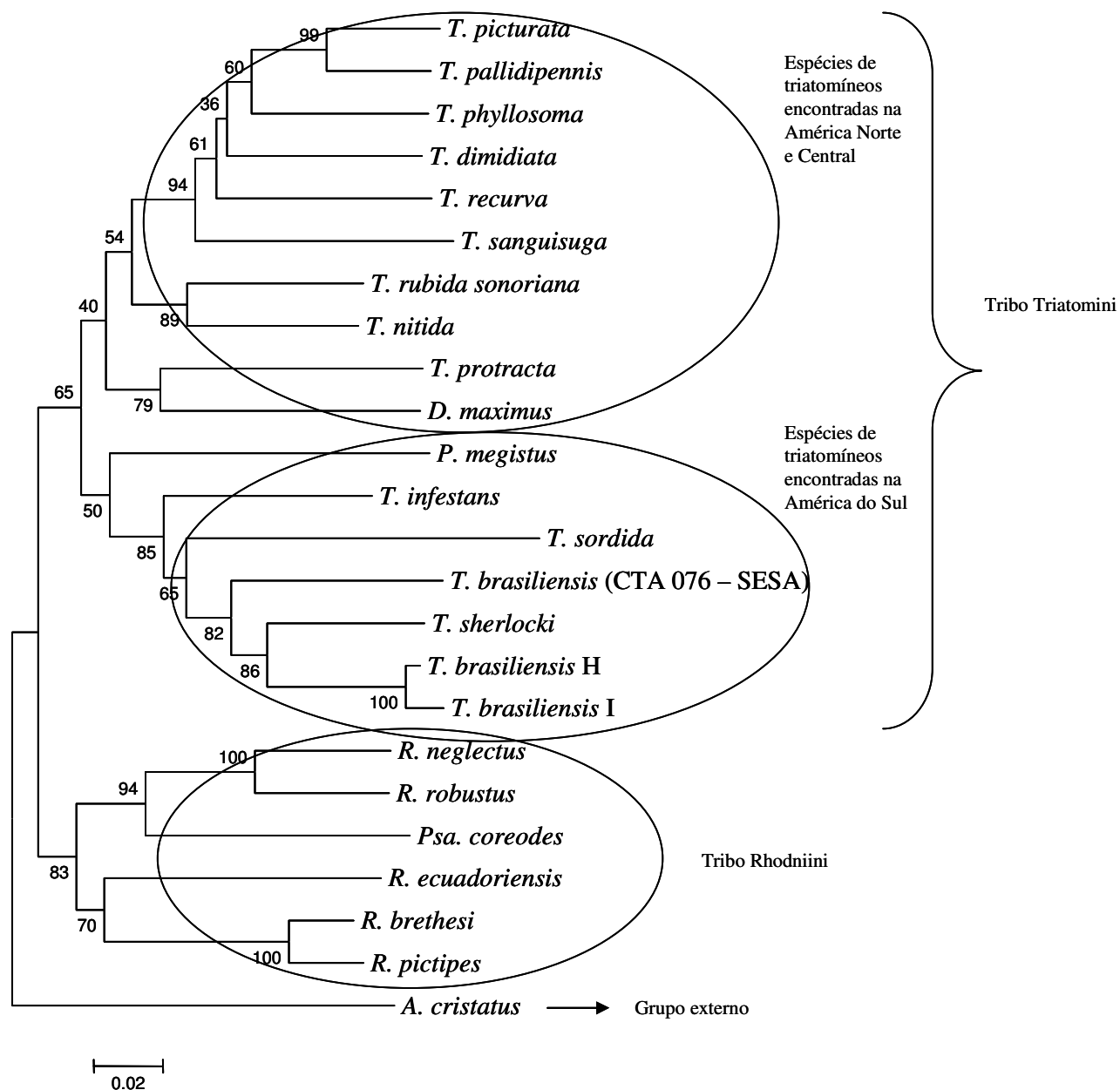


Figura 11. Árvore filogenética baseada em metodologia de distância com modelo de *Kimura2-p*, de acordo com o alinhamento de um fragmento de 399 pares de base do gene do citocromo b mitocondrial de *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), haplótipos H e I de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) e de outras espécies do gênero *Triatoma*, *Dipetalogaster* e *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

As espécies das duas tribos, Triatomini e Rhodniini, apresentaram-se claramente separadas em dois clados. O enraizamento dessa filogenia foi devido à presença de um táxon

externo representado pela espécie *A. cristatus*. O suporte foi gerado pela presença de bootstrap, garantindo robustez a topologia inferida.

As espécies da tribo Triatomini são subdivididas em dois clados. Em um estão relacionadas às espécies que se encontram distribuídas no Norte da América do Sul, América Central, México e Sul dos Estados Unidos (*T. picturata* Usinger, 1939, *T. pallidipennis* Stal, 1945, *T. phyllosoma* Burmeister, 1835, *T. dimidiata*, *T. recurva* Stal, 1868, *T. sanguisuga* Leconte, 1855, *T. rubida sonora* Usinger, 1944, *T. nitida* Usinger, 1939, *T. protracta* Uhler, 1894, *D. maxima* Uhler, 1894). No outro clado estão relacionadas às espécies que se encontram distribuídas na América do Sul (*P. megistus*, *T. infestans*, *T. sordida* Stal, 1859, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. sherlocki* e os haplótipos “H” e “I” de *T. brasiliensis*).

T. sherlocki aparece estritamente relacionada filogeneticamente com a espécie *T. melanica* confirmando a primeira filogenia proposta envolvendo as subespécies de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) (Figuras 8 e 9).

A árvore filogenética construída de acordo com o modelo *p-distance* apresentou a mesma topologia da árvore inferida com o modelo *Kimura 2-p*.

A relação filogenética baseada no método de Máxima Parcimônia também foi inferida envolvendo as mesmas seqüências das mesmas espécies o qual foi construída a filogenia baseada em distância, com a adição de *T. mazzotti* Usinger, 1941 (Figura 12).

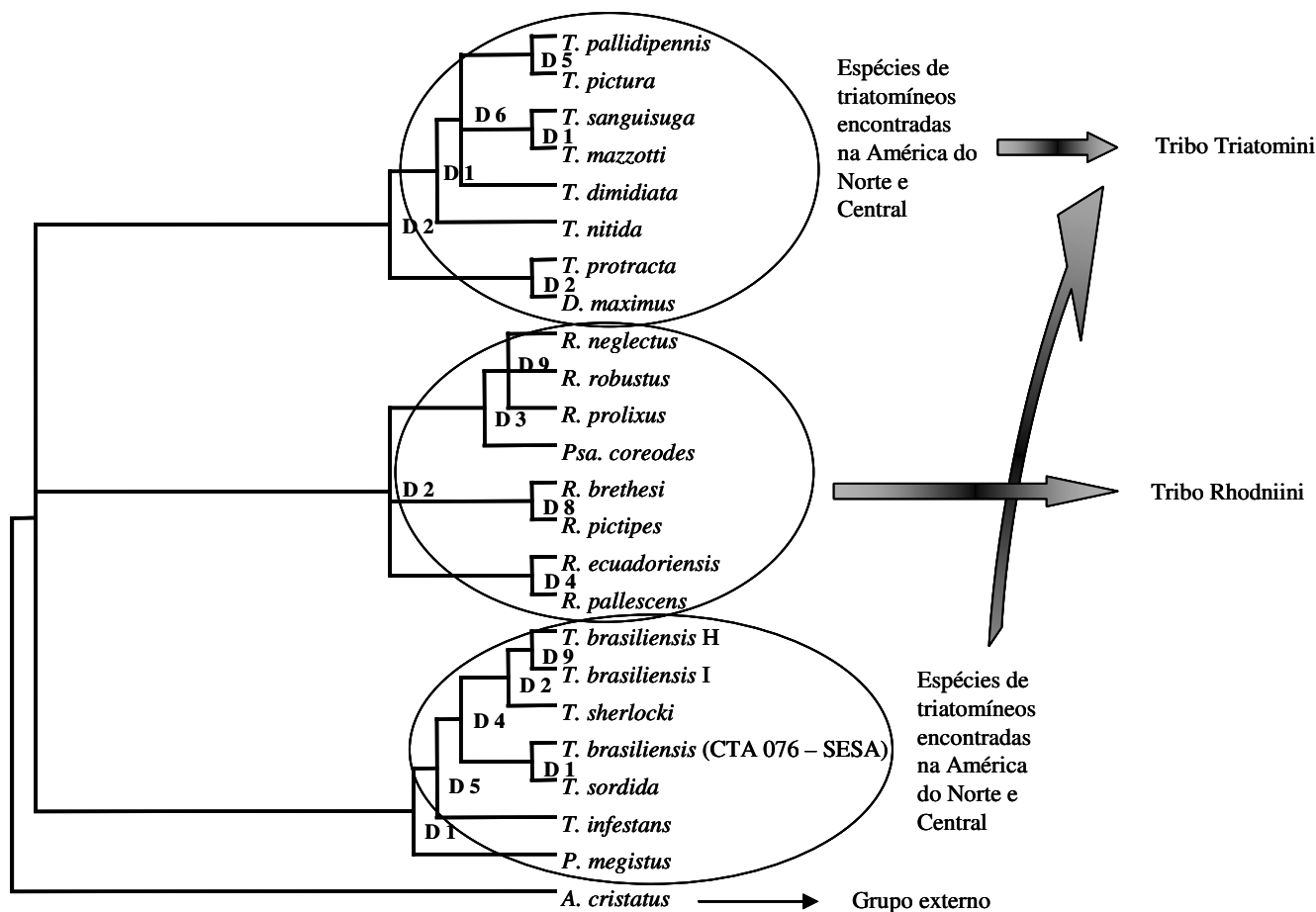


Figura 12. Topologia inferida baseada em método de Máxima Parcimônia de acordo com o alinhamento de um fragmento de 399 pares de base do gene do citocromo b mitocondrial, envolvendo as espécies *T. sherlocki*, os haplótipos H e I de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004), *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), e de outras espécies do gênero *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

Nessa filogenia observa-se uma politomia envolvendo os clados representados pelas espécies de triatomíneos sul-americanos, pelas espécies de triatomíneos norte-americanos e pelas espécies da tribo Rhodniini. *A. cristatus* ficou bem definido como táxon externo proporcionando um enraizamento evidente da filogenia inferida.

Mesmo envolvendo outras espécies, não apenas os haplótipos H e I de *T. brasiliensis*, *T. sherlocki* aparece estritamente relacionado com a espécie *T. melanica* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) apresenta-se próximo filogeneticamente com *T. sordida*.

Os clados apresentaram a robustez desejada visto o Índice de Bremer expressos na filogenia.

A melhor árvore encontrada por parcimônia necessitou de 805 passos apresentando os valores de CI = 0,366; RI = 0,524; RC = 0,192 e HI = 0,634.

A partir das seqüências de nucleotídeos do citocromo b, realizou-se tradução das mesmas gerando uma seqüência de 133 aminoácidos que também foram alinhadas (Figura 13).

			*	20	*	40	*	60	*	
T. sherlocki	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLTSNS	:	70		
T. brasiliensis H	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLTSNF	:	70		
T. brasiliensis I	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLTSNF	:	70		
T. brasiliensis CTA 076	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMVHLLFLHQTGS	NNPLGLTSNF	:	70		
T. infestans	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
T. rubida sonoriana	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	VMHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
T. protracta	:	ITNLLSAVPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLQGNF	:	70		
T. dimidiata	:	ITNLLMSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	VMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
T. recurva	:	ITNLLMSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	VMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
T. sanguisuga	:	ITNLLMSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	VMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
T. picturata	:	ITNLLMSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	VMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
T. sordida	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLTSNF	:	70		
T. nitida	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	VMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
T. pallidipennis	:	ITNLLMSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	VMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
T. phyllosoma	:	ITNLLMSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	VMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
P. megistus	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLTSNF	:	70		
D. maximus	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLNSNF	:	70		
Psa. coreodes	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLSSDL	:	70		
R. brethesi	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLKSDL	:	70		
R. pictipes	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLKSDL	:	70		
R. ecuadoriensis	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMVHLLFLHQTGS	NNPLGLKSNL	:	70		
R. neglectus	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMVHLLFLHQTGS	NNPLGLKSNL	:	70		
R. robustus	:	ITNLLSAVPYLG	NELVKWLWGGFSVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAL	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLKSNL	:	70		
A. cristatus	:	ITNLLSAIPYLG	NELVKWLWGGFVDNATL	TRFFALHFLLPFFIAAM	IMIHLLFLHQTGS	NNPLGLKSNL	:	70		
			80	*	100	*	120	*		
T. sherlocki	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. brasiliensis H	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. brasiliensis I	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. brasiliensis CTA 076	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. infestans	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. rubida sonoriana	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. protracta	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. dimidiata	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. recurva	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. sanguisuga	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. picturata	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. sordida	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. nitida	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. pallidipennis	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
T. phyllosoma	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
P. megistus	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
D. maximus	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
Psa. coreodes	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
R. brethesi	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
R. pictipes	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
R. ecuadoriensis	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
R. neglectus	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
R. robustus	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		
A. cristatus	:	DKIPFHPYFSI	KDLMGVSITLMLF	ILMLNLWEPRIL	CDPENFIPANPLVTPV	VHIQPEWYFLFAY	:	133		

Figura 13. Alinhamento das seqüências de 133 aminoácidos do gene mitocondrial citocromo b observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), haplótipos H e I do *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) e de outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster* e *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

Nesse alinhamento foi possível verificar que as bases polimórficas das seqüências dos nucleotídeos correspondem às mudanças encontradas nas seqüências dos aminoácidos.

T. sherlocki e *T. brasiliensis melanica* haplótipo “H” (Monteiro *et al.*, 2004) diferem entre si em apenas um aminoácido tornando-as mais próximas filogeneticamente do que mesmo entre os haplótipos H e I, que diferem entre si por dois aminoácidos. *T. sherlocki* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) apresentam sete aminoácidos diferentes, revelando um baixo polimorfismo do gene.

A construção de uma árvore filogenética baseada em distância a partir das seqüências dos aminoácidos foi proposta e construída com algoritmo *Neighbor Joining* utilizando modelo *p-distance* (Figura 14).

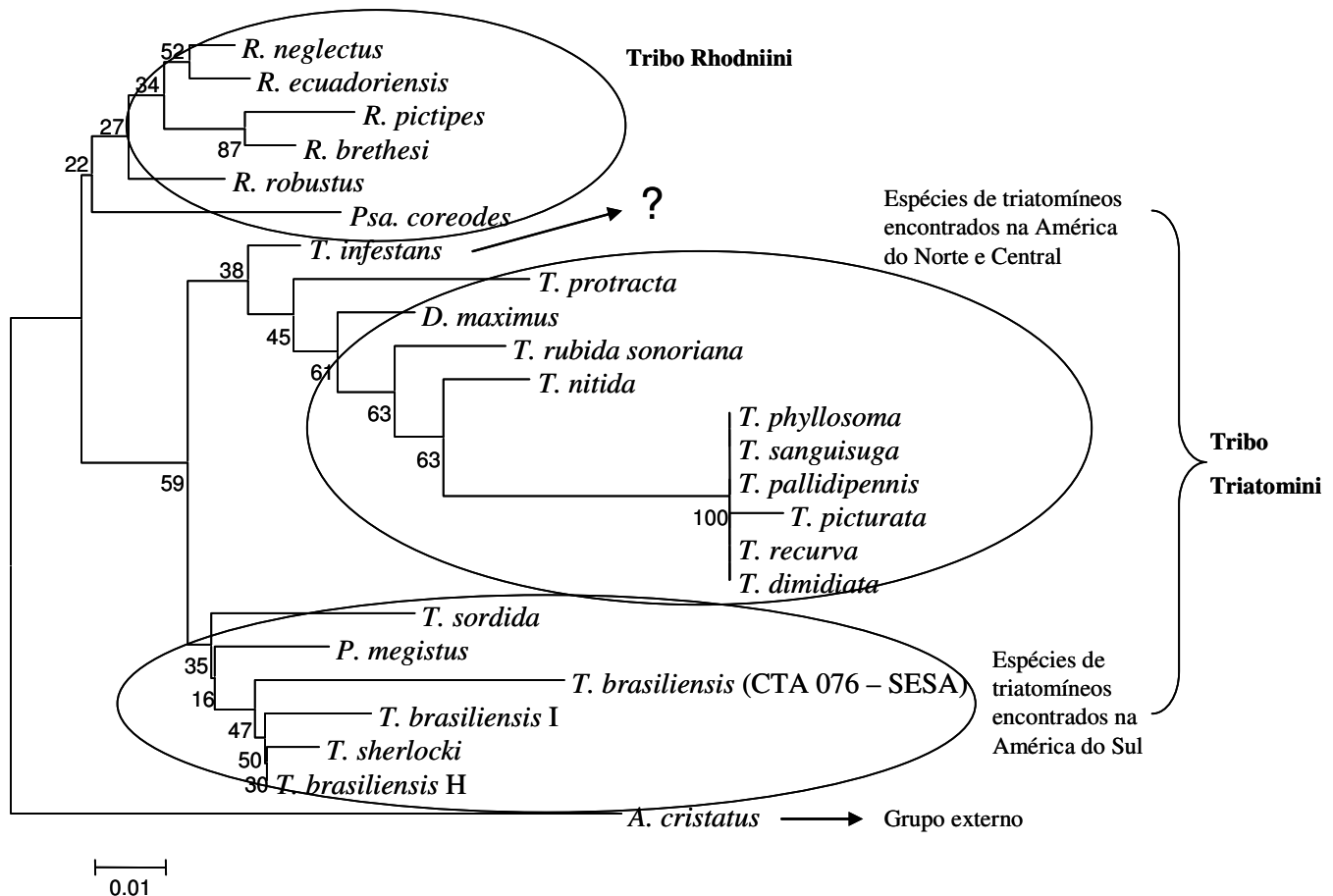


Figura 14. Árvore filogenética baseada em modelo *p-distance* das seqüências de 133 aminoácidos do gene mitocondrial citocromo b observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), haplótipos H e I do *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) e de outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster* e *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

A presença do grupo externo, representada pela espécie *A. cristatus*, definiu bem a separação das espécies das duas tribos, Triatomini e Rhodniini. A tribo Triatomini é subdividida em dois clados, onde um é representado por espécies com distribuição na América do Norte e Central mais *T. infestans*, que nessa topologia aparece mais estritamente relacionado com as espécies norte-americanas, a única alteração na filogenia em relação à árvore construída baseada nas seqüências de nucleotídeos (Figura 12). No outro clado estão distribuídas às demais espécies da tribo Triatomini que apresentam distribuição na América do Sul.

T. sherlocki e *T. brasiliensis* haplótipo “H” (Monteiro et al., 2004) apresentam-se nitidamente mais próximos filogeneticamente, uma vez que diferem entre si em apenas um aminoácido, do que mesmo entre os dois haplótipos (H e I), que diferem entre eles em dois aminoácidos.

T. brasiliensis (CTA 076 – SESA) aparece como táxon-irmão do clado formado pela espécie *T. sherlocki* e haplótipos “H” e “I” de *T. brasiliensis*, sendo que na topologia baseada nas seqüências nucleotídicas essa espécie apresentou-se mais estritamente relacionada com *T. sordida*.

- **Grande subunidade ribossomal (16S)**

A amplificação da grande subunidade ribossomal (mtlsubr LR – 16S) do genoma mitocondrial ocorreu a uma temperatura de anelamento de 50°C, gerando um fragmento de aproximadamente 400 pares de bases para *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica* (Figura 15).

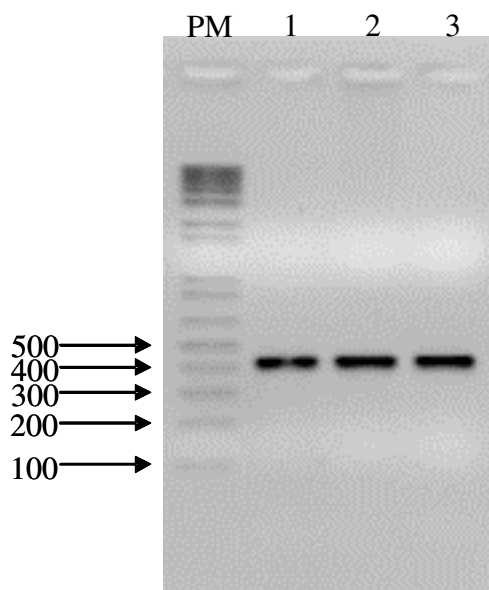


Figura 15. Eletroforese da amplificação da grande subunidade ribossomal do genoma mitocondrial (16S) executada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de Peso Molecular 1Kb plus; 1 – *T. sherlocki*; 2 – *T. melanica* e 3 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

Os produtos amplificados e posteriormente purificados e quantificados de *T. sherlocki*, *T. melanica* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), apresentaram uma concentração de 40ng/μL para as três amostras aplicadas no gel. Esses foram clonados no vetor p-GEM T Easy (Promega) e transformados em bactéria *Escherichia coli*, linhagem DH5α.

Onze colônias de bactérias transformadas com o vetor contendo o inserto do gene mitocondrial da grande subunidade ribossomal (16S) do *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) cresceram e foram submetidas à extração do DNA plasmidial (Miniprep). Para *T. sherlocki*, cinco colônias de bactérias transformadas cresceram e para *T. melanica* sete colônias cresceram, todas

as colônias foram submetidas ao mesmo procedimento de extração do DNA plasmidial (Figura 16).

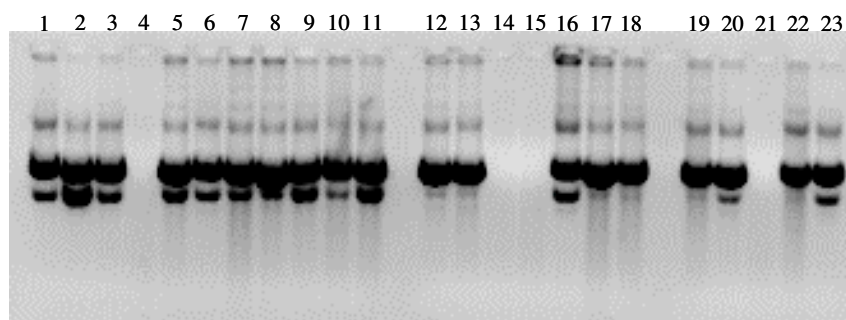


Figura 16. Eletroforese da miniprep das colônias de bactérias transformadas com o inserto executada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1 a 11 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA); 12 a 18 – *T. melanica* e 19 a 23 – *T. sherlocki*.

Apesar das colônias 4, 14, 15 e 21 terem crescido na placa e serem submetidas à miniprep, a extração do DNA plasmidial não foi comprovada em eletroforese.

Uma PCR de confirmação com todas as minipreps, para verificar se o inserto se ligou ao vetor foi realizada, exceção feita para as colônias onde não foi possível observar extração do DNA plasmidial (Figura 17).

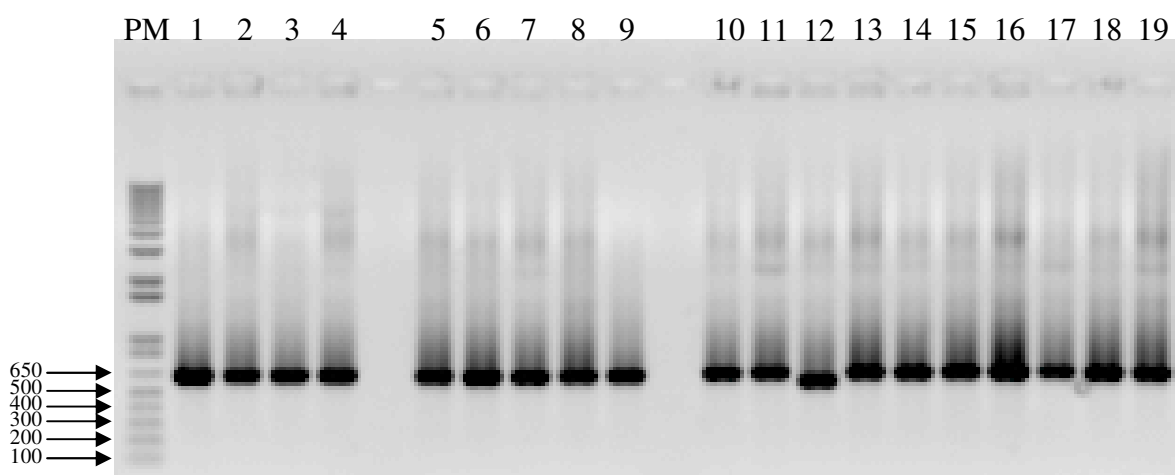


Figura 17. Eletroforese da PCR da miniprep para confirmação da ligação do inserto no vetor dos produtos amplificados executada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 4 – *T. sherlocki*; 5 a 9 – *T. melanica* e 10 a 19 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

Nessa PCR foi possível observar que todas as amostras submetidas à amplificação para comprovação do inserto ligaram-se ao plasmídeo foram positivas. Fato comprovado pelo tamanho do fragmento gerado, aproximadamente 650 pares de bases.

A reação de sequenciamento foi realizada em todas as amostras, onde foi possível confirmar a ligação do inserto no vetor, de 1 a 4 para *T. sherlocki*, de 5 a 9 para *T. melanica* e de 10 a 19 para *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

As seqüências do vetor e os primers foram removidos para posterior análise. O tamanho real da seqüência foi de 373 pares de bases para as três espécies estudadas.

Tais seqüências foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados de seqüências não redundantes do “National Center for Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Anexo I, Tabela 1). Após a obtenção de todas as seqüências, foram feitos os alinhamentos com o programa Clustal W do BioEdit (Figura 18).

		*	20	*	40	*	60	*	80	
T. sherlocki	:	TTT-ATTTATTTAAGGTTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. bra CTA 076	:	TTT-GTTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	74				
T. bra melanica	:	TTT-ATTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. brasiliensis	:	TTT-GTTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. infestans	:	TTT-ATTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. protracta	:	TTT-ATTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. mazzottii	:	TTT-ATTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. sanguisuga	:	TTT-ATTTATATAAGGCTCAA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. nitida	:	TT--ATTTATTTAAGGCTCAA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	72				
T. sordida	:	TTT-ATTTAATTTAAGGCTAG-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. dimidiata	:	TTT-ATTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. picturata	:	TTT-ATTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
T. pallidipennis	:	TTT-ATTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
P. megistus	:	TT--TTTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	72				
D. maximus	:	TTTATTTATTTAAGGCTGA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCGCAGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	74				
R. pallescens	:	GAGAGTTTATATAAGGCTCAA-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCTGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	74				
R. ecuadoriensis	:	GAAAGTCTATATAAGGCTCAT-	CCTGCCCAATGAGGA----	GTTGAATGGCTGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	74				
R. pictipes	:	TGATTATTTATATAAGGCTGG-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCTGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	74				
R. brethesi	:	TGAGTATTATATAAGGCTGG-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCTGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	74				
R. prolixus	:	GAATATTTATATAAGGCTGG-	CCTGCCCAATGAGG----	ATTGAATGGCTGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	74				
R. robustus	:	G-ATATTTATATAAGGCTGG-	CCTGCCCAATGAGG----	GTTGAATGGCTGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	73				
R. neglectus	:	TCATATTTATATAAGGCTGG-	CCTGCCCAATGAGG----	GTTGAATGGCTGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	74				
Psa. coreodes	:	A---AGTTATATAAGGCTGG-	CCTGCCCAATGAGGA----	ATTGAATGGCTGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	71				
A. cristatus	:	TTT-ATTGATATAAGGCTCAA-	CCTGCCCAATGATTATAATT	ATTGAATGGCGCGGTATTTCTAACTGTGCTAAGGTAGC	:	78				

Figura 18. Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 - SESA), *T. melanica* e outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius*, *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

Continuação da figura 18.

		*	340	*	360	*	
T. sherlocki	:	TAT--	TTTCATTAA	TTAGTGT	TTTTAT-	GATCCATAG-	TTTATGATTACAAGATTAAG : 364
T. bra CTA 076	:	TAT--	TTTCATTAA	TTAGTGT	TTTTTTT-	GATCCATAG-	TTTATGATTATAAGATTAAG : 365
T. bra melanica	:	TAT--	TTTCATTAA	TTAGTGT	TTTTTAT-	GATCCATAG-	TTTATGATTACAAGATTAAG : 364
T. brasiliensis	:	TAT--	TTTCATTAA	TTAGTGT	TTTTTTT-	GATCCATAG-	TTTATGATTATAAGATTAAG : 364
T. infestans	:	TTA--	TTTCATTAA	TTAATGT	TTTTTGT-	GATCCATAT-	TTTATGATTATAAGATTAAG : 364
T. protracta	:	TAG--	AATCATT	TTTATTAGTGT	TTTTATT-	GATCCATATATTTATGATTACAAGATTAAG : 366	
T. mazzottii	:	TAG--	TTTCATTG	ATTGATGT	TTTTTTT-	GATCCATATTTTATGATTATAAGATTAAG : 366	
T. sanguisuga	:	TTA-	TTTCATTG	ATTGATGT	ATTTT-	GATCCATATTTTATGATTAAAAGATTAAG : 367	
T. nitida	:	TTA--	TATCATTT	ATTAATGT	TTTTTTT-	GATCCATAAATTTATGATTAAAAGATAAG : 363	
T. sordida	:	TAT--	TTTCATTAA	TTAGTGT	TTTTTTT-	GATCCATAA-	TTTATGATTACAAGATTAAG : 365
T. dimidiata	:	TTA-	TTTCATTG	ATTGATGT	TTTTTTT-	GATCCATATATTTATGATTAAAAGATTAAG : 367	
T. picturata	:	TTAA-	TTTCATTAA	TTGGTGT	TTTTTTT-	GATCCATAT-	TTTATGATTAAAAGATTAAG : 366
T. pallidipennis	:	TAGA-	TTTCATTAA	TTGGTGT	TTTTTTT-	GATCCATATTTTATGATTAAAAGATTAAG : 367	
P. megistus	:	TTG-	TTTCATT	TTTATTAATGT	TTTTTAT-	GATCCATAT-	TTTATGATTATAAGATTAAG : 363
D. maximus	:	TTA--	TTTCATTG	ATTAGTGT	TTTCTTT-	GATCCATGT-	ATTTATGATTATAAGATTAAG : 365
R. pallescens	:	TATTA	TTTCAAT	AATTATGT	ATTATT-	GTTGATCCATAA-	TTTATGATTAAAAGATTAAG : 368
R. ecuadoriensis	:	TGTT-	TTTCAAGA	ATTATGT	TTTTT-	ATTGATCCATAA-	CTTATGATTAAAAGATTAAG : 367
R. pictipes	:	TGAT-	TTTCAATA	AATTATGT	TTTAA-	ATTGATCCATAATATCATGATTAAAAGATTAAG : 367	
R. brethesi	:	TGAT-	TTTCAAGA	ATTATGT	TTTAA-	ATTGATCCATAATATCATGATTAAAAGATTAAG : 368	
R. prolixus	:	TT-T-	TTTCAATG	ATTATGT	TTTTATT-	GTTGATCCATTA-	GTTAATGATTACAAGATTAAG : 367
R. robustus	:	TT-T-	TTTCAAGG	TTTATGT	TTTTT-	TTTGATCCATTA-	GTTAATGATTACAAGATTAAG : 365
R. neglectus	:	TT-T-	TTTCAAGG	TTTATGT	TTTTT-	TTTGATCCATTA-	GTTAATGATTACAAGATTAAG : 366
Psa. coreodes	:	AT-T-	TTTCAAAT	ATTCTGT	TTTTT-	TTTGATCCATCA-	GTTGATGATTAAAAGATTAAT : 362
A. cristatus	:	ATT--	TTTCATTAA	TTAGTGT	ACAATT-	GATCCA-	ATTTTATGATTAAAAGATTAAG : 371

Continuação da figura 18.

No alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial de algumas espécies das duas principais tribos de triatomíneos (Triatomini e Rhodniini), foi possível observar um fragmento de aproximadamente 60 pares de bases (220 – 280) altamente polimórfico. De um modo geral as seqüências se apresentaram conservadas por quase toda a sua extensão.

Baseado no alinhamento das seqüências da Figura 18 foi proposto uma filogenia baseada em distância construída com algoritmo *Neighbor Joining* utilizando o modelo de *Kimura 2-p* (Figura 19).

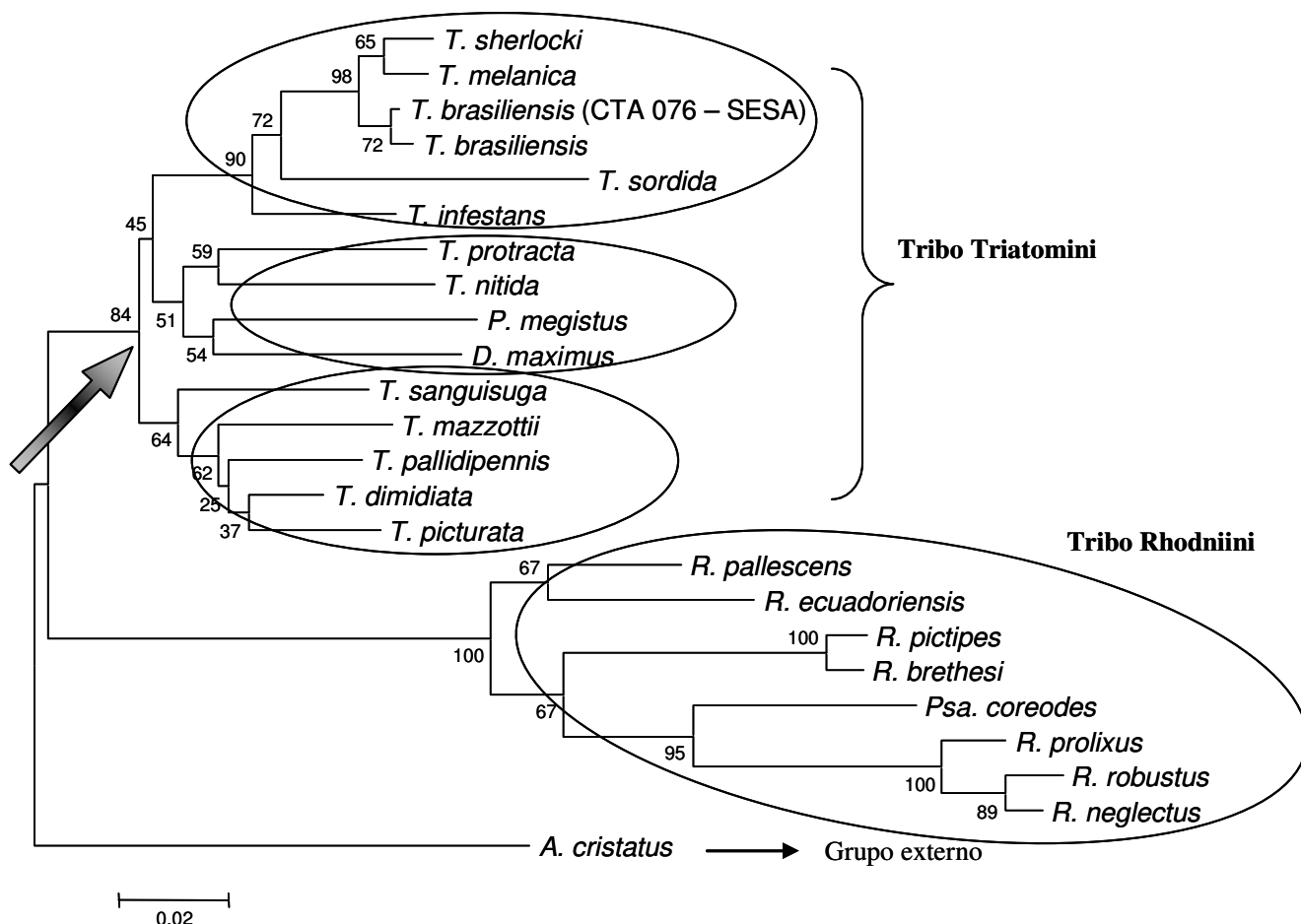


Figura 19. Árvore filogenética proposta a partir do alinhamento das seqüências alinhadas da grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial, construída com algoritmo *Neighbor Joining* utilizando modelo *Kimura 2-p* observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 - SESA), *T. melanica* e outras espécies dos gêneros *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus* como grupo externo.

T. sherlocki e *T. melanica* apresentaram-se mais estritamente relacionados filogeneticamente. Essa relação foi a mesma encontrada para a filogenia da seqüência do gene mitocondrial do citocromo b. Como grupo-irmão dessas duas espécies encontram-se *T. brasiliensis* (CTA 076 - SESA) e *T. brasiliensis* (seqüência extraída do banco de dado GenBank), apresentando *T. sordida* e *T. infestans* como táxons mais externos, aparecendo como grupo-irmão dessas espécies o clado formado pelas espécies *T. protracta*, *T. nitida*, *D. maxima* (encontrados na América do Norte e Central) e *P. megistus* (encontrado na América do Sul), que apesar de ser sul-americano, nessa filogenia apareceu sendo mais estritamente relacionado com espécies norte-americanas.

As espécies da tribo Triatomini ficaram separadas em dois clados (ver seta da Figura 19); um deles contendo as espécies acima descritas e as relações que elas guardam entre si, e o outro clado contendo *T. sanguisuga*, *T. mazzotti*, *T. pallidipennis*, *T. dimidiata* e *T. picturata*, todos norte-americanos.

A. cristatus ficou bem definido como táxon externo e garantiu o enraizamento da filogenia inferida. O suporte foi dado pelo valor de bootstrap.

A árvore filogenética construída de acordo com o modelo *p-distance* apresentou a mesma topologia da árvore inferida com o modelo *Kimura 2-p*.

A relação filogenética baseada em Máxima Parcimônia foi inferida envolvendo as mesmas espécies da filogenia baseada em distância (Figura 20).

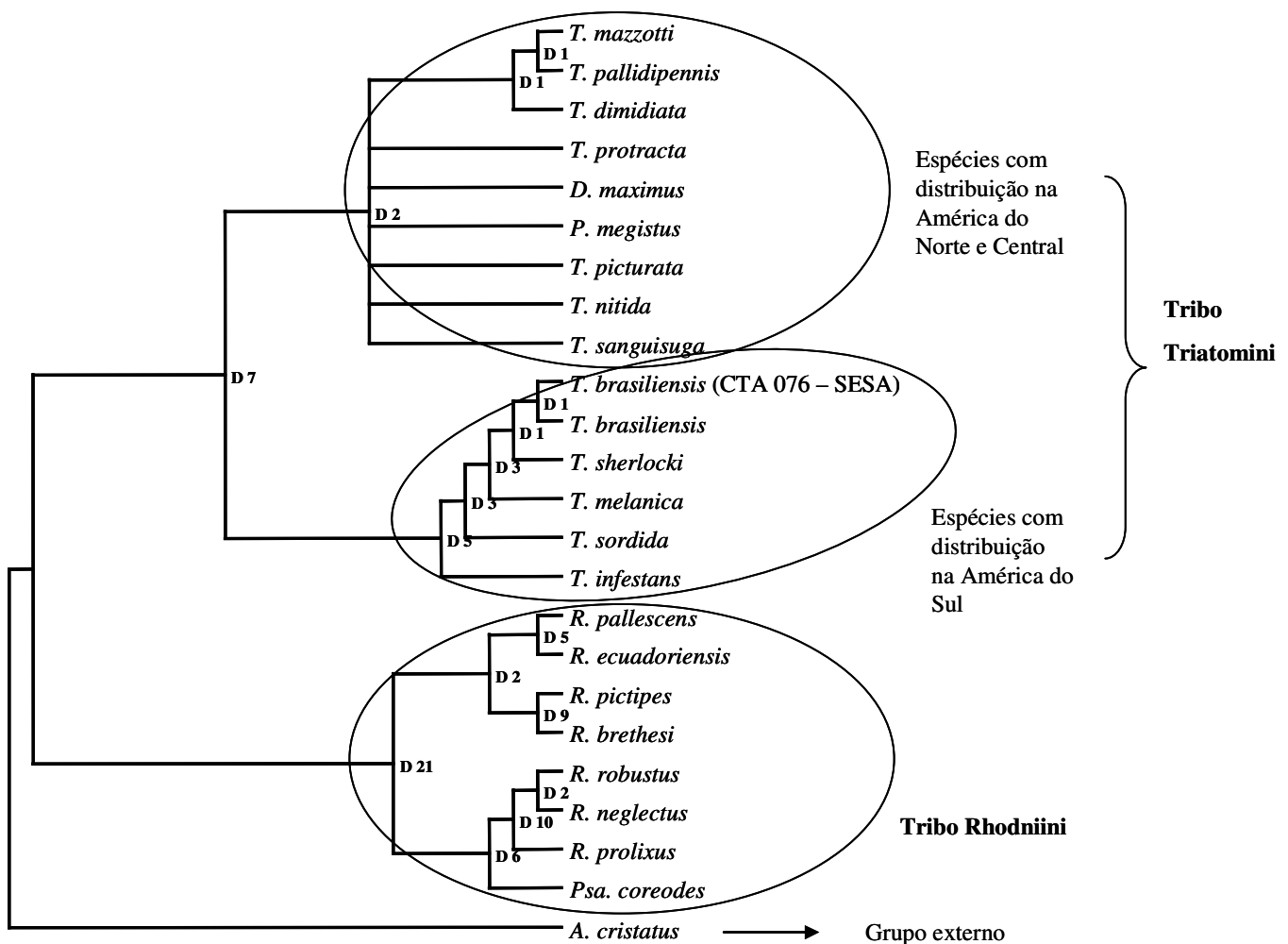


Figura 20. Topologia inferida baseada em parâmetro de Máxima Parcimônia a partir das seqüências alinhadas da grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial envolvendo *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica* e outras espécies do gênero *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

A filogenia construída baseada em modelo de Máxima Parcimônia apresentou algumas diferenças em relação àquela inferida tomando a distância como base.

Nessa árvore percebe-se claramente a distinção entre as espécies de triatomíneos sul-americanos dos norte-americanos, com exceção da espécie *P. megistus* que aparece em politomia com várias espécies norte-americanas. O táxon externo forneceu enraizamento e definiu a separação das duas tribos, Triatomini e Rhodniini.

Uma notável diferença foi a relação da espécie *T. sherlocki* com a espécie *T. brasiliensis*, com *T. melanica* se relacionando como táxon irmão dessas outras duas. *T. sordida* e *T. infestans* se apresentam como táxons mais externos dentro desse clado.

A melhor árvore encontrada por parcimônia necessitou de 424 passos apresentando os valores de CI = 0,554; RI = 0,715; RC = 0,396 e HI = 0,446.

Baseado nos dois genes mitocondriais (citocromo b e grande subunidade ribossomal (16S)) foi proposta uma filogenia única com os dados concatenados a partir do teste ILD. Essa topologia foi inferida baseada em Máxima Parcimônia (Figura 21).

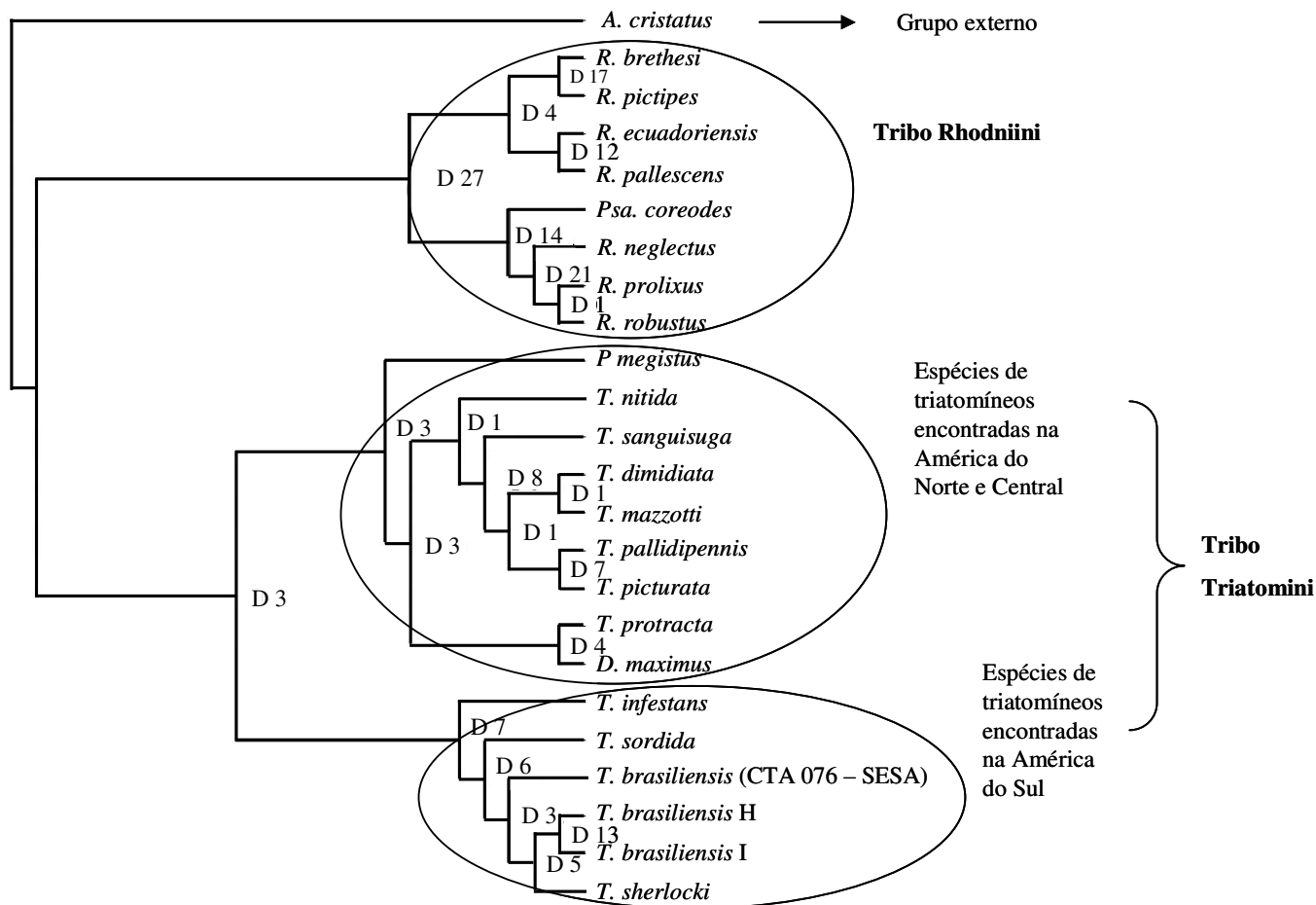


Figura 21. Topologia inferida baseada em parâmetro de Máxima Parcimônia a partir das seqüências alinhadas do citocromo b e da grande subunidade ribossomal (*16S*) do genoma mitocondrial envolvendo *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica* e outras espécies do gênero *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Panstrongylus* (tribo Triatomini), *Rhodnius* e *Psammolestes* (tribo Rhodniini) e *A. cristatus*.

Os haplótipos “H” e “I” de *T. brasiliensis* mostrados nessa filogenia representam a espécie *T. melanica*, uma vez que as seqüências da grande subunidade ribossomal (*16S*) do genoma mitocondrial desses dois haplótipos não está disponível, sendo usado para concatenar os dados, a seqüência da espécie *T. melanica* para os dois haplótipos.

A estreita relação filogenética encontrada entre *T. sherlocki* e *T. melanica* foi confirmada com os dois genes concatenados. A única análise que essas espécies não se apresentaram como táxon irmãos foi na análise baseada em Máxima Parcimônia do gene da grande subunidade ribossomal (*16S*) do genoma mitocondrial.

Novamente as duas tribos, Triatomini e Rhodniini, foram separadas claramente devido à presença do grupo externo. Na tribo Triatomini ocorre uma subdivisão envolvendo espécies que estejam distribuídas na América do Norte e Central, e espécies que estejam distribuídas na América do Sul. Tanto nas topologias baseadas nas análises do gene da grande subunidade ribossomal (*16S*) do genoma mitocondrial como na topologia concatenada com o gene do citocromo b, *P. megistus* aparece mais estritamente relacionado com as espécies de triatomíneos que apresentam distribuição na América do Norte e Central.

IV.3 Genes nucleares

- **Grande subunidade ribossomal D2 (28S)**

A amplificação da grande subunidade ribossomal (28S) do DNA nuclear, da região variável D2, ocorreu a uma temperatura de anelamento de 53°C gerando um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases para *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica* (Figura 22).

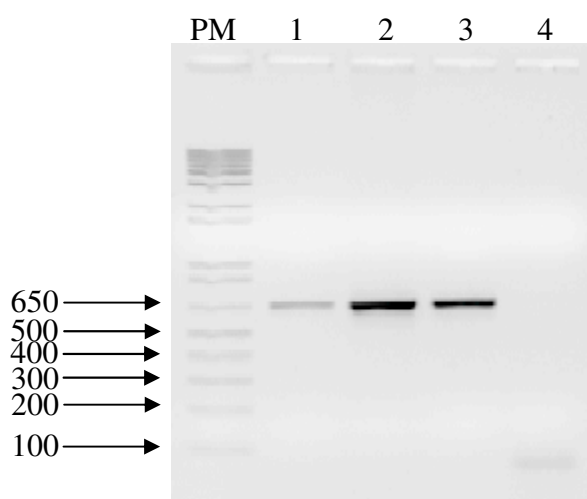


Figura 22. Eletroforese da amplificação da grande subunidade ribossomal (28S) executada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 – *T. sherlocki*; 2 – *T. melanica*; 3 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e 4 – controle negativo.

O produto amplificado e purificado foi quantificado apresentando uma concentração de aproximadamente 15 ng/μL para *T. sherlocki* e 40,0ng/μL para *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica*.

Todos os produtos amplificados foram clonados em vetor p-GEM T e transformados em *E. coli*, linhagem DH5α.

Duas colônias de bactérias transformadas com o vetor contendo o inserto (D2) do *T. sherlocki* cresceram e foram submetidas à extração do DNA plasmidial (Miniprep). Para *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), 16 colônias cresceram e 10 dessas foram submetidas à extração

do DNA plasmidial, o mesmo número de colônias de bactérias transformadas e que cresceram para *T. melanica*, e 10 dessas submetidas à extração do DNA plasmidial (Figura 23).

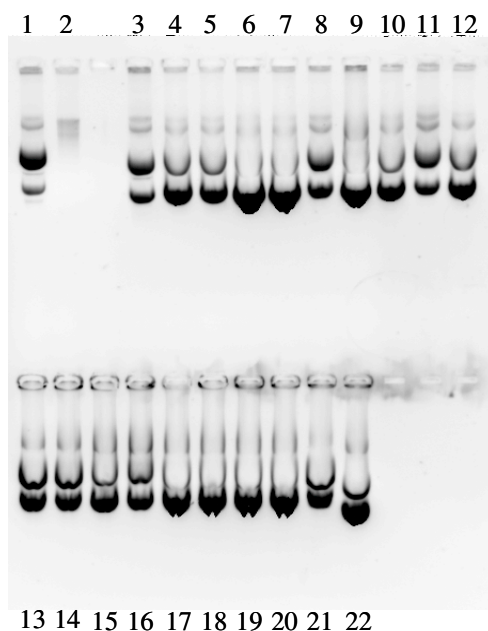


Figura 23. Eletroforese da miniprep das colônias de bactérias transformadas com a grande subunidade ribossomal D2 (28S) executada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. 1 a 2 – *T. sherlocki*; 3 a 12 – *T. melanica* e 13 a 22 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

O produto amplificado do *T. sherlocki* foi eluído do gel de agarose e provavelmente a baixa eficiência das bactérias transformadas e a baixa concentração do produto amplificado devam-se a forma de purificação, podendo comprometer a ligação, não ocorrendo de maneira eficiente.

As duas colônias transformadas com o inserto de *T. sherlocki* que cresceram na placa, e que foram submetidas a miniprep, realmente apresentavam o inserto ligado ao vetor. Das 10 colônias transformadas com o inserto de *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) que cresceram na placa, e que foram submetidas a miniprep, todas apresentavam o inserto ligado ao vetor. Das 10 colônias transformadas com o inserto de *T. brasiliensis melanica* que cresceram na placa, e que foram submetidas a miniprep, todas apresentavam o inserto ligado ao vetor. O fragmento obtido apresentou o tamanho esperado de 850 pares de bases (Figura 24).

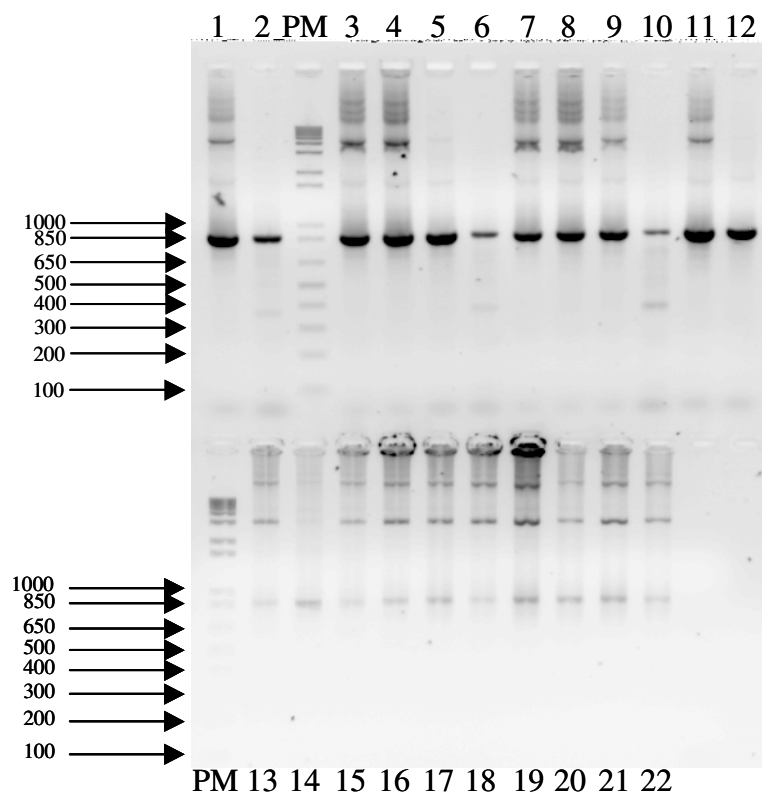


Figura 24. Eletroforese da PCR da miniprep para confirmação da ligação do inserto no vetor dos produtos amplificados executada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 a 2 – *T. sherlocki*; 3 a 12 – *T. melanica* e 13 a 22 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

A reação de seqüenciamento foi realizada em todas as amostras, onde foi possível confirmar a ligação do inserto no vetor, de 1 e 2 para *T. sherlocki*, de 3 a 12 para *T. melanica* e de 13 a 22 para *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

As seqüências do vetor e os primers foram removidas para posterior análise. O tamanho real da seqüência foi de 615 pares de bases para *T. sherlocki* e *T. melanica* e 613 pares de bases para *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA).

Tais seqüências foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados de seqüências não redundantes do “National Center for Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Anexo I, Tabela 1). Após a obtenção de todas as seqüências, foram feitos os alinhamentos com o programa Clustal W do BioEdit (Figura 25).

			*	20	*	40	*	60	*	
T. sherlocki	:	CCCTAAGC	GGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
T. brasiliensis CTA 076	:	CCCTAAGC	GGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
T. brasiliensis melanica	:	CCCTAAGC	GGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	73		
R. robustus roBR8	:	CCCTAAGT	AGGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
R. robustus roBR4	:	CCCTAAGT	AGGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
R. robustus roEC	:	CCCTAAGT	AGGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
R. robustus roVE2	:	CCCTAAGT	AGGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
R. prolixus prVE5	:	CCCTAAGT	AGGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
R. prolixus prCO1	:	CCCTAAGT	AGGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
R. nasutus naBR	:	CCCTAAGT	AGGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
Corythucha sp	:	CCCTAAGC	GGTGGTAAACTCCATCT		AAGGCTAAATAC	ACCACGAGACCGGATAGCGAACAAAGTACCGGTGA	:	71		
			80	*	100	*	120	*	140	
T. sherlocki	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
T. brasiliensis CTA 076	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
T. brasiliensis melanica	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	146			
R. robustus roBR8	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
R. robustus roBR4	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
R. robustus roEC	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
R. robustus roVE2	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
R. prolixus prVE5	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
R. prolixus prCO1	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
R. nasutus naBR	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
Corythucha sp	:	GGGAAAAGTTG	AAAAAGAACTTTGAAGAGAGAGATTCAAGAGTACG	TGAAACCGCTCAGGGGTAAACGG	AAAAAGAC	:	144			
			*	160	*	180	*	200	*	22
T. sherlocki	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
T. brasiliensis CTA 076	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
T. brasiliensis melanica	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	218				
R. robustus roBR8	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
R. robustus roBR4	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
R. robustus roEC	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
R. robustus roVE2	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
R. prolixus prVE5	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
R. prolixus prCO1	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
R. nasutus naBR	:	CTGAATATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	216				
Corythucha sp	:	CGGAATCCG	AAAGGGGAGATTACAGTCTTACCA	GTGCTCAACTTTTAAATGATTGAGATGGCCCTCTCG	:	214				
			0	*	240	*	260	*	280	*
T. sherlocki	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
T. brasiliensis CTA 076	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
T. brasiliensis melanica	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	291				
R. robustus roBR8	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
R. robustus roBR4	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
R. robustus roEC	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
R. robustus roVE2	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
R. prolixus prVE5	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
R. prolixus prCO1	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
R. nasutus naBR	:	CCCTATTCACT	GTAACAGCTGTGGTAGTGGGTTTGGTCGCTCGCATT	TAAATTGCAAGGGTAATGGTGGACCG	:	289				
Corythucha sp	:	ACCCAGCTCG	GTGTTTGGCGGTGCTGGGAAGTTGGTCGCGCTGGCGGGGGTCTGAGC-CCGCGGAGGACCG	:	286					
			300	*	320	*	340	*	360	*
T. sherlocki	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
T. brasiliensis CTA 076	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
T. brasiliensis melanica	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	364					
R. robustus roBR8	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
R. robustus roBR4	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
R. robustus roEC	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
R. robustus roVE2	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
R. prolixus prVE5	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
R. prolixus prCO1	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
R. nasutus naBR	:	CACCTTCTCC	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTCAATAAATATCTAAGTATTTGGCTAATTGCTCTGTTTATA	:	362					
Corythucha sp	:	CACCTTCTCT	CTTAGTAGGACGTTGGACCTGTGGCCCCGCGGCTAAG-GCCCCG-TGTGAAGACTGTTT-GG	:	356					
			*	380	*	400	*	420	*	4
T. sherlocki	:	GGCAGTACTGA	AAAGGTATTTCTTTTAA--CAGTTTATAGCCGTTT-ATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	432					
T. brasiliensis CTA 076	:	GGCAGTACTGA	AAAGGTATTTCTTTTAA--CAGTTTATAGCCGTTT-ATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	432					
T. brasiliensis melanica	:	GGCAGTACTGA	AAAGGTATTTCTTTTAA--CAGTTTATAGCCGTTT-ATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	434					
R. robustus roBR8	:	GTTATACCGTTA	AGGTATTTCTTTTAAACAGTTTTAGCCGTTTATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	435					
R. robustus roBR4	:	GTTATACCGTTA	AGGTATTTCTTTTAAACAGTTTTAGCCGTTTATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	435					
R. robustus roEC	:	GTTATACCGTTA	AGGTATTTCTTTTAAACAGTTTTAGCCGTTTATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	435					
R. robustus roVE2	:	GTTATACCGTTA	AGGTATTTCTTTTAAACAGTTTTAGCCGTTTATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	435					
R. prolixus prVE5	:	GTTATACCGTTA	AGGTATTTCTTTTAAACAGTTTTAGCCGTTTATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	435					
R. prolixus prCO1	:	GTTATACCGTTA	AGGTATTTCTTTTAAACAGTTTTAGCCGTTTATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	435					
R. nasutus naBR	:	GTTATA--GTTA	-----TTTAAACAGTTTTAGCCGTTTATATACTGGATATAATTGACAGTAACGA	:	423					
Corythucha sp	:	GTAACGGCTCC--GT	GACCCGTTGAGCCACCGGTGACCCGGC---CGATGGGCA----GACAGTACGAT	:	418					

Figura 25. Alinhamento das seqüências da grande subunidade ribossomal (28S) observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, *R. robustus*, *R. prolixus*, *R. nasutus* e *Corythucha* sp.

```

      40          *          460          *          480          *          500          *
T. sherlocki      : ATCATGGTGTGGAGCCACTT---ACTTTGTA-----AGTGTCCCTT---TATGGC : 475
T. brasiliensis CTA 076 : ATCATGGTGTGGAGCCACTT---ACTTTGTA-----AGTGTCCCTT---TATGGC : 475
T. brasiliensis melanica : ATCATGGTGTGGAGCCACTT---ACTTTGTA-----AGTGTCCCTT---TATGGC : 477
R. robustus roBR8    : ATTATGGTGTGGAGCCACATAAAATTATATATATGTAAAAATATATATAATGGAAAGTGTCTTAAAAATATGGC : 508
R. robustus roBR4    : ATTATGGTGTGGAGCCACATGAAATTATATATATGTAAAAATATATATAATGGAAAGTGTCTTAAAAATATGGC : 508
R. robustus roEC     : ATTATGGTGTGGAGCCACATGAAATTATATATATGTAAAAATATATATAATGGAAAGTGTCTTAAAAATATGGC : 508
R. robustus roVE2    : ATTATGGTGTGGAGCCACATGAAATTATATATATGTAAAAATATATATAATGGAAAGTGTCTTAAAAATATGGC : 508
R. prolixus prVE5    : ATTATGGTGTGGAGCCACATGAAATTATATATATGTAAAAATATATATAATGGAAAGTGTCTTAAAAATATGGC : 508
R. prolixus prCO1    : ATTATGGTGTGGAGCCACATGAAATTATATATATGTAAAAATATATATAATGGAAAGTGTCTTAAAAATATGGC : 508
R. nasutus naBR     : ATTATGGTGTGGAGCCACTTGAATTATATATATGTAAAAATATATATAATGGAAAGTGTCTTAAAAATATGGC : 496
Corythucha sp      : ACGACGGTGTAGAACCCT---TCTTGTA-----GGGTCCC-----CTGC : 454

      520          *          540          *          560          *          580
T. sherlocki      : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTTAAATTAA-CTTTTAACT-CCGATTTTGGTCCCGTCTAACTATTCCGCCTACTGTT : 546
T. brasiliensis CTA 076 : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTTAAATTAA-CTTTTAACT-CCGATTTTGGTCCCGTCTAACTATTCCGCCTACTGTT : 544
T. brasiliensis melanica : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTTAAATTAA-CTTTTAACT-CCGATTTTGGTCCCGTCTAACTATTCCGCCTACTGTT : 546
R. robustus roBR8    : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTAAAAAATAGTTTAAATTCGGATTTTAAACC-GGTTAACTATTCCGCCTACTGTT : 580
R. robustus roBR4    : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTAAAAAATAGTTTAAATTCGGATTTTAAACC-GGTTAACTATTCCGCCTACTGTT : 580
R. robustus roEC     : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTAAAAAATAGTTTAAATTCGGATTTTAAACC-GGTTAACTATTCCGCCTACTGTT : 580
R. robustus roVE2    : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTAAAAAATAGTTTCAATTCGGATTTTAAACC-GGTTAACTATTCCGCCTACTGTT : 580
R. prolixus prVE5    : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTAAAAAATAGTTTCAATTCGGATTTTAAACC-GGTTAACTATTCCGCCTACTGTT : 580
R. prolixus prCO1    : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTAAAAAATAGTTTCAATTCGGATTTTAAACC-GGTTAACTATTCCGCCTACTGTT : 580
R. nasutus naBR     : TGTTTGCAAGTGGGTTGGTAAAAAATAGTTTCAATTCGGATTTTAAACC-GGTTAACTATTCCGCCTACTGTT : 568
Corythucha sp      : GGGCGCAAGT---CTGGGAGGTAGC-CCGTACACGGCGGACCCAGGTCC-GGCTACCTCTCTCCGACTGTT : 522

      *          600          *          620          *
T. sherlocki      : GGTAAACTGTTCC---TAGGACAGTGCTTATTAACACCGGTCGGCAGCGATTTCAGG : 598
T. brasiliensis CTA 076 : GGTAAACTGTTCC---TAGGACAGTGCTTATTAACACCGGTCGGCAGCGATTTCAGG : 596
T. brasiliensis melanica : GGTAAACTGTTCC---TAGGACAGTGCTTATTAACACCGGTCGGCAGCGATTTCAGG : 598
R. robustus roBR8    : GGTAAACTGTTCC---TAGGACTGTGCTTATTAATCACCAGTCGGCAGCGATTTCAGG : 633
R. robustus roBR4    : GGTAAACTGTTCC---TAGGACTGTGCTTATTAATCACCAGTCGGCAGCGATTTCAGG : 633
R. robustus roEC     : GGTAAACTGTTCC---TAGGACTGTGCTTATTAATCACCAGTCGGCAGCGATTTCAGG : 633
R. robustus roVE2    : GGTAAACTGTTCC---TAGGACTGTGCTTATTAATCACCAGTCGGCAGCGATTTCAGG : 633
R. prolixus prVE5    : GGTAAACTGTTCC---TAGGACTGTGCTTATTAATCACCAGTCGGCAGCGATTTCAGG : 633
R. prolixus prCO1    : GGTAAACTGTTCC---TAGGACTGTGCTTATTAATCACCAGTCGGCAGCGATTTCAGG : 633
R. nasutus naBR     : GGTAAACTGTTCC---TAGGACTGTGCTTATTAATCACCAGTCGGCAGCGATTTCAGG : 621
Corythucha sp      : GCGCGCCACCGGATTTGGGACAGTGTTCACGG-CACCACTCGGCAGCGATTTCAGG : 576

```

Continuação da figura 25

A análise desse gene foi subestimada pelo baixo número de seqüências disponibilizadas no GenBank, sendo o alinhamento realizado apenas com as três espécies estudadas, mais três espécies de *Rhodnius* (*R. prolixus*, *R. robustus* e *R. nasutus* Stal, 1859) e *Corythucha* sp como grupo externo.

Apesar de poucas seqüências estarem sendo comparadas, foi possível observar que essa região é altamente conservada nessas espécies de triatomíneos.

A árvore filogenética baseada em distância a partir das seqüências do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) foi proposta com as espécies alinhadas da figura 25 e a filogenia construída com algoritmo *Neighbor Joining* utilizando modelo *Kimura 2-p* (Figura 26).

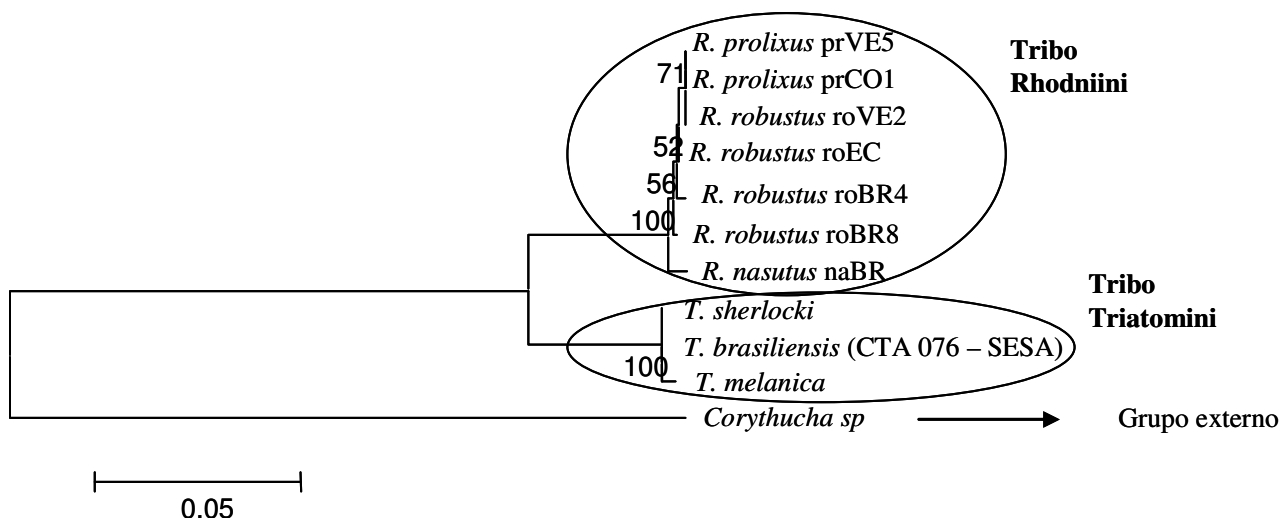


Figura 26. Árvore filogenética construída a partir de algoritmo *Neighbor Joining* utilizando modelo *Kimura 2-p* das seqüências alinhadas da grande subunidade ribossomal (28S) observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, *R. robustus*, *R. prolixus*, *R. nasutus* e *Corythucha sp.*

Nessa filogenia observa-se claramente a divisão entre as espécies da tribo Rhodniini e Triatomini, com a espécie *Corythucha sp* bem definido como táxon externo enraizando a árvore de maneira evidente tornando possível a observação dos clados.

O baixo número de táxons presente nessa topologia não fornece suporte nem robustez para elucidar uma topologia consistente e avaliar as relações filogenéticas entre os táxons.

As três espécies estudadas apresentaram-se estritamente relacionadas filogeneticamente baseada nas seqüências da grande subunidade ribossomal D2 (28S), com *T. melanica* um pouco mais distante de *T. sherlocki* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) que aparecem como uma dicotomia.

A árvore filogenética construída de acordo com o parâmetro *p-distance* apresentou o mesmo padrão de ramificação.

A relação filogenética baseada em Máxima Parcimônia também foi inferida envolvendo as mesmas espécies, que foi construída a filogenia baseada em distância (Figura 27).

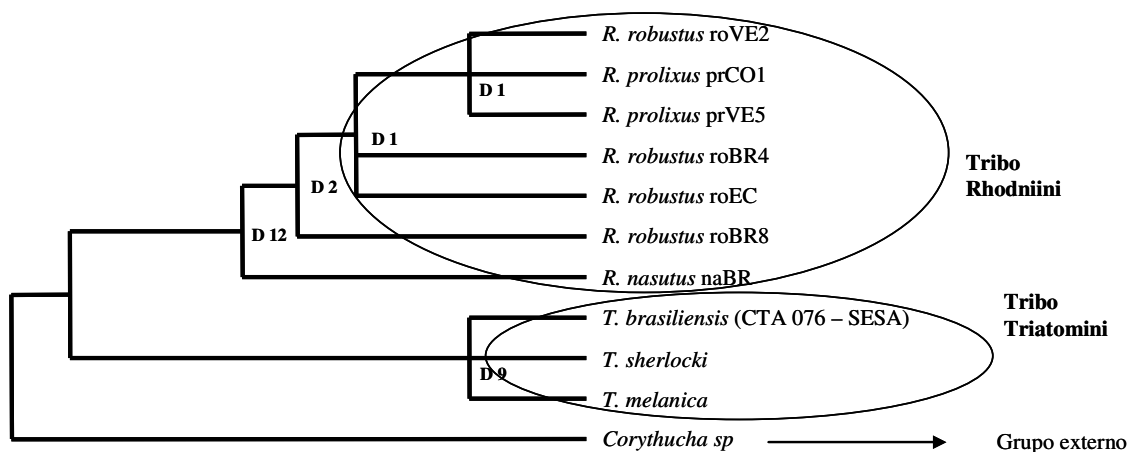


Figura 27. Topologia inferida baseada em parâmetro de Máxima Parcimônia a partir das seqüências alinhadas da grande subunidade ribossomal D2 (28S) *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, *R. robustus*, *R. prolixus*, *R. nasutus* e *Corythucha sp* como táxon externo.

A melhor árvore encontrada por parcimônia para inferir a filogenia baseada no sequenciamento do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) necessitou de 233 passos apresentando os valores de CI = 0,983; RI = 0,964; RC = 0,947 e HI = 0,017.

A espécie *Corythucha sp* ficou bem definida como táxon externo e as espécies de triatomíneos ficaram divididos em dois clados separando as espécies das tribos Triatomini e Rhodniini.

Uma politomia envolvendo as três espécies estudadas foi observada não sendo possível observar nenhuma relação mais estreita. A filogenia baseada no sequenciamento do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) não auxiliou na filogenia geral das espécies analisadas pelos genes mitocondriais.

- **Espaçador Interno Transcrito 2 (*ITS-2*)**

A amplificação do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) ocorreu em condições diferentes de todos os outros genes seqüenciados nesse projeto. O tempo de desnaturação (94°C) foi de 1 minuto, o tempo de anelamento do primer foi de 2 minutos e ocorreu a uma temperatura de 56°C, mesmo tempo necessário para a extensão (72°C) (Figura 28).

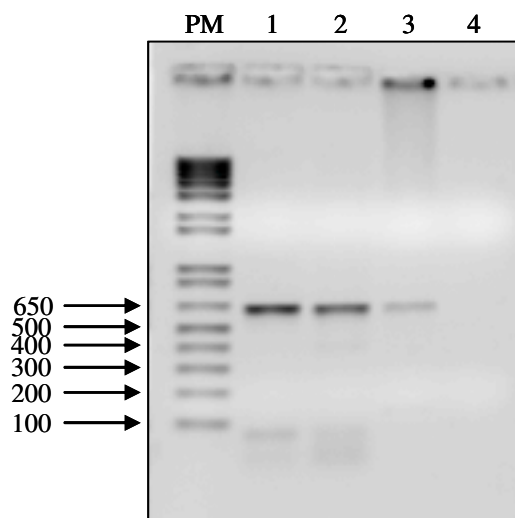


Figura 28. Eletroforese da amplificação do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) executada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen); 1 – *T. sherlocki*; 2 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA); 3 – *T. melanica* e 4 – controle negativo.

O fragmento gerado após a reação de PCR foi de aproximadamente 650 pares de bases para *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica*, apresentando uma menor quantidade para o produto de *T. melanica*.

O produto amplificado foi clonado em vetor de ligação p-GEM T e transformado em bactéria *E. coli*, linhagem DH5α.

Duas colônias de bactérias transformadas com o inserto de *T. sherlocki* cresceram na placa e foi feito o repique dessas colônias para posterior extração do DNA plasmidial. Nenhuma das colônias cresceu em meio líquido e por essa razão não foi feita a Mniprep desse material, podendo tratar-se de um falso positivo. Em relação às bactérias transformadas com inserto de *T. melanica* duas foram as colônias que cresceram na placa, ocorrendo o mesmo que aconteceu com as colônias de *T. sherlocki*, foi feito o repique e nenhuma das colônias cresceu em meio líquido,

também não sendo possível realizar a Miniprep. Já para as bactérias transformadas com o inserto de *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), quatro colônias cresceram na placa e duas foram positivas após o repique e consequentemente submetidas a extração do DNA plasmidial (Figura 29).

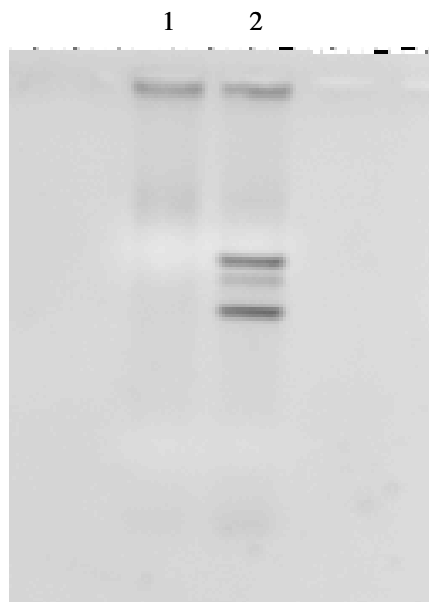


Figura 29. Eletroforese da miniprep das colônias de bactérias transformadas com o espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) das duas colônias positivas de *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) executada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

Analisando o gel da Miniprep observa-se que a extração foi realizada apenas na colônia de número 2. Mesmo não sendo possível visualizar a extração na colônia 1, ambas foram submetidas a uma PCR de confirmação para verificar se o inserto está realmente ligado ao vetor (Figura 30).

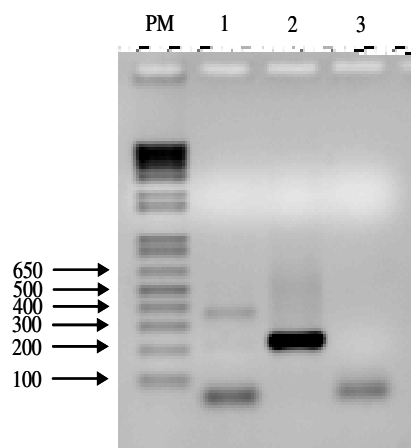


Figura 30. Eletroforese da PCR da miniprep para confirmação da ligação do inserto no vetor dos produtos clonados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. PM – Marcador de peso molecular 1Kb plus; 1 e 2 – *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e; 4 – controle negativo.

A PCR das Minipreps das duas únicas colônias positivas mostrou que não houve ligação do inserto ao vetor, confirmado pelo tamanho do fragmento gerado.

Visto a dificuldade de se transformar esse produto, por motivos técnicos ou por deficiência dos reagentes utilizados, esse produto foi sequenciado direto, sem ser clonado, a partir de uma amplificação utilizando uma enzima Taq Polimerase normal, que não possui mecanismo de reparo.

Tais seqüências foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados de seqüências não redundantes do “National Center for Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Anexo I, Tabela 1). Após a obtenção de todas as seqüências, foram feitos os alinhamentos com o programa Clustal W do BioEdit (Figura 31).

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *
T. sherlocki      : -----TTACAAATACAAATTGAA-AAATCCATAATTATATATGGCA-----ACGCGATAGCAGTTTAATATATATAAAAAAAATGGTA : 82
T. brasiliensis CTA 076 : -----TTACAAATACAAATTGAA-AAATCCATAATTATATATGGCA-----ACGCGAGAGCAGTTTAATATATATAAAAAAAATGGTA : 82
T. melanica      : -----TTACAAATACAAATTGAA-AAATCCATAATTATATATGGCA-----ACGCGAGAGCAGTTTAATATATATAAAAAAAATGGT : 60
T. platensis     : -----TTACAAATACAAATTGAA-AAATCCAAAATTATATATGGCA-----ACGCGAGAGCAGTTTAATATATATAAAAAAAATGGCA : 82
T. maculata      : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---AAAATTTCTATTAAATTTATATATATATTTT---ATTAATATATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 90
T. brasiliensis  : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---AAAATTTCTATTAAATTTATATATATATTTT---ATTAATATATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 91
T. sordida       : -----TTACAAATACAAATTGAA-AAATCCAAAATTATATATGGCATATAAACHGCGAGAGCAGTTTAATATATATAAAAAAAATGGST : 87
T. inefstans     : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---AAAATTTCTATTAAATTTATATATATATTTT---ATTAATATATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 87
T. pallidipennis : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---AAAATTTCTATTAAATTTTCTATAAATTTTA--TATATATTTT---ATAT---ATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 84
T. picturata     : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---AAAATTTCTATTAAATTTTCTATAAATTTTA--TATATATTTT---ATAT---ATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 84
T. mazzottii     : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---AAAATTTCTATAAATTTTA--TATATATTTT---ATAT---ATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 80
T. rubida        : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---TTAAAAAAAATTTCTATAAATTTTA--TATACATTTT---GCAT---GATATATTTGGAATTTTCTGTT : 83
T. dimidiata     : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---AAAATTTCTATAAATTTTATATATATATTTT---ATATATATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 89
T. phyllosoma    : TTA AAAA TAGAAATTTTATTTT---AAAATTTCTATAAATTTTA--TATATATTTT---ATAT---ATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 83
D. maximus      : TTA AAAA TAGAAATTTT---ATAAAAAATTTCTATAA--ATTT---TATATATTTT---ATTA---ATATATATTTGGAATTTTCTGTT : 78
P. megistus     : GTAATTAATACATATCTACTACAC-TATATTTT---TCTGCATAGCAGTTTAAAAATACAGCTGATATATA--ATAATAGGAATGGTTA : 91
R. prolixus     : AAAAAAAGAAATGTCCTGTTT---TTTTCTTTAAAAAGTACCTCTTTTATAAGTAATTCAGCTTTT---AACTACTTATATTTTATTTT : 93

      100      *      120      *      140      *      160      *      180
T. sherlocki      : AACTC---AAGTAA--ATAAATGTGATCATGTTTAATGCAAAAGA-AAAACATCGCCAGACTATGCGCTAGATGCGAAAAAATTTTC-- : 166
T. brasiliensis CTA 076 : AACTC---AAGTAA--ATAAATGTGATCATGTTTAATGCAAAAGA-AAAACATCGCCAGACTATGCGCTAGATGCGAAAAA- AATTTTC-- : 165
T. melanica      : AACTC---AAGTAA--ATAAATGTGATCATGTTTAATGCAAAAGA-AAAACATCGCCAGACTATGCGCTAGATGCGAAAAAATTTTC-- : 143
T. platensis     : AACTC---AAGTAA--ATAAATGTGATCATGTTTAATGCAAAAGA-AAAACATCGCCAGACTATGCGCTAGATGCGAAAAAATTTTC-- : 166
T. maculata      : -GTCAACACGTTT---TGCTTTGTAGAAAGATTTTCTAAATACATGT--AATTTCTTTTCTTCTC-----ATGTTATTTCTTATATACT-- : 168
T. brasiliensis  : -GTCAACACGTTT---TGCTTTGTAGAAAGATTTTCTAAATACATGT--AATTTCTTTTCTTCTC-----ATGTTATTTCTTATATACT-- : 169
T. sordida       : AACTC---AAGTAA--ATAAATGTGATCATGTTTAATGCAAAAGA-AAAACATCGCCAGACTATGCGCTAGATGCGAAAAAATTTTC-- : 172
T. inefstans     : -GTCAACACGTTT---TGCTTTGTAGAAAGATTTTCTAAATACATGC--AATTTCTTTTCTTCTC-----ATGTTATTTCTTATATACT-- : 165
T. pallidipennis : -GTCCACATTTAT---TGTTGGTGAAGAGATTTTCTAAATACAT-----GTTTCTTTTCTTTTGGCAAACTCTATTTCTTGTATACT-- : 164
T. picturata     : -GTCCACATTTAT---TGTTGGTGAAGAGATTTTCTAAATACAT-----GTTTCTTTTCTTTTGGCAAACTCTATTTCTTGTATACT-- : 164
T. mazzottii     : -GTCCACATTTAT---TGTTGGTGAAGAGATTTTCTAAATACAT-----GTTTCTTTTCTTTTGGCAAACTCTATTTCTTGTATACT-- : 160
T. rubida        : TGCCACATTTATTTATTTTGTTGGTGAAGAGATTTTCTAAATACAT--CAGTTTCTTTTCTTTTGTCTGATATTTTCTTATATACT-- : 172
T. dimidiata     : -GTCCACATTTAT---TGTTGGTGAAGAGATTTTCTAAATACAT-----GTTTCTTTTCTTTTGGCATACTCTATTTCTTGTATACT-- : 169
T. phyllosoma    : -GTCCACATTTAT---TGTTGGTGAAGAGATTTTCTAAATACAT-----GTTTCTTTTCTTTTGGCAAACTCTATTTCTTGTATACT-- : 163
D. maximus      : -GTCCACATTTAT---TTGTTGGTGAAGAGATTTTCTAAATACAT-----GTTTCTTTTCTTTTGTCTAACTCTATTTCTTGTATACT-- : 159
P. megistus     : AACTCTCAAAAGTAAATGGAATCTTATGTTTATACAGGTAAGGGAATAAATCGCCAGACTATGCGCTAGATGCGAAAAAATTTGCC : 184
R. prolixus     : TTTCCCTTTTCTT-TGTCATTACTTAAATATGCTTCTATATGTGAA--ATATAGTTTAAACACTCAGTAATGTTAAATCTATAGC-- : 181

      *      200      *      220      *      240      *      260      *      28
T. sherlocki      : -TTTGGCTTCAACATTTCACTACTTACTTGA-----TTTATTACCAATACAT-GCAATACAAATTTAAATTTGAAACTATCTCT----- : 246
T. brasiliensis CTA 076 : -TTTGGCTTCAACATTTCACTACTTACTTGA-----TTTATTACCAATACAT-GCAATACAAATTTAAATTTGAAACTATCTCT----- : 245
T. melanica      : -TTTGGCTTCAACATTTCACTACTTACTTGA-----TTTATTACCAAT-CA-GCAATACAAATTTAAATTTGAAACTATCTCT----- : 221
T. platensis     : -TTTGGCTTCAACATTTCACTACTTACTTGA-----TTTATTACCAATACAT-GCAATACAAATTTAAATTTGAAACTATCTCT----- : 246
T. maculata      : --TGTTTTTTAGAGCATAGTTTCAATTTTA-AAA---TTTGTAAATCCATGTAT-TGTAATAAAA-TC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 247
T. brasiliensis  : --TGTTTTTTAGAGCATAGTTTCAATTTTA-AAA---TTTGTAAATCCATGTAT-TGTAATAAAA-TC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 247
T. sordida       : -TCTTGGCTTCAACATTTCACTACTTACTTGA-----TTTATTACCAATACAT-GCAATACAAATTTAAATTTGAAACTATCTCT----- : 252
T. inefstans     : --TGTTTTTTAGAGCATAGTTTCAATTTTG-AAA---TTTGTAAATCCAGTAT-TGTAATAAAA-TC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 243
T. pallidipennis : --TGTTTGTAAA-TCTTAGTTTCAATATTGGAAA---TTTGTAACTTGGTTAT-TGTAATAAAATCTC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 244
T. picturata     : --TGTTTGTAAA-TCTTAGTTTCAATATTGGAAA---TTTGTAACTTGGTTAT-TGTAATAAAATCTC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 244
T. mazzottii     : --TGTTTGTAAA-TCTTAGTTTCAATATTGGAAA---TTTGTAACTTGGTTAT-TGTAATAAAATCTC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 240
T. rubida        : --TGTTTGTAAAATCATAGTTTCAATATTT-AAA---TTTGTAACTTGGTTAT-TGTAATAAAATCTCCTCAAGTATAAATAGTCAAAATGT----- : 254
T. dimidiata     : --TGTTTGTAAA-TCTTAGTTTCAATATTGCAAA---TTTGTAACTTGGTTAT-TGTAATAAAATCTC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 249
T. phyllosoma    : --TGTTTGTAAA-TCTTAGTTTCAATATTGGAAA---TTTGTAACTTGGTTAT-TGTAATAAAATCTC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 243
D. maximus      : --TGTTTGTAAA-TCATAGTTTCAATATTA-AAA---TTTGTAACTTGGTTAT-TGTAATAAATCTC--AAGTATAGTAGTCAAAATGT----- : 238
P. megistus     : TCTTGTGTTAAACATTTCACTACTTACTTGCAGAAATTTATTACCAATATACCAATAAACAAATTTCCATTTGAAACTATCGCTTAAAAA : 277
R. prolixus     : --TGGTTGTGCA-ATATAATTT---TTTTGCAAG---TTT-TAAGTGGTGAA-AAAAGATATTTTCTTTGTTCTCAATTTTTCAT----- : 259

```

Figura 31. Alinhamento das seqüências do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, outras espécies da Tribo Triatomini (*D. maximus* e *P. megistus*) e *R. prolixus* como táxon externo.

```

0      *      300      *      320      *      340      *      360      *
T. sherlocki      : -----AAAAAAAGATATAT--AAGAAATAACAT-----GAAGAAAAGAAAATTACA--TGATATTAGAAAAGCTCTGTGTACA--AGCA : 319
T. brasiliensis CTA 076 : -----AAAAAAAGATATAT--AAGAAATAACAT-----GAAGAAAAGAAAATTACA--TGATATTAGAAAAGCTCTGTGT-CA--AGCA : 317
T. melanica       : -----AAAAAAAGATTTT--AAGAAATA-CAT-----GAAGAAAAGAAAATTACA--TGATATTAGAAAAGCTCTGTGT-CA--AGCA : 290
T. platensis     : -----AAAAAAAGATATAT--AAGAAATAACAT-----AAGAAAAGAAAATTGCA--TGATATTAGAAAAGCTCTGTGTACA--AGCA : 319
T. maculata      : -----TG-AAGCAAA-AGG--AATTTT-TTTCGC-ATCTAGGCATAGCTGGGCGA--TGTTTTT-CTTTTGGCATAAAACAATGATCT : 323
T. brasiliensis  : -----TG-AAGCAAA-AGG--AATT-TTTCGC-ATCTAGGCATAGCTGGGCGA--TGTTTTT-CTTTTGGCATTAAACAATGATCT : 321
T. sordida       : -----AAAAAAAGATATAT--AAGAAATAACG-----AAGAAAAGAAAATTACA--TGATATTAGAAAAGCTCTGTGTACA--AGCA : 323
T. inefstans     : -----TG-AAGCAAA-AGG--AATTA-TTTCGC-ATCTAGGCATAGCTGGGCGA--TGTTTTT-CTTTTGGCATAAAACAATGATCT : 318
T. pallidipennis : -----TGATGACAGA-AGA--AAAATTTTTCGC-ATCTAGGCATTGTCTGGGCGA--TTTTTTTACTTCTGTGATAAAACAATGATCT : 322
T. picturata    : -----TGATGACAGA-AGA--AAAATTTTTCGC-ATCTAGGCATTGTCTGGGCGA--TTTTTTTACTTCTGTGATAAAACAATGATCT : 322
T. mazzottii    : -----TGATGACGGA-AGA--AAAATTTTTCGC-ATCTAGGCATTGTCTGGGCGA--TTTTTTTACTTCTGTGATAAAACAATGATCT : 318
T. rubida       : -----T--TGAGGAGAGAA--AAAATTTTTCGC-ATCTAGGCATTGTCTGGGCGA--TTTTTTT-CTTCTT--ATAAAACAATGATCT : 328
T. dimidiata    : -----TTATGACAGA-AGA--AAAATTTTTCGC-ATCTAGGCATTGTCTGGGCGA--TTTTTTTACTTCTGTGATAAAACAATGATCT : 327
T. phyllosoma   : -----TGATGACGGA-AGA--AAAATTTTTCGC-ATCTAGGCATTGTCTGGGCGA--TTTTTTTACTTCTGTGATAAAACAATGATCT : 321
D. maximus     : -----TA-TGACAGA-AGA--AAAATTTTTCGC-ATCTAGGCATTGTCTGGGCGA--TTTTTTT-CTTCTGTGATAAAACAATGATCT : 314
P. megistus    : GAGAAAAAAAGCAAGTATATCAGAGAAATACATTAGGCCAAAGAAAGGATATACACAAGCTGATATTAGAAAAGCTCTTGACACACACAAA : 370
R. prolixus     : -----TACAAAGGGAGGAATTTTATAAATTTTCGCTAGTTAGATATAGCTAGGCCAATTTTCTTCTATTCCTTATTTGTAAANAAAGA : 345

380      *      400      *      420      *      440      *      460
T. sherlocki      : AAAACGTGTGAC-----AACAGAAAATTTTCCAATATATAT-----TAT-TTATAAAAA-TATATATATAAATTTTAATAGAAATTT : 396
T. brasiliensis CTA 076 : AAAACGTGTGAC-----AACAGAAAATTTTCCAATATATAT-----TAT-TTATAAAAA-TATATATATAAATTTTAATAGAAATTT : 395
T. melanica       : AAAACGTGTGAC-----AACAGAAAATTTTCCAATATATAT-----TAT-TTATAAAAA-TATATATATAAATTTTAATAGAAATTT : 367
T. platensis     : AAAACGTGTGAC-----AACAGAAAATTTTCCAATATATAT-----TAT-TTATAAAAA-TATATATA--AATTTTAATAGAAATTT : 394
T. maculata      : ACAT--TTATTTACT-----T-GAGTTT-ACCAATTTT-----TTTATATATTAACTG-CCCTGGCAGTGGCCATATATATA : 396
T. brasiliensis  : ACAT--TTATTTACT-----T-GAGTTT-ACCAATTTT-----TATATATATAAAAGTG-CCTGCT-CTGCAGTGGCCATATA : 393
T. sordida       : AAAACGTGATGTC-----AACAGAAAATTTTCCAATATATAT-----T--TTATAAAAA-TATATATA--AATTTTAATAGAAATTT : 397
T. inefstans     : ACAG--TTATTTACT-----T-GAGTTT-CCCAATTTT-----TATATATATTAAAGTG-CCTTGC-----AGTGGCATATA : 385
T. pallidipennis : ACAG--TTATTTACT-----TTGAGTTT-ACCAATTTTATTT--AT--TGTCTGTATTAACTGGTATGCCAGTGCATATACAGTAAA : 400
T. picturata    : ACAG--TTATTTACT-----TTGAGTTT-ACCAATTTTATTT--AT--TGTCTGTATTAACTGGTATACCAGTGCATATACAGTAAA : 400
T. mazzottii    : ACAG--TTCAATTACT-----TTGAGTTT-ACCAATTTTATTT--AT--TGTCTGTATTAACTGGTATGCCAGTGCCTATACAGTAAA : 396
T. rubida       : ATTTTCATTTATTTACT-----TAGAGTTT-ACCAATTTT-----TATATGTCTGTATATAAACTG-CTATGCCAGCATATAAGTACAGTATA : 411
T. dimidiata    : ACAG--TTCAATTACT-----TCGAGTTT-ACCAATTTTATTT--AT--TGTCTGTATTAACTG-CTATGC-AGTGCATATACAGTAAA : 403
T. phyllosoma   : ACAG--TTCAATTACT-----TTGAGTTT-ACCAATTTTATTT--AT--TGTCTGTATTAACTGGTATGCCAGTGCCTATACAGTAAA : 399
D. maximus     : ACAG--TTTATTTACT-----TCGAGTTT-ACCAATTTTCTTTATTTATTTGGTCTGTATTAACTG-CTATGC--AGGAGGATACAGTATA : 394
P. megistus    : AATTAATGTTGCGCGGAGACACAGAAAATTTTCCAATATATAT-----ATACATTTATAAAATA-TATATATATAAATTTTAAGAAATTTT : 456
R. prolixus     : AAAAC--TGATCCACTA---ATAAGTTT-TAGTTG-AAAATTTGCTGCTAAATTTTATAAATTAATGGAATTTTTCATTTATCTATATAA : 432

*      480      *      500      *      520      *      540      *
T. sherlocki      : T-----AATAAATAAA--TTTCTAATTTTAAACGACCC-CAGACAGGCGTGCCCTTGGGTAGCAATCCCGAGGCGCA----- : 469
T. brasiliensis CTA 076 : T-----AATAAATAAA--TTT-TAATTTTAAACGACCC----- : 427
T. melanica       : T-----AATAAATAAA--TTTCTAATTTTAAACGACCC-CAGACAGGCGTGCCCTTGGGTAGCA-CCAGGGCGCGAATGTGCGTTCA : 449
T. platensis     : T-----AATAA-TAAAA--TTTCTAATTTTAAACGACCC-CAGACAGGCGTAGCCCTTGGGTAGCAATCCAGGGCGCGAATGTGCGTTCA : 476
T. maculata      : TA-----AATTGTGGAT--TTTTCAAATTTG-----ATATTGT-----AAACTATGTAAACAGGTTAGAAATAT-TTCAAAGA--- : 464
T. brasiliensis  : TA-----AATTATGGAT--TTTTCAAATTTG-----ATATTGT-----AAACTATGTAAACAGGTTAGAAATAT-TTCAAAGA--- : 461
T. sordida       : T-----AATAA-TAAAA--TTTCTAATTTTAAACGACCC-CAGACAGGCGTGCCCTTGGGTAGCAATCCAGGGCGCGAATGTGCGTTCA : 479
T. inefstans     : TA-----AATTITGGAT--TTTTCAAATTTG-----ATATTGT-----AAACTATGTAAACAGGTTAGAAATAT-TTAAAGA--- : 453
T. pallidipennis : TAT-----AATTTCAAAT--TTTTCAAATTTT-----ATATTGT-GTCAA-CTATGTAAATA-TAGTATGAAATAT-TGCAATAGAAGA : 473
T. picturata    : TAT-----AATTTCAGT--TTTTCAAATTTT-----ATATTGT-GTCAA-CTATGTAAATA-TAGTATGAAATAT-TGCAATAGAAGA : 473
T. mazzottii    : TAT-----AATTTCAGT--TTTTCAAATTTT-----ATATTGT-GTCAA-CTATGTAAATA-TAGTATGAAATAT-TGCAATAGAAGA : 469
T. rubida       : TATA--TAATTTTCAAG--TTTTCAAATTTT-----ATATTGT-GTCAA-CTATGTAAATA-TAGTATGAAATAT-TTCAAGAGAAGA : 494
T. dimidiata    : TAT-----AATTACAGGT--TTTTCAAATTTT-----ATATTGT-GTCAA-CTATGTAAATA-TAGTATGAAATACCTGCAATAGAA-- : 475
T. phyllosoma   : TAT-----AATTTCAGT--TTTTCAAATTTT-----ATATTGT-GTCAA-CTATGTAAATA-TAGTATGAAATAT-TGCAATAGAA-- : 470
D. maximus     : TAT-----AATTGCAGGT--TTTTCAAATTTG-----GTATATTGTGTTAAACTATGTAAATA-CAAGTATGAAATAT-TTCAAACAAGA : 472
P. megistus    : TTATTTAATAAATAAAAAAATTTCTTATTTATTA----- : 490
R. prolixus     : TCCC--AGGTAATTAGA--TTTGTATTTATTTAACTATATTAAAGGCAA-TTATGGAACA--AGT---AATTTTTTGCAAGAAAGGA : 512

```

Continuação da figura 31.

O tamanho do fragmento das seqüências que foram alinhadas para *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica*, foram 530, 486 e 454, respectivamente. A diferença no tamanho dos fragmentos alinhados para o tamanho do fragmento visualizado no gel deve-se principalmente pela forma com que tal gene foi seqüenciado. No seqüenciamento direto as extremidades do gene normalmente apresenta dificuldade de leitura para o seqüenciador e com isso muitos erros de leitura são adquiridos na seqüência gerada. Devido a esse fato, as

extremidades foram recortadas da sequência final e alinhou-se apenas a região interna do gene, que é confiável para a leitura.

O alinhamento mostrou que o gene é altamente polimórfico entre as espécies que fizeram parte deste estudo.

Outro dado relevante foi a indisponibilidade de sequências desse gene nas espécies que fizeram parte da filogenia baseado nos genes mitocondriais.

A partir desse alinhamento foi construída uma filogenia baseada em método de distância utilizando algoritmo *Neighbor Joining* com modelo *Kimura 2-p* (Figura 32).

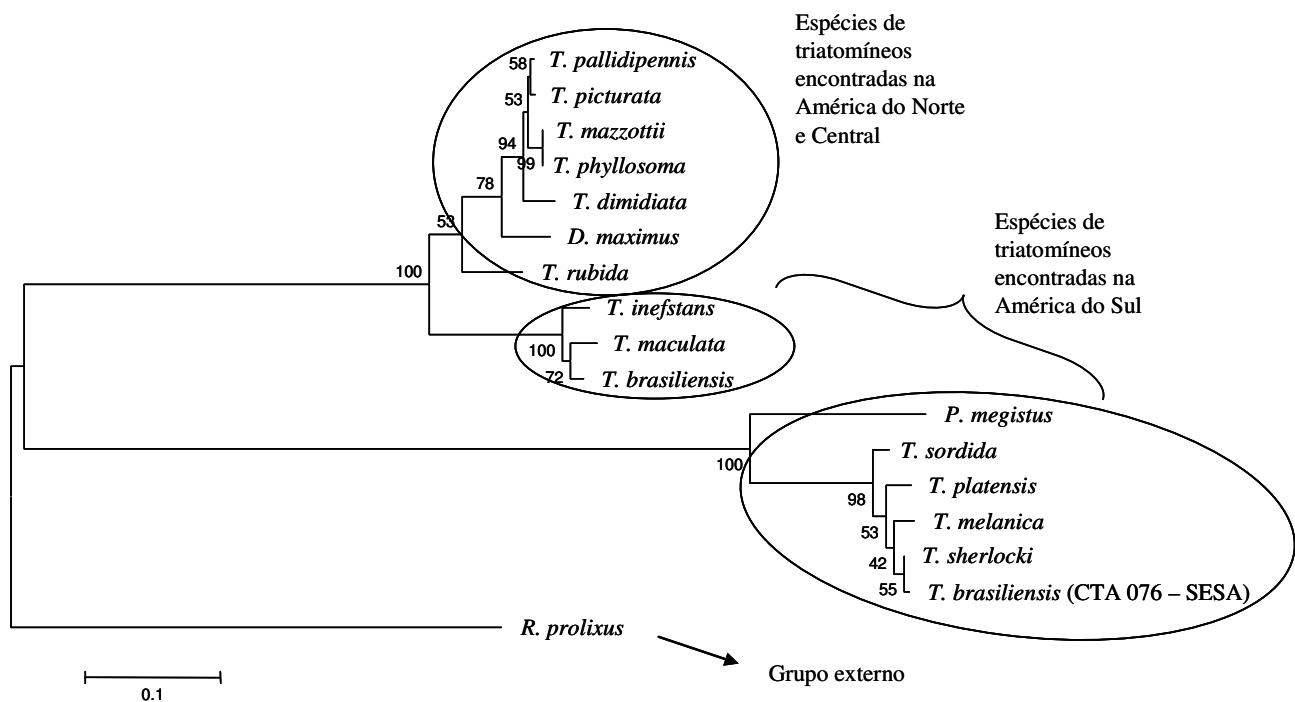


Figura 32. Árvore filogenética proposta a partir do alinhamento das sequências do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) construída com algoritmo *Neighbor Joining* utilizando modelo *Kimura 2-p* observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 - SESA), *T. melanica*, outras espécies da Tribo Triatomini (*D. maxima* e *P. megistus*) e *R. prolixus* como táxon externo.

A análise da filogenia baseada no gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) permite observar que *R. prolixus* ficou bem definido com táxon externo e as outras espécies da Tribo Triatomini divididas em dois clados. *T. sherlocki* aparece mais estritamente relacionado com *T. brasiliensis* (CTA 076 - SESA) e *T. melanica* como táxon irmão dessas duas espécies, nesse

clado ainda aparecem *T. platensis*, *T. sordida* e *P. megistus*, repectivamente como táxons mais externos.

No outro clado há uma subdivisão envolvendo espécies encontradas na América do Norte e Central e espécies encontradas na América do Sul. O que chama bastante a atenção é o fato de *T. brasiliensis*, *T. maculata* e *T. infestans* estarem mais estritamente relacionados com os triatomíneos norte-americanos do que com os sul-americanos, visto que nas filogenias construídas baseadas nos genes mitocondriais isso não aconteceu.

Uma nova filogenia foi proposta baseada em parâmetro de Máxima Parcimônia com o intuito de confirmar essa relação que as espécies apresentaram em metodologia de distância (Figura 33).

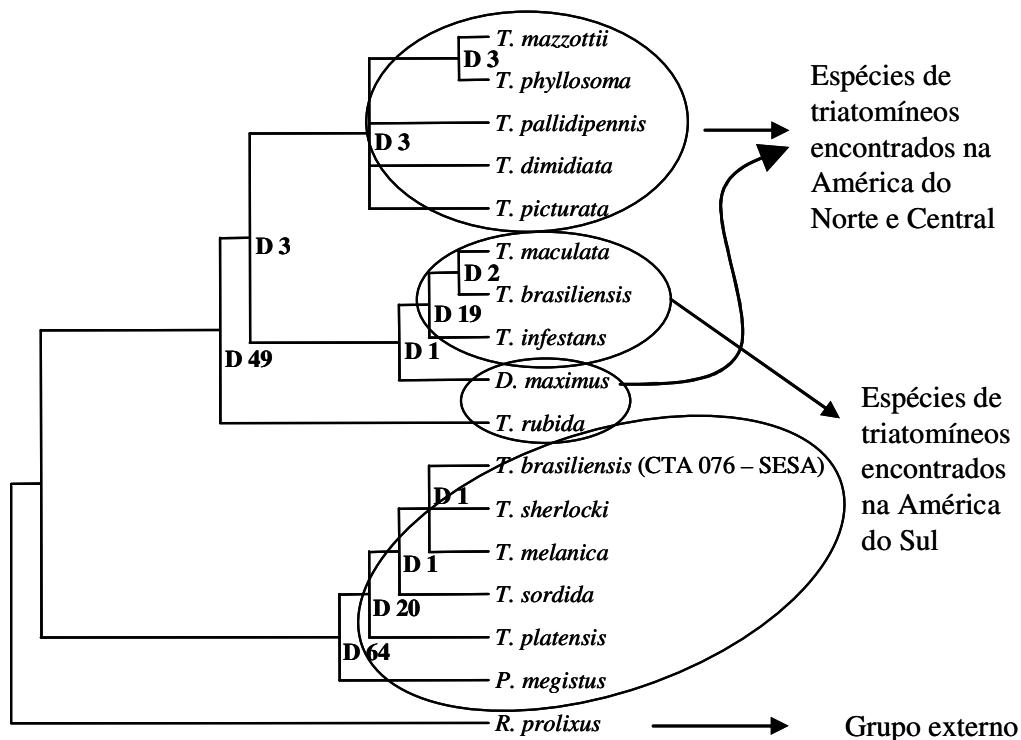


Figura 33. Topologia inferida baseada em parâmetro de Máxima Parcimônia a partir das seqüências alinhadas do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) observado em *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), *T. melanica*, outras espécies da Tribo Triatomini (*D. maximus* e *P. megistus*) e *R. prolixus* como táxon externo.

As três espécies estudadas (*T. sherlocki*, *T. melanica* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA)) aparecem em politomia, com *T. sordida*, *T. platensis* e *P. megistus* como táxons mais externos. O clado irmão apresenta *T. rubida* como táxon mais externo e uma divisão onde em um grupo encontra-se triatomíneos norte-americanos e no outro grupo triatomíneos sul-americanos. *D. maxima* aparece estritamente relacionado com o clado formado pelas espécies sul-americanas representada por *T. brasiliensis*, *T. maculata* e *T. infestans*.

R. prolixus ficou bem definido como táxon externo fornecendo enraizamento a topologia inferida.

A melhor árvore encontrada por parcimônia para inferir a filogenia baseada no sequenciamento do gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) necessitou de 718 passos apresentando os valores de CI = 0,857; RI = 0,927; RC = 0,794 e HI = 0,143.

Devido as espécies não serem as mesmas em todas as filogenias construídas, não foi possível inferir uma topologia única para os genes aqui estudados, o que seria de muita valia, em decorrência da variedade de relações que foram encontradas nas diferentes análises.

V. DISCUSSÃO

T. brasiliensis é uma espécie distribuída pelos estados do Nordeste brasileiro, Minas Gerais e Goiás (Galvão *et al.*, 2003). Essa região possui diversos ecossistemas e conseqüentemente diferentes pressões seletivas atuando sobre as espécies, forçando-as a se adaptarem às mais variadas situações. Alterações comportamentais, fisiológicas, metabólicas levam ao surgimento de subespécies ou mesmo espécies tendo como conseqüência a extinção ou não de uma espécie ancestral (Futuyma, 1992). Essas constatações poderiam explicar uma possível história evolutiva do grupo “*T. brasiliensis*”.

A espécie *T. sherlocki*, coletada em 2003, tem sido encontrada em apenas uma pequena área do interior da Bahia, em ambiente rochoso, desprovido de vegetação, a uma altitude de 473m habitada por lacertídeos e roedores silvestres, no distrito de Santo Inácio, município de Gentio do Ouro, próximo à Chapada Diamantina e ainda não foi encontrada em qualquer outra área do Nordeste brasileiro. A sua descrição recente pode ser fruto da sua endemidade aparente. Apresenta características peculiares como os hemiélitros reduzidos, anéis de cor laranja avermelhado nos fêmures e manchas do conexivo (Papa *et al.*, 2002).

T. melanica (Costa *et al.*, 2006), espécie recentemente descrita, antes uma subespécie de *T. brasiliensis*, parece ser endêmica no Norte de Minas Gerais. A distinção de *T. melanica* com as outras subespécies de *T. brasiliensis*, revelada na construção filogenética, aponta as diferenças que essa espécie apresenta para o restante do grupo *T. brasiliensis*.

A espécie *T. melanica* foi cedida em julho de 2006, oriundos de uma colônia mantida no Laboratório da Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) desde 2004, proveniente de Espinosa/MG onde foram coletados em ambiente silvestre e pedregoso. Essa espécie foi incluída no projeto como uma necessidade, visto que os resultados obtidos a partir das seqüências geradas do citocromo b mostraram semelhanças dessa espécie com *T. sherlocki*. Contudo, para se confirmar esta estrita relação entre *T. sherlocki* e *T. melanica*, as demais seqüências, como a grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial, da grande subunidade ribossomal D2 (28S) e do espaçador interno transcrito 2 (ITS-2) do genoma nuclear, foram relevantes para esclarecer os resultados que haviam sido encontrados.

Apenas com a seqüência do gene mitocondrial do citocromo b verifica-se que *T. sherlocki* poderia ser identificado como um haplótipo do *T. brasiliensis*, levando em consideração

a metodologia aplicada por Monteiro *et al.* (2004), já que esse se enquadra muito bem dentro das variabilidades genéticas encontradas para o grupo *T. brasiliensis*, por vezes assemelhando-se mais com um haplótipo, no caso o “H”, do que mesmo as semelhanças encontradas entre os haplótipos. Porém, ao analisarmos morfologicamente estas duas espécies constatamos grandes diferenças.

T. sherlocki e *T. melanica* revelaram-se estritamente relacionados filogeneticamente em todas as análises realizadas para o gene do citocromo b, tanto distância como Máxima Parcimônia. Na filogenia proposta envolvendo *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA – SESA) e todos os haplótipos de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004) (Figura 9), baseada em Máxima Parcimônia, o interessante de se observar é a separação evidente das duas espécies recentemente descritas, *T. melanica* e *T. juazeirensis*, para as outras duas subespécies, *T. brasiliensis brasiliensis* e *T. brasiliensis macromelasoma*, que aparecem como espécies-irmãs.

Nas análises do citocromo b envolvendo outros gêneros de triatomíneos, ficou evidente a separação das tribos, Triatominae e Rhodniini, e dentro das espécies da Tribo Triatomini, uma segunda divisão bem evidenciada foi em relação às espécies sul-americanas e norte-americanas. Essa separação das espécies por distribuição geográfica não ocorreu na topologia baseada nas seqüências de aminoácidos, aparecendo *T. infestans* mais próximo filogeneticamente das espécies norte-americanas, e na topologia concatenada envolvendo os dados do citocromo b e da grande subunidade ribossomal (16S), aparecendo *P. megistus* mais próximo filogeneticamente das espécies norte-americanas.

A espécie *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) utilizada neste projeto, proveniente do Piauí, é idêntica ao haplótipo “v” (Monteiro *et al.*, 2004) proveniente do Ceará, no que diz respeito à seqüência do citocromo b, identificada no referido trabalho como sendo a subespécie *T. brasiliensis brasiliensis*, aparecendo como táxon irmão de *T. sherlocki* e *T. melanica* nas análises de distância (envolvendo outros gêneros de triatomíneos), na topologia inferida baseada nas seqüências de aminoácidos, e na análise de Máxima Parcimônia com os dados concatenados do citocromo b e da grande subunidade ribossomal (16S). *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) apareceu próxima filogeneticamente a *T. sordida* na filogenia envolvendo outros gêneros de triatomíneos baseada em Máxima Parcimônia.

A filogenia baseada no gene da grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial apresentou alguns dados interessantes. *T. sherlocki* e *T. melanica* foram mais

próximos filogeneticamente nas análises de distância e nos dados concatenados, envolvendo o citocromo b e a grande subunidade ribossomal (16S), apresentando *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) como táxon irmão. Em relação à análise de Máxima Parcimônia, *T. sherlocki* revelou-se mais próximo filogeneticamente a *T. brasiliensis* e *T. melanica* aparecendo como táxon irmão. As duas tribos, Triatomini e Rhodniini, foram claramente separadas em todas as análises para esse gene e dentro das espécies da Tribo Triatomini as mesmas se portaram de maneiras diferentes nas diversas análises. Na análise de distância *T. protracta* e *T. nitida* aparecem como grupo irmão de *P. megistus* e *D. maximus*, e esse clado revela-se mais próximo filogeneticamente do clado onde estão relacionadas às espécies sul-americanas do que com o clado onde estão presentes as espécies norte-americanas. Nas análises de Máxima Parcimônia e dos dados concatenados do citocromo b e da grande subunidade ribossomal (16S), as espécies ficaram claramente separadas no que diz respeito à distribuição geográfica, exceção feita com a espécie *P. megistus*, que nas duas análises apresentou-se filogeneticamente mais próxima das espécies norte-americanas.

A análise do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) apresentou uma tricotomia envolvendo as espécies *T. sherlocki*, *T. melanica* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) na análise baseada em Máxima Parcimônia. Na análise de distância *T. melanica* aparece um pouco mais distante em relação às outras duas espécies. O grupo irmão foi representado pelas espécies *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. nasutus* e o suporte foi dado pelo táxon externo *Corythucha* sp. A filogenia foi subestimada devido ao baixo número de táxons presentes na árvore, não sendo possível observar as relações que outras espécies, principalmente àquelas presentes nas filogenias baseadas nos genes mitocondriais. Esse fato ocorreu devido à ausência de seqüências desse gene para outras espécies de triatomíneos nos bancos de dados. Mesmo a relação entre as três espécies estudadas trouxe dificuldade para análise, uma vez que as mesmas aparecem em tricotomia, não guardando nenhuma relação mais estreita uma com a outra. Desse modo os dados obtidos neste estudo não puderam ser confirmados.

O espaçador interno transcrito 2 (ITS-2) foi o último gene a ser seqüenciado e aquele que apresentou maior dificuldade. Para a sua amplificação foram testados 6 primers e apenas com os dois últimos foi possível visualizar um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases para as três espécies estudadas. A clonagem e a transformação também trouxeram obstáculos para a obtenção das seqüências desse gene, e devido a esses problemas o seu sequenciamento foi direto, sem clonagem, como nos demais genes. Os vários tamanhos dos fragmentos analisados nas três

espécies estudadas, deveram-se a prováveis erros de leitura no sequenciador e também a enzima utilizada para a amplificação, cujo fragmento gerado foi utilizado como molde para a reação de sequenciamento.

O gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) revelou-se altamente polimórfico e de tamanhos variados entre as espécies utilizadas no alinhamento. A filogenia baseada em distância mostrou *T. maculata* e *T. brasiliensis* (oriunda do Ceará) (Marcilla *et al.*, 2001) mais próximas filogeneticamente apresentando *T. infestans* como táxon irmão, formando um clado estritamente relacionado com as espécies de triatomíneos norte-americanas. Esse clado formado pelas espécies norte-americanas mais as três citadas acima aparecem como um grupo irmão das espécies sul-americanas, onde *T. sherlocki* aparece mais estritamente relacionado filogeneticamente com *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), e *T. melanica*, *T. platensis*, *T. sordida* e *P. megistus* aparecem como táxons mais externo, respectivamente. *R. prolixus* ficou bem definido como grupo externo.

A análise de Máxima Parcimônia do gene do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) mostrou uma relação mais detalhada das espécies envolvidas, onde a separação das espécies por distribuição geográfica, até aqui bem definidas, não foi observada. *T. sherlocki*, *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA) e *T. melanica* aparecem em tricotomia, e *T. sordida*, *T. platensis* e *P. megistus* como espécies externas, respectivamente. *T. rubida* aparece como táxon externo do clado irmão das espécies acima citadas, que revela ainda uma subdivisão envolvendo espécies norte-americanas em um grupo e *T. maculata*, *T. brasiliensis* e *T. infestans* relacionadas filogeneticamente com *D. maximus* em outro grupo.

A dificuldade de trabalhar com genes nucleares foi visível neste projeto, tanto tecnicamente, no caso da obtenção das seqüências do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*), como filogeneticamente, no caso do gene da grande subunidade ribossomal D2 (28S) onde a falta de seqüências em bancos de dados de outros táxons prejudicou a construção da filogenia.

A relação mais estreita entre as três espécies estudadas nesse projeto se revelou em todas as filogenias propostas para todos os genes aqui seqüenciados.

Uma provável confirmação da afinidade entre *T. sherlocki* e *T. melanica* viria com a filogenia baseada em um gene nuclear, porém, a indisponibilidade de seqüências de outros triatomíneos fez com que a árvore filogenética não apresentasse a robustez desejada.

Alguns resultados encontrados necessitam de maiores informações para esclarecer de maneira mais segura as relações filogenéticas de algumas espécies, como é o caso de *P. megistus*

e *T. infestans*, revelando em algumas topologias maior afinidade com as espécies norte-americanas.

A intenção de construir uma filogenia única, concatenando todas as seqüências, não foi possível pelo fato das espécies não terem em comum em todas as análises, mesmo assim observam-se as relações de afinidade entre as espécies analisadas visualizando um padrão esperado para topologias que vierem a ser construídas.

VI. CONCLUSÕES

O seqüenciamento de genes mitocondriais, do citocromo b (*cytb*) e da grande subunidade ribossomal (16S), e nucleares, do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) e da grande subunidade ribossomal D2 (28S), mostraram-se úteis para estudos filogenéticos das espécies pertencentes à subfamília Triatominae.

Com base nas seqüências geradas dos genes das três espécies estudadas neste projeto, *T. sherlocki* revelou uma maior afinidade com a espécie *T. melanica*.

T. brasiliensis (CTA 076 – SESA) mostrou-se filogeneticamente mais relacionado com *T. sordida*, de acordo com a seqüência do citocromo b, aparecendo como táxon irmão de *T. sherlocki* e *T. melanica* nos outros genes seqüenciados.

As relações filogenéticas revelaram uma evidente separação entre os triatomíneos norte-americanos e os sul-americanos, exceção para *T. infestans* e *P. megistus* que mostraram mais afinidade com os triatomíneos norte-americanos nas filogenias baseadas nas seqüências dos aminoácidos do citocromo b e da grande subunidade ribossomal (16S) do genoma mitocondrial.

Os genes nucleares apresentaram filogenia diferente daquelas apresentadas para os genes mitocondriais.

A filogenia baseada na grande subunidade ribossomal D2 (28S) foi subestimada pelo baixo número de seqüências disponíveis em bancos de dados.

As seqüências do espaçador interno transcrito 2 (*ITS-2*) foi altamente polimórfica para todos os táxons analisados e a filogenia inferida confirmou a estrita relação encontrada para *T. sherlocki*, *T. melanica* e *T. brasiliensis* (CTA 076 – SESA), porém variando em relação aos outros táxons.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F. & MONTEIRO, F.A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **An. Acad. Bras. Cienc.** **77** (3): 437-54, 2005.

AKHAVAN, D. **Análise de custo-efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, 2000.

ALARCÓN, C. **Evaluación del efecto combinado de los parámetros temperatura y humedad relativa sobre la eclosión de los huevos de *Rhodnius prolixus* (Hemíptera, Reduviidae) y la capacidad parasitaria de *Ooencyrtus trinidadensis* (Hymenoptera, Encyrtidae)**. Tesis de Licenciatura, Univ. Simón Bolívar, Caracas. 1980.

ALMEYDA-ARTIGAS, R.J.; BARGUES, M.D. & MAS-COMA, S. ITS-2 rDNA Sequencing of *Gnathostoma* species (NEMATODA) and elucidation of the species causing human Gnathostomiasis in the Americas. **The Journal of Parasitology**. **86** (3): 537-44, 2000.

ARAS, R.; GOMES, I.; VEIGA, M. & MELO, A. Transmissão vetorial de doença de Chagas em Mulungu do Morro, Nordeste do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **36** (3): 359-63, 2003.

AVISE, J.A.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERNINGHAM, E.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A. & SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylo-geography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Rev. Ecol. Syst.** **18**: 489-522, 1987.

BACHELLERIE, J.P. & LIANG, H.Q. 1993. Ribossomal RNA probes for detection and identification of species. In: Hyde, J.E. (Org.) **Protocols in molecular parasitology**. v. 21. Totowa, New Jersey: Humana.

BAE, J.S.; KIM, I.; SOHN, H.D. & JIN, B.R. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. **Mol. Phylogenet. Evol.** **32** (3): 978-85, 2004.

BANGHAM, C.R.M. The polymerase chain reaction: getting started. In: Mathew, C. (org.). **Methods in molecular biology**. v. 9: Protocols in human molecular genetics. Clifton, NJ: Humana, p. 1-8, 1991.

BARGUES, M.D.; MARCILLA, A.; DUJARDIN, J.P. & MAS-COMA, S. Triatominae vectors of Chagas disease: a molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. **96** (suppl. 1): 159-64, 2002.

BARGUES, M.D.; MARCILLA, A.; RAMSEY, J.; DUJARDIN, J.P.; SCHOFIELD, C.J. & MAS-COMA, S. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vector of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **95**: 567-73, 2000.

BEARD, C.B.; HAMM, D.M. & COLLINS, F H. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of the other insects. **Insect Mol. Biol.** **2** (2): 103-24, 1993.

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J. & LENT, H. 1999, vol. III, p. 925-80. Filogenia dos triatomíneos. “In: **Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas**” (R.U. CARCAVALLO, I. GALÍNDEZ GIRÓN, J. JURBERG & H. LENT org.). Editora Fiocruz – Rio de Janeiro.

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H.; NOIREAU, F. & GALVÃO, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Entomología y Vectores**. **7** (suppl. 1): 1-99, 2000.

CERQUEIRA, R.L. **Estudos sobre população de triatomíneos silvestres encontrados em Santo Inácio – BAHIA**. 68p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Departamento de Parasitologia, São Paulo, 1982.

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

CLARY, D.O. & WOLSTENHOLME, D.R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **J. Mol. Evol.** **22:** 252-71, 1985.

COLEMAN, A.W. ITS-2 is a double-edged tool for eukaryote revolutionary comparisons. **Trends Genet.** **19** (7): 370-5, 2003.

COSTA, J. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): **Estudos Morfológicos, Biológicos e Isoenzimáticos sobre Diferentes Padrões Cromáticos**, PhD Thesis, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 100 pp. 1997.

COSTA, J.; ALMEIDA, J.R.; BRITTO, C.; DUARTE, R.; MARCHON-SILVA, V. & PACHECO, R. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **93:** 7-13, 1998.

COSTA, J.; ARGOLO, A. & FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa.** **1385:** 47-58, 2006.

COSTA, J. & FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **102:** 87-90, 2007.

COSTA, J. & MARCHON-SILVA, V. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomol. Vec.** **5:** 23-34, 1998.

COSTA, J.; PETERSON, A.T. & BEARD, C.B. Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas. disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **67**: 516-20, 2002.

CROZIER, R.H. & CROZIER, Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. **Genetics.** **133**: 97-117, 1993.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. **In**: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A. & BARRAL-NETO, M. *Tripanossoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p. 2000.

DIAS, J.C.P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública.** **23** (supl. 1): 13-22, 2007.

DIAS, J.C.P. Reseña histórica de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y reflexiones sobre algunos aspectos políticos y sócio-económicos de la endemia en el contexto latinoamericano. **Rev. Feder. Argent. Cardiol.** **29**: 129-35, 1988.

DIAS, J.C.P. & BORGES-DIAS, R. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. **Ciênc. Cult.** **31**: 105-24, 1979.

DIAS, J.C.P. & COURA, J.R. Epidemiologia. **In**: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. organizadores. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 33-66, 1997.

DIAS, J.C.P.; PRATA, A. & SCHOFIELD, C.J. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **35** (6): 669-78, 2002.

DOTSON, E.M. & BEARD, C.B. Sequence and orgaization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. **Insect Molecular Biology.** **10** (3): 205-15, 2001.

DUJARDIN, J.P.; PANZERA, P. & SCHOFIELD, C. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **94**: 223-8, 2000.

FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev. Saúde Publ.** **14**: 285-99, 1980.

FORERO, D.; WEIRAUCH, C.; BAENA, M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). **Zootaxa.** **670**: 1-12, 2004.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**, Trad. de Mário Vivo e coord. de Fabio de Melo Sene. 2ª Ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 646p. 1992.

GALVÃO, A.B. *Triatoma brasiliensis macromelasoma* n. subsp. (Hemiptera: Reduviidae). **Rev. Brasileira Malariol. Doenças Trop.** **7**: 455-7, 1956.

GALVÃO, C. & ANGULO, V.M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemíptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. **Zootaxa.** **1241**: 61-8, 2006.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S. & JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannet, 1919 (Hemíptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa.** **202**: 1-36, 2003.

GARCIA, A.L.; CARRASCO, A.J.; SCHOFIELD, C.J.; STOTHARD, J.R.; FRAME, I.A.; VALENTE, S.A.S. & MILES, M.A. Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of Triatominae bugs (Hemiptera: Reduviidae). **J. Med. Entomol.** **35** (1): 38-45, 1998.

GARCIA, B.A. & POWELL, J.R. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. **J. Med. Entomol.** **35**: 232-8, 1998.

GUHL, F.; JARAMILLO, C. & VALLEJO, G.A. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000-year-old mummified human tissue from northern Chile. **Am. J. Phy. Anthropol.** **108**: 401-7, 1999.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** **41**: 95-8, 1999.

HILLIS, D.M. & DIXON, M.T. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. **Q. Rev. Biol.** **66**: 411-53, 1991.

HILLIS, D.M.; MORITZ, C. & MABLE, B.K. **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 655 p. 1996.

HYPSE, V.; TIETZ, D.F.; ZRZAVÝ, J.; REGO, R.O.M.; GALVÃO, C. & JURBERG, J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. **Mol. Phylog. Evol.** **23**: 447-57, 2002.

JUSTINO, H.H.G. **Variabilidade da região ITS2 do DNA Ribossomal de *Triatoma arthurneivai* (Lent & Martins, 1940) e *Triatoma tibiamaculata* (Pinto, 1926) avaliada por RFLP**. 76p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Programa de Análises Clínicas, Araraquara/SP, 2004.

KRZYWINSKI, J.; GRUSHKO, O.G. & BESANSKY, N.J. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipteran mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. **Mol. Phylogenet. Evol.** **39** (2): 417-23, 2006.

KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA 3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics.** **5**: 150-63, 2004.

LEIBY, D.A.; HERRON Jr, R.M.; READ, E.J.; LENES, B.A. & STUMPF, R.J. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on soroprevalence and implications for transfusion transmission. **Transfusión. 42** (5): 549-55, 2002.

LENT, H. & WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. **Bull. Am. Mus. Nat. His. 163**: 123-520, 1979.

LEWIS, D.L.; FARR, C.L. & KAGUNI, L.S. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. **Insect Mol. Biol. 4**: 263-78, 1995.

LIOLIOS, K.; TAVERNARAKIS, N.; HUGENHOLTZ, P. & KYRPIDES, N.C. The Genomes On Line Database (GOLD) v.2: a monitor of genome projects worldwide. **Nucleic Acids Research. 34**: 332-4, 2006.

LUKASHEVICH, E.D. & MOSTOVSKI, M.B. Hematophagous insects in the fossil record. **Paleontol. J. 37**: 153-61, 2003.

LYMAN, D.F.; MONTEIRO, F.A.; ESCALANTE, A.A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D.M.; DUJARDIN, J.P. & BEARD, C.B. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. **Am. J. Trop. Med. & Hyg. 60** (3): 377-86, 1999.

MARCILLA, A.; BARGUES, M.D.; ABAD-FRANCH, F.; PANZERA, F.; CARCAVALLO, R.U.; NOIREAU, F.; GALVÃO, C.; JURBERG, J.; MILES, M.A.; DUJARDIN, J.P. & MASCOMA, S. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution. 1**: 225-35, 2002.

MARCILLA, A.; BARGUES, M.D.; RAMSEY, J.M.; MAGALLON-GASTELUM, E.; SALAZAR-SCHETTINO, P.M.; ABAD-FRANCH, F.; DUJADIN, J.P.; SCHOFIELD, C. J. & MAS-COMA, S. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **18**: 136-42, 2001.

MARTINS, A.V. Epidemiologia. **In**: CAÇADO, J. R., (ed). **Doença de Chagas**. Belo Horizonte: Imprensa Oficial, p. 285-97, 1968.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **94** (suppl. 1): 401-4, 1999.

MONTEIRO, F.A.; DONNELLY, M.J.; BEARD, C.B. & COSTA, J. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. **32**: 46-56, 2004.

MONTEIRO, F.A.; ESCALANTE, A.; BEARD, C.B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends in Parasitology**. **17** (7): 344-7, 2001.

MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J. & BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **62**: 460-5, 2000.

MORAES-SOUZA, H. Chagas Infection Transmission Control: Situation of Transfusional Transmission in Brazil and other Countries of Latin América. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **94** (Suppl. 1): 419-23, 1999.

MORENO, A.R. & CARCAVALLO, R.U., 1999, vol. III, 981-1016. Enfoque ecológico da epidemiologia da doença de Chagas. “**In: Atlas dos Vetores da Doença de Chagas nas Américas**” (R.U. CARCAVALLO, I. GALÍNDEZ GIRÓN, J. JURBERG & H. LENT org.). Editora Fiocruz – Rio de Janeiro.

MUSE, S.V.E. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. **Plant Mol. Biol.** **42**: 25-43, 2000.

NEIVA, A. & LENT, H. Sinopse dos Triatomídeos. **Rev. Ent.** Rio de Janeiro, v. 12, p. 61-92, 1941.

OLIVEIRA, M.C. de; MENCK, C.F.M. 2001, cap. 2, 15-26. O mundo de RNA e a origem da complexidade da vida. “In: **Biologia Molecular e Evolução**” (S. R. MATIOLI, ed.). Holos – Ribeirão Preto.

PACHECO, R.S.; ALMEIDA, C.E.; COSTA, J.; KLISIEWICZ, D.R.; MAS-COMA, S. & BARGUES, M.D. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). **An. Tropic. Med. & Paras.** **97** (7): 757-68, 2003.

PAPA, A.R.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.U.; CERQUEIRA, R.L. & BARATA, J.M.S. *Triatoma sherlocki* sp. n. coletada na Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomol. Vect.** **9** (1): 133-46, 2002.

PASKEWITZ, S.M.; WESSON, D.M. & COLLINS, F.H. The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of *Anopheles gambiae* species complex. **Insect Molecular Biology.** **2** (4): 247-57, 1993.

PORTER, C.H. & COLLINS, F.H. Phylogeny of Nearctic members of the *Anopheles maculipennis* species group derived from the D2 variable region of 28S ribosomal RNA. **Mol. Phylogenetic Evol.** **6**: 178-88, 1996.

PORTER, C.H. & COLLINS, F.H. Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). **Am. J. Tropical Medicine and Hygiene.** **45**: 271-9, 1991.

ROTHHAMMER, F.; ALLISON, M.J., NUÑEZ, L.; STADEN, V. & ARRIZA, B. Chagas disease in pre-Columbian South America. **Am. J. Phys. Anthropol.** **68**: 495-8, 1985.

SAINZ, A.C.; MAURO, L.V.; MORIYAMA, E.N. & GARCÍA, B.A. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. **Genetica** **121**: 229-40, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Vol. 1,2 and 3, 1989.

SANDOVAL, C.M.; PABÓN, E.; JURBERG, J. & GALVÃO, C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombia north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa**. **1443**: 55-64, 2007.

SCHAEFER, C.W. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Questões sistemáticas e algumas outras. **Neotrop. Entomol.** **32** (1): 1-10, 2003.

SCHMUÑIS, G.A. A tripanossomíase americana e seu impacto na saúde pública das Américas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanossoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p. 2000.

SCHMUÑIS, G.A. & DIAS, J.C.P. La reforma del sector salud, descentralización prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores. **Cad. Saúde Pública**. **16**: (suppl. 2): 117-23, 2000.

SCHOFIELD, C.J. *Trypanosoma cruzi*: The vector-parasite paradox. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **95** (4): 535-44, 2000.

SCHOFIELD, C.J. & DIAS, J.C.P. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. **Adv. Parasitol.** **42**: 1-27, 1999.

SILVEIRA, A.C. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cad. de Saúde Pública.** **16** (Suppl. 2): 35-42, 2000.

SILVEIRA, A.C. & VINHAES, M.C. Elimination of Vector-borne Transmission of Chagas Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **94** (Suppl. 1): 405-11, 1999.

STORINO, R.; BARRAGÁN, H. & MILEI, J. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. In: LEMUS, J. D. (coord.) **Epidemiología y atención de la Salud en la Argentina.** Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, nº 35, 1993.

SWOFFORD, D.L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1998.

TERRA, W.R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** **21**: 675-734, 1988.

VINHAES, M.C. & DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública.** **16** (suppl. 2): 7-12, 2000.

VITTA, A.C.R.; MOTA, T.R.P.; DIOTAIUTI, L. & LORENZO, M.G. The use of aggregation signals by *Triatoma brasiliensis* (Heteroptera: Reduviidae). **Acta Tropica.** **101**: 147-52, 2007.

WHO – Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization; 2002 (Technical Report Series, 905).

WHO – Making health research work for poor people, progress 2003-2004. **Tropical Disease Research Seventeenth Programme Report.** 2005. Disponível em:
<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr17/pr17.pdf>. Acesso em: 26/08/06.

YUKUHIRO, K.; SEZUTSU, H.; ITOH, M.; SHIMIZU, K. & BANNO, Y. Significant levels of sequence divergence and gene rearrangements have occurred between the mitochondrial genomes of the wild mulberry silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*. **Mol. Biol. Evol.** **19** (8): 1385-9, 2002.

VIII. ANEXOS

ANEXO I

Tabela 1. Código de acesso no GenBank das seqüências utilizadas no alinhamento do gene mitocondrial do citocromo b para inferir possíveis relações filogenéticas entre diversas espécies de triatomíneos. Disponível em: “National Center for Biotechnology Information” (www.ncbi.nlm.nih.gov).

	DNA Mitocondrial		DNA Nuclear	
	Citocromo b	16S	ITS-2	28S
<i>A. cristatus</i>	AF045729.1	AF045712		
<i>Corythucha sp</i>				DQ133587.1
<i>D. maximus</i>	AF045728.1	AY185831.1	AJ286887.1	
<i>P. megistus</i>	AF045722.1	AF021181.1	AJ306542	
<i>Psa. coreodes</i>	AF045719	AF045708.1		
<i>R. brethesi</i>	AF045714.1	AF045710.1		
<i>R. ecuadoriensis</i>	AF045715.1	AF028746		
<i>R. nasutus</i> naBR				AF435856.1
<i>R. neglectus</i>	AF045716.1	AF045704		
<i>R. pallescens</i>		AF045706		
<i>R. pictipes</i>	AF045713.1	AF045709.1		
<i>R. prolixus</i>		AF324519	AJ286888	
<i>R. prolixus</i> prCO1				AF435860.1
<i>R. prolixus</i> prVE5				AF435862.1
<i>R. robustus</i>	AF421341.1	AF045705.2		
<i>R. robustus</i> roBR4				AF435857.1
<i>R. robustus</i> roBR8				AF435859.1
<i>R. robustus</i> roEC				AF435858.1
<i>R. robustus</i> roVE2				AF435861.1
<i>T. brasiliensis</i>		AF021185	AJ293591.1	
<i>T. brasiliensis</i> a	AY336524			
<i>T. brasiliensis</i> b	AY494140			
<i>T. brasiliensis</i> c	AY494141			
<i>T. brasiliensis</i> d	AY494142			
<i>T. brasiliensis</i> e	AY494143			
<i>T. brasiliensis</i> f	AY494144			
<i>T. brasiliensis</i> g	AY494145			
<i>T. brasiliensis</i> h	AY494146			
<i>T. brasiliensis</i> i	AY494147			
<i>T. brasiliensis</i> j	AY494148			
<i>T. brasiliensis</i> k	AY494149			
<i>T. brasiliensis</i> l	AY494150			
<i>T. brasiliensis</i> m	AY494151			

<i>T. brasiliensis</i> n	AY494152		
<i>T. brasiliensis</i> o	AY494153		
<i>T. brasiliensis</i> p	AY494154		
<i>T. brasiliensis</i> q	AY494155		
<i>T. brasiliensis</i> r	AY494156		
<i>T. brasiliensis</i> s	AY494157		
<i>T. brasiliensis</i> t	AY494158		
<i>T. brasiliensis</i> u	AY494159		
<i>T. brasiliensis</i> v	AY494160		
<i>T. brasiliensis</i> w	AY336525		
<i>T. brasiliensis</i> x	AY494161		
<i>T. brasiliensis</i> y	AY494162		
<i>T. brasiliensis</i> z	AY494163		
<i>T. brasiliensis</i> A	AY494164		
<i>T. brasiliensis</i> B	AY336526		
<i>T. brasiliensis</i> C	AY494165		
<i>T. brasiliensis</i> D	AY494166		
<i>T. brasiliensis</i> E	AY494167		
<i>T. brasiliensis</i> F	AY494168		
<i>T. brasiliensis</i> G	AY494169		
<i>T. brasiliensis</i> H	AY336527		
<i>T. brasiliensis</i> I	AY494170		
<i>T. dimidiata</i>	AF301594.1	AY035448.1	AY860415.1
<i>T. infestans</i>	AF045721.1	AF021198.1	AJ286874.1
<i>T. maculata</i>			AJ582027
<i>T. mazzottii</i>	AY859422	AY035446	AJ286885
<i>T. nitida</i>	AF045723.1	AF045702.1	
<i>T. pallidipennis</i>	DQ198814.1	AY185839.1	AY860403.1
<i>T. phyllosoma</i>	DQ198818.1		AJ286881.1
<i>T. picturata</i>	AY859413.1	AY185840.1	AY860404.1
<i>T. platensis</i>		AF021201.1	AJ576062.1
<i>T. protracta</i>	AF045727.1	AF324529.1	
<i>T. recurva</i>	DQ198812.1		
<i>T. rubida</i>			AY860389.1
<i>T. rubida sonoriانا</i>	DQ198810.1		
<i>T. sanguisuga</i>	AF045725.1	AF045696.1	
<i>T. sordida</i>	AF045730.1	AF021209.1	AJ576063.1

ANEXO II

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado intitulada “Análise da realção filogenética entre *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueria & Barata, 2002 e *T. brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares”:

(X) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

() tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº _____).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).

Vagner José Mendonça
Aluno
[Assinatura]
Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Nome:
Função: