

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCELISE BRIDI CAVASSIN

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Panstrongylus megistus* BURMEISTER, 1835
(HEMIPTERA: REDUVIDAE: TRIATOMINAE) DO ESTADO DO PARANÁ, MEDIANTE
SEQUENCIAMENTO DE MARCADORES DE DNA RIBOSSOMAL NUCLEAR

CURITIBA

2011

FRANCELISE BRIDI CAVASSIN

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Panstrongylus megistus* BURMEISTER, 1835
(HEMIPTERA: REDUVIDAE: TRIATOMINAE) DO ESTADO DO PARANÁ, MEDIANTE
SEQUENCIAMENTO DE MARCADORES DE DNA RIBOSSOMAL NUCLEAR

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Parasitologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Débora do Rocio Klisiowicz

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Cavassin, Franceline Bridi

Caracterização molecular de *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) do Estado do Paraná, mediante seqüenciamento de marcadores de DNA ribossomal nuclear. / Franceline Bridi Cavassin. – Curitiba, 2011.

77 f.: il. color. ; 30cm.

Orientador: Débora do Rocio Klisiowicz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Doença de Chagas 2. Parasitologia I. Título II. Klisiowicz, Débora do Rocio, III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

CDD (20. ed.) 616.936



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

TERMO DE APROVAÇÃO

**"CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Panstrongylus megistus*
BURMEISTER, 1835 (HEMIPTERA: REDUVIDAE: TRIATOMINAE) DO ESTADO
DO PARANÁ, MEDIANTE SEQUENCIAMENTO DE MARCADORES DE DNA
RIBOSSOMAL NUCLEAR"**

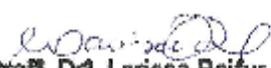
por

FRANCELISE BRIDI CAVASSIN

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Prof.ª Dr.ª Débora do Rocio Klisowicz (presidente)


Prof. Dr. Rogério Luis Kopp


Prof.ª Dr.ª Larissa Reifur

Prof.ª Dr.ª Edlene Alcântara de Castro
Membro Suplente

Curitiba, 30 de novembro de 2011.

“Família: alicerce da vida”

Aos meus pais Marilú e Nelson. Por todo o amor;

À minha irmã Liz. Pela amizade de sempre,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter-me permitido chegar até aqui.

À Dr^a. Débora do Rocio Klisiowicz, orientadora e amiga, pela dedicação, incentivo, apoio e, principalmente, por todo ensinamento transmitido nesses anos.

Ao Dr. Ennio Luz, pela contribuição ao partilhar seu conhecimento e vivência durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Secretaria de Estado da Saúde do Paraná pela colaboração na realização deste trabalho, em especial à Themis Valeria de Souza Baptista, responsável pelo controle zoonótico da Doença de Chagas no Paraná.

Aos professores do departamento de Patologia Básica: Adriana Frohlich Mercadante, Andréa Emilia Marques Stinghen, Edilene Alcântara de Castro, Giseli Klassen, Ida Chapaval Pimentel, Ida Cristina Gubert, Juliana Ferreira de Moura, Larissa Alvarenga Magalhães, Larissa Reifur, Luiz Felipe Caron, Márcia Kiyoe Shimada Patrícia do Rocio Dalzoto, Rosangela Clara Paulino, Silvio Marques Zanata, Vanete Thomaz Soccol e Vânia Aparecida Vicente, pelas disciplinas ministradas durante o curso e por todo o conhecimento compartilhado seja em sala de aula, nos corredores, durante o café ou em conversas informais. Vocês todos fizeram a diferença.

Ao Dr. Rogério Luiz Kopp, do departamento de Patologia Médica, por ceder suas amostras e disponibilizar dados, possibilitando resultados satisfatórios para o presente trabalho.

Ao Dr. João Aristeu, responsável pelo Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara/SP, por sua disposição em enviar-nos prontamente o material solicitado.

Aos funcionários do departamento de Patologia Básica, em especial à secretária Luciana Marques, pela ajuda e amizade.

Às colegas de pós-graduação Alessandra Beker, Déberli Fernandes e Juliana Seger, pela amizade, companheirismo e contribuição partilhada durante o curso. E aos demais, que de uma forma somaram no bom desenvolvimento do trabalho.

À aluna de Iniciação Científica, Brenda Cecília Ribeiro, por toda a colaboração dedicada na execução desse trabalho.

Ao querido amigo Joel Assunção pelo incentivo, apoio e carinho que me foi dado e por estar sempre ao meu lado nos momentos de necessidade.

Ao Eduardo Barbosa, companheiro e amigo, que participa da minha vida mesmo estando longe. Obrigada pelo apoio, incentivo, amizade, palavras de carinho e à atenção dedicada em todos os momentos. Você faz parte dessa conquista.

À Fundação Araucária, por tornar viável a execução desse projeto.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

E, por fim, à minha família, sempre ao meu lado disposta a me ajudar. Agradeço a compreensão e ao amor incondicional doado em todos os momentos de dificuldade e as boas vibrações nas horas de alegria. Obrigada por acreditarem em mim. Essa vitória também é de vocês.

A principal meta da educação é criar homens que sejam capazes de fazer coisas novas, não simplesmente repetir o que outras gerações já fizeram. Homens que sejam criadores, inventores, descobridores. A segunda meta da educação é formar mentes que estejam em condições de criticar, verificar e não aceitar tudo que a elas se propõe.

Jean Piaget



“Dada a grande extensão da endemia, a difusão do inseto transmissor em vastas regiões do país, a infestação total dos domicílios nas zonas rurais, sem dúvida este problema sanitario oferece dificuldades práticas, todas de ordem econômica.

Ligado, porém, como se acha ao desenvolvimento do trabalho, a prosperidade da agricultura, ao povoamento do solo, ao aperfeiçoamento da raça em nossos sertões; ligado ainda nos deveres da humanidade e de civilização, ao orgulho de um povo, a grandeza moral de uma nacionalidade, de certo não nos faltará a energia necessária para encarar-o um dia de modo decisivo, para resolvê-lo de modo proveitoso.”

(Carlos Chagas em 1912)

RESUMO

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*. A doença está presente na maioria dos países da América Latina e o seu controle se apóia principalmente no combate aos triatomíneos vetores. Entre as espécies de triatomíneos existentes no Brasil, *Panstrongylus megistus* apresenta uma elevada capacidade de adaptação ao ambiente doméstico e é considerada de grande importância epidemiológica desde a eliminação do *Triatoma infestans*. O presente trabalho teve como principal objetivo, mediante o sequenciamento de marcadores de DNA ribossomal nuclear, a caracterização molecular de espécimes e populações de *Panstrongylus megistus* do Estado do Paraná. Espécimes de outros estados também foram incluídos nesse estudo. Dos 37 espécimes submetidos à extração e sequenciamento de DNA, 32 geraram sequências capazes de serem analisadas para os marcadores - primeiro e segundo espaçador transcrito interno (ITS-1 e ITS-2) do DNA ribossomal nuclear. No total, 24 diferentes haplótipos foram descritos para os exemplares analisados da espécie *Panstrongylus megistus*, quando estudados os marcadores moleculares ITS-1 e ITS-2 em conjunto. O comprimento da região intergênica variou entre 1357 e 1366 pares de base, com uma média de 1361,1 pares de base. O comprimento do alinhamento geral para todos os haplótipos descritos foi de 1366 pares de base, incluindo as inserções/deleções. O ITS-1 apresentou um maior comprimento em pares de bases, bem como, uma maior diversidade de haplótipos devido principalmente a inúmeras inserções/deleções. Devido a esse fato o fragmento ITS-2 aportou maiores informações para a análise de distribuição dos haplótipos. Foi detectado um maior número de haplótipos em insetos provenientes do primeiro planalto paranaense. Essa maior diversidade apóia a hipótese de origem e dispersão de *Panstrongylus megistus* a partir da Mata Atlântica costeira. Para o segundo planalto paranaense foi observado somente 2 haplótipos e que são coincidentes com o primeiro planalto. Já no terceiro planalto houve a presença de 4 haplótipos, 3 deles diferentes dos demais, e somente 1 haplótipo não encontrado em outros estados. O haplótipo CH-2 foi encontrado em todas as regiões paranaenses estudadas, bem como nos estados do Rio Grande do Sul e Sergipe. Esse pode ser apontado, até o momento, como o haplótipo que provavelmente deu início a dispersão da espécie, no estado do Paraná, a partir do centro de endemismo. O aumento dos números de insetos estudados e a utilização de novos marcadores moleculares poderão aportar informações que reforcem a teoria de origem e dispersão da espécie e fornecer dados que auxiliem no monitoramento epidemiológico da espécie.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Panstrongylus megistus*. Caracterização molecular. DNA ribossomal nuclear. Espaçadores transcritos internos.

ABSTRACT

Chagas' disease or American Trypanosomiasis has the protozoan *Trypanosoma cruzi* as the etiologic agent. The disease is present in most Latin American countries and its control relies mainly on the fight against triatomine vectors. Among the triatomine species found in Brazil, *Panstrongylus megistus* shows a high degree of adaptability to the domestic environment and is considered of great epidemiological importance since *Triatoma infestans* elimination. This work had as the main objective, through the sequencing of nuclear ribosomal DNA markers, the molecular characterization of specimens and populations of *Panstrongylus megistus* from Paraná state. Specimens from other states were also included in this study. From all of the 37 specimens submitted to DNA extraction and sequencing, 32 sequences could be analyzed for two selected markers in question - the first and second internal transcribed spacer (ITS-1 and ITS-2) of nuclear ribosomal DNA. Overall, 24 different haplotypes were identified among the analyzed specimens of *Panstrongylus megistus*, when studied molecular markers ITS-1 and ITS-2 together. The intergenic region length varied between 1357 and 1366 base pairs, with an average of 1361.1 base pairs. The overall length of the alignment for all haplotypes was described with 1366 bp, including insertions/deletions. ITS-1 showed a greater length in its base pairs, as well a greater diversity of haplotypes mainly due to numerous insertions/deletions. Because of this, ITS-2 fragment landed more information for the haplotypes distribution analysis. It was detected a greater number of haplotypes in insects from the first plateau of Paraná. This greater diversity supports the origin and dispersion hypothesis of *Panstrongylus megistus* from 'Mata Atlantica' coastal. At the second plateau was observed only 2 haplotypes, which are coincident with the first plateau. At the third plateau was attended of 4 haplotypes, 3 of them different from others, and only 1 haplotype not found in other states. The CH-2 haplotype was found in all studied Paraná regions, as well as the states of Rio Grande do Sul and Sergipe. This can be appointed, until this moment, as the haplotype that probably began spreading the specie, at Paraná state, from the endemism center. The increase of insects' numbers studied and the use of new molecular markers may get relevant information to reinforce the specie origin and dispersal theory and provide data to assist in epidemiological monitoring of these vectors.

Keywords: Chagas' disease. *Panstrongylus megistus*. Molecular Characterization. Nuclear ribosomal DNA. Internal transcribed spacers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	<i>Panstrongylus megistus</i> BURMEISTER, 1835.....	22
FIGURA 2 –	ESTIMATIVA GLOBAL DA POPULAÇÃO MUNDIAL INFECTADA PELO <i>Trypanosoma cruzi</i> em 2009.....	25
FIGURA 3 –	MAPA DO BRASIL COMPARATIVO MOSTRANDO A DEVASTAÇÃO DA MATA ATLÂNTICA NOS ÚLTIMOS 500 ANOS.....	29
FIGURA 4 –	FRAGMENTO DE DNA RIBOSSOMAL NUCLEAR (DNAr) DO GENOMA EUCARIÓTICO TÍPICO E SEU RNA PRIMÁRIO TRANSCRITO. ETS: ESPAÇADOR TRANSCRITO EXTERNO. SSU: SUBUNIDADE MENOR DO GENE DO RNA RIBOSSOMAL. LSU: SUBUNIDADE MAIOR DO GENE DO RNA RIBOSSOMAL. ITS: ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO.....	32
FIGURA 5 –	LOCALIDADES NO PARANÁ ONDE FORAM COLETADOS TRIATOMÍNEOS <i>Panstrongylus megistus</i>	38
FIGURA 6 –	LOCAIS DE COLETA DE TRIATOMÍNEOS <i>IN SITU</i> NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.....	40
FIGURA 7 –	FOTO POR SATÉLITE INDICANDO O LOCAL DA COLETA EM ALMIRANTE TAMANDARÉ. COORDENADAS VIA GPS: 25°20'23.09"S / 49°18'04.11"O.....	42
FIGURA 8 –	FOTO DO LOCAL ONDE FORAM ENCONTRADOS <i>Panstrongylus megistus</i> EM ALMIRANTE AMANDARÉ.....	42
FIGURA 9 –	FOTO POR SATÉLITE INDICANDO O LOCAL DA COLETA NA CIDADE INDUSTRIAL DE CURITIBA. COORDENADAS VIA GPS: 25°26'35.76"S / 49°22'13.49"O.....	43
FIGURA 10 –	FOTO DO LOCAL ONDE FOI ENCONTRADO <i>Panstrongylus megistus</i> EM CAMPO MAGRO.....	44
FIGURA 11 –	EXTRAÇÃO DA MUSCULATURA DA PERNA DO TRIATOMÍNEO.....	46

FIGURA 12 – ÁRVORE FILOGENÉTICA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA – KIMURA 2-PARÂMETROS PARA O PRIMEIRO ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO (ITS-1) DOS ESPÉCIMES ANALISADOS DE <i>Panstrongylus</i> <i>megistus</i>	58
FIGURA 13 – ÁRVORE FILOGENÉTICA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA – KIMURA 2-PARÂMETROS PARA O SEGUNDO ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO (ITS-2) DOS ESPÉCIMES ANALISADOS DE <i>Panstrongylus</i> <i>megistus</i>	59
FIGURA 14 – ÁRVORE FILOGENÉTICA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA – KIMURA 2-PARÂMETROS PARA O PRIMEIRO E O SEGUNDO ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO (ITS-1 E ITS-2) DOS ESPÉCIMES ANALISADOS DE <i>Panstrongylus megistus</i>	60
FIGURA 15 – MAPA DO BRASIL E DO ESTADO DO PARANÁ INDICANDO A DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DOS FRAGMENTOS NUCLEOTÍDICOS ITS-1 E ITS-2 ANALISADOS DE ESPÉCIMES DE <i>Panstrongylus megistus</i>	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	TRIBOS E GÊNEROS RECONHECIDOS E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ESPÉCIES EM TRIATOMINAE.....	20
TABELA 2 –	ESPÉCIMES, PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA E DATA DE COLETA DOS TRIATOMÍNEOS OBTIDOS. Nº EXEMPLAR = REFERÊNCIA DOS EXEMPLARES ESTUDADOS.....	39
TABELA 3 –	INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES ITS-1 E ITS-2 DO DNAr NUCLEAR DE <i>Panstrongylus megistus</i>	46
TABELA 4 –	PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E COMPRIMENTO (pb) PARA O FRAGMENTO DE ITS-1 DOS HAPLÓTIPOS DE <i>Panstrongylus megistus</i>	50
TABELA 5 –	DIFERENÇAS NUCLEOTÍDICAS ENTRE OS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE <i>Panstrongylus megistus</i> (PM) PARA A REGIÃO INTERGÊNICA DO DNAr NUCLEAR (ITS-1).....	51
TABELA 6 –	PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E COMPRIMENTO PARA O FRAGMENTO DE ITS-2 DOS HAPLÓTIPOS DE <i>Panstrongylus megistus</i>	53
TABELA 7 –	DIFERENÇAS NUCLEOTÍDICAS ENTRE OS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE <i>Panstrongylus megistus</i> PARA A REGIÃO INTERGÊNICA DO DNAr NUCLEAR (ITS-2).....	54
TABELA 8 –	PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E COMPRIMENTO PARA OS FRAGMENTOS DE ITS-1 E ITS-2 DOS HAPLÓTIPOS DE <i>Panstrongylus megistus</i>	56

SUMÁRIO

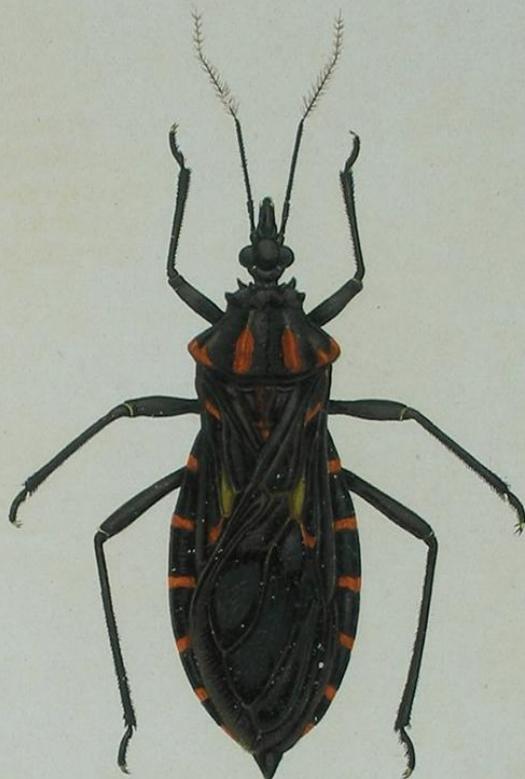
1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Posição sistemática de Triatominae.....	19
1.2	Caracteres morfológicos da subfamília Triatominae.....	20
1.3	Biologia e ecologia de Triatominae.....	21
1.3.1	Aspectos morfológicos e biológicos de <i>Panstrongylus megistus</i>	22
1.4	Distribuição geográfica de Triatominae.....	23
1.5	Importância médica de Triatominae.....	24
1.5.1	Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas.....	24
1.5.2	Controle da Doença de Chagas.....	25
1.6	Triatominae no estado do Paraná.....	26
1.6.1	Histórico da ocupação humana e presença de Triatominae e <i>Trypanosoma cruzi</i> no território paranaense.....	26
1.7	Estudos genéticos de Triatominae.....	30
1.7.1	DNA ribossomal nuclear e espaçadores transcritos internos.....	31
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Objetivo geral.....	36
2.2	Objetivos Específicos.....	36
3	METERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	Procedência dos triatomíneos.....	37
3.1.1	Locais de coleta de triatomíneos <i>in situ</i> da Região Metropolitana de Curitiba (RMC).....	40
3.2	Extração de DNA.....	45
3.3	Amplificação de DNA por PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	46
3.4	Purificação de DNA.....	47
3.5	Sequenciamento de DNA.....	47
3.6	Análises das sequências de DNA.....	48
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Análise das sequências nucleotídicas da região intergênica do DNA ribossomal nuclear incluindo os espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) dos espécimes analisados de <i>Panstrongylus megistus</i>	49
4.2	Análise das sequências nucleotídicas do primeiro espaçador transcrito	49

	interno (ITS-1) do DNA ribossomal nuclear dos espécimes analisados de <i>Panstrongylus megistus</i>	
4.3	Análise das sequências nucleotídicas do segundo espaçador transcrito interno (ITS-2) do DNA ribossomal nuclear de <i>Panstrongylus megistus</i>	52
4.4	Análise conjunta dos resultados das regiões intergênicas do DNA ribossomal nuclear (ITS-1 e ITS-2) dos exemplares analisados de <i>Panstrongylus megistus</i>	55
4.5	Análises filogenéticas.....	57
4.5.1	Análises filogenéticas para a região intergênica do DNA ribossomal nuclear incluindo os espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) dos espécimes de <i>Panstrongylus megistus</i>	57
4.5.2	Distribuição geográfica dos haplótipos de <i>Panstrongylus megistus</i> analisados.....	61
5	DISCUSSÃO	63
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70

Introdução



2

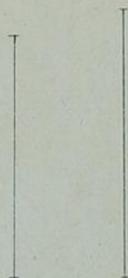


1



3

♂



♀



4

CASRO SILVA
ad. nat. del.



Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. A população do continente americano é amplamente afetada pela doença, sendo endêmica em países da América do Sul, América Central e México, com maior incidência em zonas rurais e populacionais humanas com carências econômicas (GUHL & SCHOFIELD, 1996). Estima-se que trezentos e sessenta milhões de indivíduos vivam nas áreas endêmicas, que cem milhões estejam sujeitos ao risco da infecção e ainda, que entre dezesseis e dezoito milhões de pessoas se apresentam infectados pelo parasito. A Organização Mundial da Saúde (OMS) inclui esta doença como uma das prioridades dentro da lista de doenças tropicais em que, desde o ponto de vista da morbidade, provoca perdas importantes em anos de vida com repercussões sociais e econômicas (WHO, 2002).

A distribuição desta doença está, basicamente, relacionada com a distribuição dos triatomíneos, que são os vetores do parasito, e também associada a problemas econômicos. Os vetores podem ser encontrados desde 40° de latitude norte, nos Estados Unidos, e 45° de latitude sul na Patagônia Argentina, porém esta área de risco de transmissão está condicionada à capacidade vetorial das espécies de triatomíneos (SILVEIRA, 2000).

As tentativas para controlar esta doença sempre foram levadas a cabo de forma isolada, por países ou regiões administrativas, e com resultados pouco significativos. A impossibilidade de eliminar o ciclo silvestre do *T. cruzi*, a existência de uma grande quantidade de reservatório silvestre e doméstico e as más condições das habitações, são alguns dos fatores limitantes para o controle da Doença de Chagas (SILVEIRA *et al.*, 2002). Em 1991 os ministros da saúde da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai criaram uma comissão intergovernamental encarregada de elaborar e executar um plano de ação para a eliminação de *Triatoma infestans* Klug, 1834, principal vetor do *T. cruzi* nesses países (SILVEIRA *et al.*, 2002). Essa iniciativa teve êxito na maioria dos países já que obteve redução ou eliminação da transmissão da Doença de Chagas. Apesar dos significativos resultados do controle da Doença de Chagas alguns estudos apontam para a vigilância epidemiológica constante, pois se verificou a re-colonização de *T. infestans* em determinadas áreas da Argentina (CECERE *et al.*, 2002; VAZQUEZ-PROKOPEC *et al.*, 2004).

Atualmente, o risco de transmissão depende, entre outros fatores, da persistência de focos residuais de *T. infestans* e da ocorrência de outras espécies de triatomíneos silvestres, potencialmente transmissores, que têm ocupado o ambiente domiciliar (DIAS, 1988; RUAS NETO & KRUG, 1995).

Entre as espécies de triatomíneos do Brasil, *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 apresenta uma elevada capacidade de adaptação ao ambiente doméstico. Sua distribuição ao longo do país alia-se à área geográfica com sua presença no ambiente natural ou artificial. Nos estados do sul esta espécie ocorre basicamente em ecótopos silvestres, ao contrário de Minas Gerais, Bahia e algumas áreas da região nordeste, onde é encontrado em ecótopos artificiais, alcançando maior destaque epidemiológico (FORATTINI *et al.*, 1970; FORATTINI, 1980).

1.1 Posição sistemática de Triatominae

Os triatomíneos são insetos pertencentes à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Triatominae é uma das vinte e duas subfamílias da família Reduviidae e difere de outras subfamílias pela combinação de várias características como o hábito hematofágico, a presença de uma membrana flexível conectando o segundo e o terceiro segmento rostral e perda das glândulas odoríferas na região abdominal (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Os triatomíneos são de grande interesse ecológico e clínico. Ecológico, pois constituem um dos poucos grupos de percevejos que se alimentam de sangue de vertebrados e clínico, por serem potenciais vetores do *T. cruzi*, protozoário agente causador da doença de Chagas (SCHAEFER, 2003). Certamente o grupo é digno de estudo considerável; muito do trabalho de Triatominae é resumido nos três volumes de *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas* (CARCAVALLO, JURBERG & LENT, 1999). A subfamília foi taxonomicamente revista por Lent & Wygodzinsky (1979) e, posteriormente, complementada por Carcavallo *et al.* (2000), que apresentaram novas idéias sobre a sistemática e filogenia do grupo (SCHAEFER, 2003).

Atualmente, 140 espécies de triatomíneos existentes são formalmente reconhecidas, embora algumas possam ser não mais do que pequenas variações e estão classificadas em cinco tribos e 15 gêneros (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009) como mostrados na TABELA 1. No entanto, há vários outros acordos propostos, por exemplo, por Carcavallo *et al.* (2000) e Galvão *et al.* (2003). A maioria destas classificações foi baseada em caracteres morfológicos, embora as comparações de caracteres citogenéticos e sequências de DNA genômico, por vezes, têm contestado esta abordagem. Existem várias dificuldades para chegar a uma classificação estável do grupo (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009).

TABELA 1 – TRIBOS E GÊNEROS RECONHECIDOS E SEUS RESPECTIVOS NÚMEROS DE ESPÉCIES EM TRIATOMINAE.

Tribo	Gênero	Número de espécies
Alberproseniini	<i>Alberprosenia</i>	2
Bolboderini	<i>Belminus</i>	8
	<i>Bolbodera</i>	1
	<i>Microtriatoma</i>	2
	<i>Parabelminus</i>	2
	<i>Cavernicola</i>	2
Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>	2
Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	3
	<i>Rhodnius</i>	16
Triatomini	<i>Dipetalogaster</i>	1
	<i>Eratyrus</i>	2
	<i>Hermanlenticia</i>	1
	<i>Linshcosteus</i>	6
	<i>Panstrongylus</i>	13
	<i>Paratriatoma</i>	1
	<i>Triatoma</i>	80

FONTE: SCHOFIELD & GALVÃO (2009).

1.2 Caracteres morfológicos da subfamília Triatominae

A morfologia externa dos adultos é descrita em termos gerais para explicar os princípios da sistemática de Triatominae (DUJARDIN, SCHOFIELD & PANZERA, 2000). Os Triatominae são insetos hemípteros reduviídeos com o corpo dividido em três grandes regiões: a cabeça, o tórax e o abdômen, podendo, cada uma delas, ser estudada em vista dorsal, ventral ou lateral (CARCAVALLO, JURBERG & LENT, 1999). Sua estrutura corporal não difere significativamente da maioria dos indivíduos pertencentes às demais subfamílias (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Os principais caracteres capazes de diferenciar os Triatominae de outras subfamílias basicamente incluem a inserção lateral das antenas na cabeça, um rostro curto e reto não ultrapassando o primeiro par de pernas, a ausência do sulco interocular desenvolvido e de glândulas odoríferas na região dorsal do abdômen, a presença de uma membrana flexível conectando o segundo e o terceiro segmento rostral, e o fato dos Triatominae possuírem hábito hematofágico (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

1.3 Biologia e ecologia de Triatominae

O ciclo de vida de Triatominae é do tipo hemimetábolo¹, passando desde ovo, ninfas de primeiro, segundo, terceiro, quarto e quinto estádios até a emergência de adultos. Em média, a duração do ciclo é de alguns meses (*Rhodnius prolixus* Stal, 1859) até um a dois anos (*Triatoma dimidiata* Latreille, 1811, *Panstrongylus megistus*, *Dipetalogaster maxima* Uhler, 1894). O tempo de vida de um adulto pode ultrapassar os dois anos (DUJARDIN, SCHOFIELD & PANZERA, 2002). Como hematófagos obrigatórios, necessitam se alimentar de sangue para trocar de um estágio evolutivo para outro. Na fase adulta, tanto macho quanto fêmea se alimentam de sangue (LENT & WYGODZINSKY, 1979), o que aumenta o potencial de transmissão do *T. cruzi*.

Do ponto de vista epidemiológico é importante conhecer os habitats dos triatomíneos visto que cada espécie está relacionada com algumas condições ambientais específicas. Além disso, sua importância como vetor do *T. cruzi* está condicionada, em sua maioria, à condição das habitações humanas, ou infestações de casas, currais, galinheiros, bem como pilhas de lenha e outros locais próximos ao habitat do ser humano (CARCAVALLO, JURBERG & LENT, 1999). Esses insetos podem ser encontrados em ambientes: a) silvestre - como palmeiras, troncos de árvores, ninhos de pássaros, marsupiais, roedores, canídeos, felídeos, que também funcionam como fontes alimentares e mantêm o ciclo silvestre do *T. cruzi*; b) peridomiciliar - como galinheiros, currais, chiqueiros, e utilizam como fonte alimentar animais domésticos e silvestres que se aproximam das moradias; e c) domiciliar - encontrados no interior das moradias humanas, tendo os seres humanos e os mamíferos domésticos como fontes alimentares (MORENO & CARCAVALLO, 1999).

¹ insetos que, quando da eclosão do ovo, nascem diferentes dos adultos mas sofrem transformações graduais na forma e na sua fisiologia. As formas jovens são chamadas ninfas e, à medida que sofrem ecdises, vão se tornando cada vez mais parecidas com o adulto.

1.3.1 Aspectos morfológicos e biológicos de *Panstrongylus megistus*

Entre as espécies de triatomíneos, *P. megistus* se destaca por sua elevada importância epidemiológica como agente transmissor do *T. cruzi*. Tanto que foi apontado por Carlos Chagas (1909) como vetor transmissor do primeiro caso diagnosticado dessa parasitose.

O inseto se caracteriza pela coloração geral negra com manchas vermelhas ou alaranjadas (FIGURA 1). Ainda, apresentam o terceiro artícuo antenal menor que o segundo e lobo posterior com 4 manchas vermelhas (CARCAVALLO, JURBERG & LENT, 1999).



FIGURA 1 – *Panstrongylus megistus*, BURMEISTER, 1835.
FONTE: O AUTOR (2011).

Segundo Pessoa (1962), *P. megistus* é considerada uma espécie semi-doméstica, tendo em vista o fato de que no Sul do país coloniza apenas biótopos naturais (ambiente essencialmente florestal). Já na cidade de Salvador-BA e no estado de Minas Gerais coloniza somente biótopos artificiais (habitações humanas e seus anexos). Em outras regiões, como o nordeste do Brasil, está presente em ambientes naturais e artificiais. Nesse contexto, *P. megistus* é encontrado em todas as regiões brasileiras, com exceção da floresta amazônica (ARAGÃO, 1961).

Os hábitos domiciliar e silvestre estão delimitados por uma linha hipotética que percorre o Norte e Nordeste do estado de São Paulo. Acima dessa linha encontram-se predominantemente triatomíneos de hábito domiciliar e, ao sul, de hábito silvestre. Essa demarcação geográfica é elucidada pela diversidade climática, onde, ao norte desse limite, o verão é chuvoso e o inverno é seco, de modo que, ao sul, sob a influência da frente polar atlântica, o inverno é chuvoso (FORATTINI *et al.*, 1970).

As espécies domiciliadas de triatomíneos, quando em seu ambiente natural, possuem fonte alimentar diversa, porém, com preferência por sangue de mamíferos (ARAGÃO, 1981). Essa afirmação é aplicada para *P. megistus* (FORATTINI *et al.*, 1977).

1.4 Distribuição geográfica de Triatominae

A importância da distribuição geográfica dos triatomíneos está relacionada tanto com os aspectos de sua biologia e biogeografia como com a sua importância como vetores do *T. cruzi* (GALVÃO *et al.*, 1998).

“A dispersão do Trypanosoma cruzi é bastante ampla no continente americano, particularmente a enzootia silvestre, que se estende desde a latitude de 42° N, nos Estados Unidos, até o paralelo 49° S nas regiões meridionais do Chile e da Argentina, incluindo as Guianas e o Caribe” (COURA, 2003).

No Brasil, 58 espécies de triatomíneos são descritas e dessas, 27 ocorrem no Nordeste. Algumas delas com grande capacidade de dispersão: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *Triatoma vitticeps* Stal, 1859, *Triatoma sordida* Stal, 1859, *Triatoma rubrofasciata* De Geer, 1773, *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 e *Rhodnius prolixus* (DIAS, 2000).

1.5 Importância médica de Triatominae

Carlos Chagas, médico sanitário brasileiro, foi quem observou pela primeira vez a enorme quantidade de protozoários flagelados presente no interior de intestinos de insetos hematófagos (*P. megistus*). Em 1909, ele detectou esse protozoário no sangue de uma criança doente, associando o agente causal, o quadro clínico relacionado e o vetor responsável pela transmissão. O parasito flagelado foi denominado, por Carlos Chagas, de *Trypanosoma cruzi* (ELLIZARI, 1999).

A principal importância médica, para a transmissão da doença, é o comportamento que os triatomíneos vetores apresentam de defecar durante ou imediatamente após a alimentação sanguínea, onde depositam suas fezes contaminadas com o *T. cruzi* sobre a pele ou a região facial (olhos, nariz e boca). Ao coçar e/ou esfregar a mucosa ou local da picada as formas infectantes do parasito são introduzidas no organismo, e posteriormente, na corrente circulatória do hospedeiro (TARTAROTTI, AZEREDO-OLIVEIRA & CERON, 2004). Sete espécies podem ser capazes de colonizar habitações humanas nas Américas sendo importantes na transmissão do *T. cruzi*: *Rhodnius prolixus*, *Rhodnius pallescens* Barber, 1932, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* (WHO, 2007).

1.5.1 Aspectos epidemiológicos da Doença de Chagas

A população do continente americano é a principal afetada pela doença, sendo endêmica em países da América do Sul, América Central e México (GUHL & SCHOFIELD, 1996) (FIGURA 2). Estima-se que trezentos e sessenta milhões de indivíduos vivam nas áreas endêmicas, que cem milhões estejam sujeitos ao risco da infecção e ainda, que entre dezesseis e dezoito milhões de pessoas se apresentam infectados pelo parasita (WHO, 2002).

A principal forma de infecção humana é através das fezes contaminadas dos triatomíneos vetores, silvestres e domésticos, porém não é a única forma de se transmitir a doença (WHO, 2002). Schmunis & Yadon (2009) revisaram, através de informações disponíveis, dados sobre o número de imigrantes de dezessete países

latino-americanos endêmicos para *T. cruzi* e estimaram o número de indivíduos possivelmente infectados pelo *T. cruzi* em países não endêmicos, através de bancos de sangue, transplante de órgãos e infecções congênitas. Os países com maior número estimado de imigrantes infectados foram Itália com 5185 indivíduos, Alemanha com 2225, Portugal com 1617 e Reino Unido 1373.

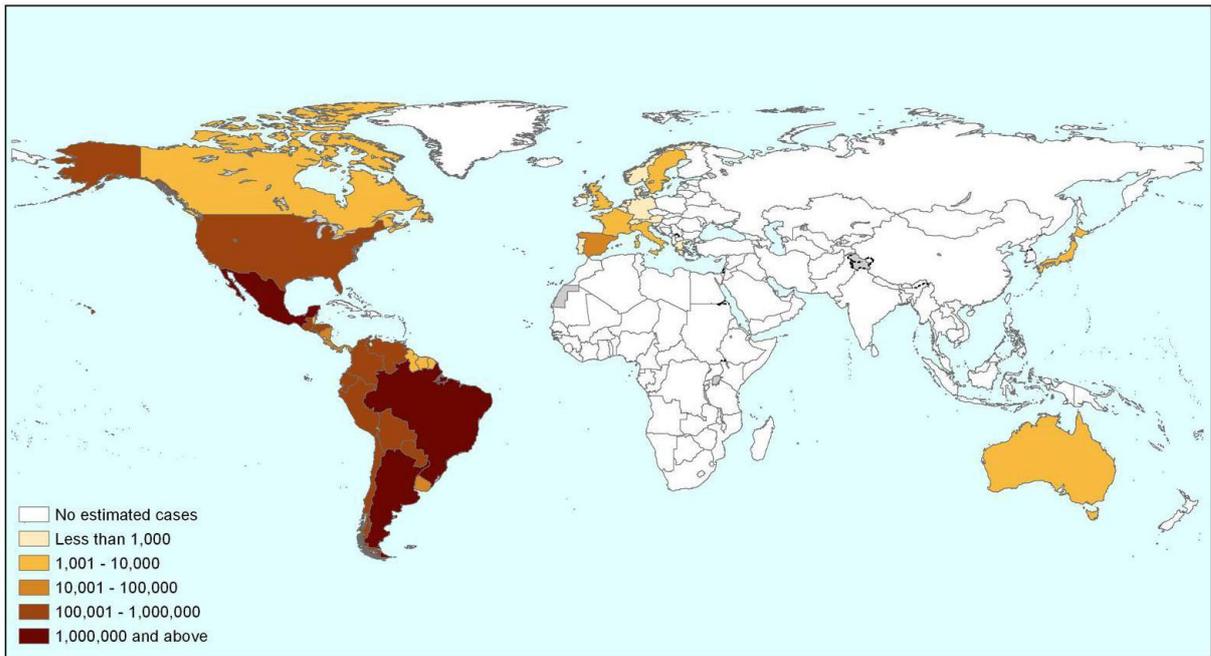


FIGURA 2 – ESTIMATIVA GLOBAL DA POPULAÇÃO MUNDIAL INFECTADA PELO *Trypanosoma cruzi* em 2009.

FONTE: <http://www.chagas-rompe-el-silencio.com/mainchallenges.html>.

1.5.2 Controle da Doença de Chagas

Atualmente não existe vacina que previna a infecção ou mesmo algum eficiente quimioterápico que atue na fase crônica da doença. Medicamentos como Benznidazol (Rochagan®) e Nifurtimox (Lampit®) são os únicos fármacos disponíveis para o tratamento, os quais são limitados ao estágio agudo da doença (SCHOFIELD & KABAYO, 2008).

O controle da doença depende principalmente da eliminação de populações de vetores domésticos pela pulverização de casas infestadas com inseticidas residuais. A fim de aperfeiçoar o controle desses vetores, é necessário conhecer a

estrutura da população de triatomíneos e a identificação exata da principal espécie vetora (MONTEIRO, ESCALANTE & BEARD, 2001).

Além da prevenção da transmissão do *T. cruzi* através de seus dois principais mecanismos (vetorial e transfusional) deve-se promover atenção e cuidados médicos e sociais para todos os infectados, como forma complementar secundária de combate a doença (GUHL, PINTO & AGUILERA, 2009).

O elemento-chave para o sucesso de programas nacionais e regionais é a continuidade da ação do combate a doença. Há registros de falhas e reversões em programas que começaram bem, mas que não tiveram força ou perderam a prioridade deixando de serem consolidados e/ou mantidos (SILVEIRA & REZENDE, 1984).

Ao definir prioridades para o controle da transmissão vetorial da Doença de Chagas é de suma importância ter instrumentos decisórios que visam atingir os objetivos propostos nos programas de controle, e assim, permitir que as autoridades de saúde tomem as devidas medidas, racionalizem os recursos gastos para as atividades de controle vetorial e que a ação seja baseada em evidências (SILVEIRA, 2003; OPS, 2004).

1.6 Triatominae no estado do Paraná

1.6.1 Histórico da ocupação humana e presença de Triatominae e *Trypanosoma cruzi* no território paranaense

A fundação das primeiras cidades do Paraná, Paranaguá (no litoral) e Curitiba (no primeiro planalto), data do século XVII, quando o estado passou a pertencer à Coroa Portuguesa. Durante os dois séculos seguintes a ocupação do território foi lenta e esparsa. No início do século XX, dois terços do território do Paraná ainda se encontravam praticamente despovoados, com imensas florestas cobrindo seus solos férteis. As atividades econômicas eram centradas na agricultura de subsistência dominada pela grande propriedade. Pouco a pouco o comércio e o arrendamento das terras a favor dos rebanhos vindos do extremo sul do país foram substituídos

pela agricultura. Assim ocorreu a multiplicação das cidades e vilarejos ao longo do estado (SWAIN, 1988).

Desta forma, apareceram as mais antigas cidades do Paraná: Palmas, Lapa, Ponta Grossa, Castro, Jaguariaíva, Guarapuava, situadas nos segundo e terceiro planaltos. A exploração da erva-mate tornou-se uma das principais atividades e o comércio do mate funcionou como pólo dinâmico da economia durante mais de um século, favorecendo o povoamento, a criação de cidades e de riquezas (TAVARES, 1972).

A partir de 1920 o povoamento se intensificou e fez com que as regiões Norte e Sudoeste se transformassem em verdadeiras zonas pioneiras por apresentarem fluxo regular de imigração - pela aceleração do desmatamento, pela forte taxa de ocupação do solo destinado à agricultura e abertura de estradas, e também pela criação de vilarejos e cidades ligadas entre si (BALHANA, MACHADO & WESTPHALEN, 1969).

Entre 1920 e 1960 a população teve um crescimento de 80%, favorecido pela ação conjugada do governo e da iniciativa privada. Nos anos 60, dos 1.236.276 habitantes recenseados, mais de 75% pertenciam ao setor rural. Assim, o estado, rapidamente povoado, ampliou suas atividades, porém concentrou seus esforços na expansão da agricultura. As florestas de pinheiros cederam seu lugar ao café, milho e feijão e o Paraná se tornou o celeiro do Brasil (SWAIN, 1988).

Durante a década de sessenta, um quadro de agitações e transformações radicais nas áreas política, econômica e social, afetou o Paraná, gerando diversas consequências. O desemprego atingiu a população rural, seguido da erradicação do café e da mecanização acelerada, e desta forma mudou a distribuição da mão-de-obra nas explorações agrícolas. Os trabalhadores rurais, privados de seus empregos, retornaram às propriedades familiares. Como consequência, ocorreu o empobrecimento dessas explorações e seu desmembramento. A produção dos excedentes alimentares foi afetada e as pequenas propriedades familiares tornaram-se super povoadas (SWAIN, 1988). Rondônia tornou-se o centro de acolhida dos migrantes vindos do Paraná, onde a obtenção de um lote de terras foi possível, seja pela distribuição de terras públicas em zonas de colonização oficial, compra de lotes a preços relativamente baixos ou à invasão pura e simples das terras (SWAIN, 1988).

Em face do crescimento rápido da demanda de terras, os projetos de colonização integrados dotados de infra-estrutura de transporte e de rede de comercialização, foram pouco a pouco substituídos pela instalação precária de migrantes em regiões da floresta amazônica (KOHLHEPP, 2002). As dificuldades encontradas pelos migrantes se agravaram pelo clima extenuante e doenças tropicais.

A mesma beleza tropical que encantou os europeus que aqui chegaram durante o século XVI atiçou a cobiça que, desde então, não parou de destruir os biomas brasileiros. O primeiro e mais dramático foco de impactos foi a Mata Atlântica, uma das cinco mais importantes regiões do planeta de grande biodiversidade que se encontra sob séria ameaça. A Mata Atlântica é uma floresta pluvial tropical com clima quente e úmido devido à proximidade com o oceano. Originalmente essa floresta ocupava toda a faixa litorânea do Brasil, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul. Sua biodiversidade é considerada a mais rica das apresentadas em florestas tropicais, pois possui um extraordinário número de espécies endêmicas, ou seja, que são encontradas apenas nesse bioma. Apesar de sua vasta biodiversidade, a situação da Mata Atlântica é extremamente grave, pois restam apenas menos de 7% de sua área original, o que a torna o bioma mais devastado e ameaçado do país (FIGURA 3). A mata foi dizimada ao longo de cinco séculos de ocupação, primeiro com a exploração do pau-brasil, posteriormente pelo plantio de cana-de-açúcar e café e, hoje em dia, pela intensa ocupação urbana. Na região que foi originalmente ocupada pela Mata Atlântica, existem as maiores cidades brasileiras, que, por sua vez, dependem do que restaram da mata para preservar seus mananciais (<http://marcosbau.com/geobrasil-2/biomas-brasileiros/>).



FIGURA 3 – MAPA DO BRASIL COMPARATIVO MOSTRANDO A DEVASTAÇÃO DA MATA ATLÂNTICA NOS ÚLTIMOS 500 ANOS.
 FONTE: (<http://marcosbau.com/geobrasil-2/biomas-brasileiros/>).

A Tripanosomíase Americana está presente há muitos séculos no ambiente silvestre do Continente Americano. Entretanto, passou a afetar o ser humano de forma particular, em ambiente doméstico, por consequência de migrações humanas, invasão do ambiente natural e diversas ações de caráter antrópico (DIAS & COURA, 1997). Após a devastação florestal o ser humano passou a fazer parte do ciclo do *T. cruzi*, que circulava até então entre vetores e mamíferos de seu ambiente natural. Além disso, ao residir em casas mal construídas e em estado precário, possibilitou que muitas espécies de triatomíneos se adaptassem ao domicílio, tornando essa condição primordial para que ocorresse a transmissão da Doença de Chagas (VINHAES & DIAS, 2000).

O primeiro encontro de *P. megistus* naturalmente infectado pelo *T. cruzi* foi registrado em 1917 no município de Jataí, as margens do rio Tibagi no norte do estado do Paraná. No mesmo período, foi também encontrado o *T. sordida*, na região de Foz do Iguaçu (LOBO, BORBA & SOUZA, 1953; SIMÕES, 1943; SOUZA-ARAÚJO, 1954). Em 1921 e 1936 *P. megistus* foi detectado no Município de

Araucária (LUZ, 1976; FERREIRA, 1968), e em 1940 em Curitiba (COSTA, 1940). O encontro de *T. infestans* aconteceu em 1941, no município de Piraquara. Em 1954, foi descrita a ampla distribuição geográfica e domiciliação de *T. infestans* no estado do Paraná (SOUZA-ARAÚJO, 1954). Em 1976 foram relatadas novas espécies de triatomíneos no território paranaense com o registro de *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, *T. rubrovaria* e *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1926, e em 1969 é assinalado *Triatoma tibiamaculata* Pinto, 1926 (LUZ & BORBA, 1966, MOURA *et al.*, 1969).

No período de 1975 a 1983 foram realizadas pesquisas de triatomíneos domiciliados e peridomiciliados em 19 unidades estaduais brasileiras, através das operações do Programa de Combate a Doença de Chagas da Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM/MS). No estado do Paraná foram encontrados triatomíneos em 131 municípios, sendo *P. megistus* em 104, *T. infestans* em 90, *T. sordida* em 62, *P. geniculatus* em 8 e *R. neglectus* em 1 (SILVEIRA, FEITOSA & BORGES, 1984).

Mesmo com o encontro de várias espécies de triatomíneos, a preocupação maior incidiu sobre o *T. infestans* por tratar-se, até então, do único triatomíneo domiciliado no Paraná, e que hoje se encontra erradicado. Atualmente *P. megistus* é a espécie mais frequentemente encontrada no estado, porém pouco se conhece sobre seu comportamento, diversidade biológica, distribuição e seu papel na transmissão do *T. cruzi* no Paraná.

1.7 Estudos genéticos de Triatominae

Os triatomíneos estão classificados em cinco tribos: Triatomini, Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini e Alberprosenini. Com a exceção de Triatomini, todos são considerados grupos monofiléticos, ou seja, que cada tribo possui um ancestral comum, tendo como base seus caracteres morfológicos. No entanto, a tribo Triatomini é provavelmente um grupo parafilético, com vários ancestrais dando origem a essa tribo (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

Gorla *et al.* (1997) dizem que os triatomíneos são polifiléticos² em sua origem e acredita que a hematofagia apareceu recentemente, associada com a evolução dos vertebrados. A hipótese polifilética sugere que os passos adaptativos da vida livre predatória para a alimentação hematofágica podem ter acontecido várias vezes, não apenas dentro de diferentes grupos do Reduviidae, mas também dentro do próprio grupo Hemiptera.

Estudos sistemáticos foram aprimorados com o advento da biologia molecular, podendo não somente comparar os fenótipos dos organismos, mas também as sequências nucleotídicas de seu DNA (FUTUYMA, 1992). Técnicas moleculares como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (GARCÍA *et al.*, 1998; PACHECO *et al.*, 2003), sequenciamento 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; SAINZ *et al.*, 2004) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (JUSTINO, 2004) têm sido usadas para resolver algumas questões.

Recentes pesquisas com marcadores moleculares em triatomíneos tentam compreender a ancestralidade do grupo. O sequenciamento de fragmentos de genes selecionados permite a avaliação direta de polimorfismos³ 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 velocidades 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 *taxa*⁴ mais divergentes (ABAD-FRANCH & MONTEIRO, 2005).

1.7.1 DNA ribossomal nuclear e espaçadores transcritos internos

Estudos filogenéticos em variados níveis taxonômicos de triatomíneos têm sido realizados e demonstraram que a região intergênica do primeiro espaçador

² grupo que não inclui o ancestral comum de todos os indivíduos. É a reunião de dois ou mais grupos monofiléticos; aquele em que seus integrantes possuem vários ancestrais comuns, um em cada grupo.

³ variações no número e no tipo de mutações estáveis do DNA.

⁴ plural de *taxon*

transcrito interno (ITS-1) é importante para se encontrar associações de *taxon*⁵ as quais evoluíram há menos de 50 milhões de anos. A região intergênica do segundo espaçador transcrito interno (ITS-2) apresenta-se mais conservada, sendo adequada ao estudo de *taxa* mais distantes evolutivamente (DIOTAIUTI *et al.*, 2008). A FIGURA 4 mostra esquematicamente as regiões do DNA ribossomal nuclear incluindo seus espaçadores.

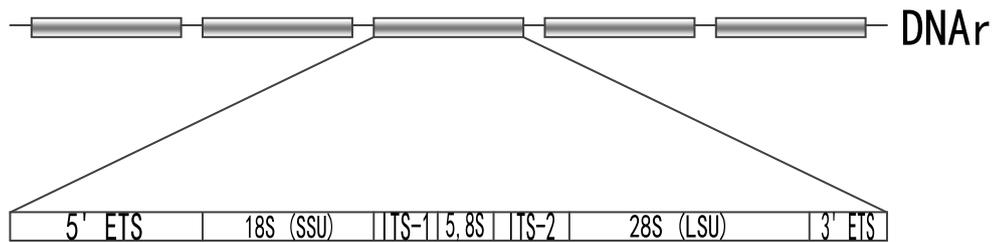


FIGURA 4 – FRAGMENTO DE DNA RIBOSSOMAL NUCLEAR (DNAr), DO GENOMA EUCARIÓTICO TÍPICO E SEU RNA PRIMÁRIO TRANSCRITO. ETS: ESPAÇADOR TRANSCRITO EXTERNO; SSU: SUBUNIDADE MENOR DO GENE DO RNA RIBOSSOMAL; LSU: SUBUNIDADE MAIOR DO GENE DO RNA RIBOSSOMAL; ITS: ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO.

FONTE: ADAPTADO DE COLEMAN (2003).

Marcilla *et al.* (2000) analisaram as sequências nucleotídicas completas de ITS-2 do DNAr, de 7 populações de *T. infestans* do Paraguai. Seu comprimento foi de 458 pb, muito semelhante a outras espécies da tribo Triatomini. Todos os insetos paraguaios exibiram uma sequência nucleotídica idêntica, com um conteúdo adenina (A) mais timina (T) (A+T) de 78%. Quando comparados com o ITS-2 de *T. infestans* da Bolívia, 6 foram identificados com diferenças: 2 transversões⁶ e 4 nucleotídeos adicionais resultantes de um alongamento de microssatélites⁷ (AT). Os dados obtidos sugerem uma divergência evolutiva⁸ entre as populações de *T. infestans* da Bolívia e do Paraguai, como consequência de uma separação espaço-tempo entre eles. Os

⁵ unidade taxonomica, essencialmente associada a um sistema de classificação científica. No plural *taxa* (em latim) podem estar em qualquer nível de um sistema de classificação: um reino é um *taxon*, assim como um gênero é um *taxon*, assim também como uma espécie é um *taxon* ou qualquer outra unidade de um sistema de classificação dos seres vivos.

⁶ processo químico em que uma purina sofre mutação e se torna uma pirimidina, ou vice-versa.

⁷ classe de DNA repetitivo presente no genoma dos eucariontes. Sequência de DNA que contém unidades (motivos) que se repetem em tandem: os motivos variam de 2 a 6 pb. Cada repetição em tandem se constitui em um loco de microssatélite cujos alelos se diferenciam por variações no tamanho total do microssatélite. São co-dominantes, multialélicos e de distribuição ampla no genoma; por isso são usados como marcadores em estudos de populações e mapeamento.

⁸ ocorre quando duas ou mais características biológicas tem uma origem evolutiva comum, mas que divergiram ao longo do tempo.

autores consideraram que, por essa espécie ser originária da Bolívia, as diferenças genéticas observadas entre as populações bolivianas e paraguaias e a ausência de movimentos migratórios humanos entre a Bolívia e Paraguai, faz com que a introdução direta pela Bolívia seja improvável, de modo que a forma indireta através da Argentina e / ou o Brasil seja mais plausível.

A comparação de sequências e parcimônia⁹, distância¹⁰ e máxima verossimilhança¹¹ indicam que ITS-2 é um marcador útil para resolver relações supraespecíficas, específicas, subespecíficas, e até mesmo ao nível de população em Triatominae (MARCILLA *et al.*, 2001).

Estudos realizados em insetos provenientes da Bolívia, Paraguai, Brasil, México, Honduras, Equador, Nicarágua apresentaram resultados significativamente diferentes entre as espécies de Triatomini e Rhodniini, sugerindo polifilia. As árvores filogenéticas mostraram uma divergência antiga entre Triatomini da América do Sul e América do Norte e Central e também a baixa variação da sequência nucleotídica entre as espécies do complexo *phyllosoma* sugere que um *ranking* subespecífico seria mais adequado. Nesse mesmo trabalho, *T. dimidiata* prova ser uma espécie claramente diferenciada, com diversas populações evidenciando uma variação clinal¹² por todo o eixo norte-sul e uma população de Yucatan apresentando diferenças consistentes com *status* específico (MARCILLA *et al.*, 2001).

Bargues *et al.* (2002) concluíram que análises de sequências nucleotídicas completas dos genes nucleares (RNAr) e de espaçadores internos podem fornecer informações significativas nos níveis de *taxa* superiores, gêneros, espécies, subespécies, híbridos e populações de Triatominae. Nesse trabalho, os autores revisaram brevemente as contribuições de estudos sobre o 18S de evolução lenta ou a subunidade menor (SSU) do gene do RNAr e o segundo espaçador transcrito interno (ITS-2) de evolução rápida. Também concluíram que o gene 18S é um

⁹ conceito utilizado na sistemática moderna que estabelece que ao construir e selecionar árvores filogenéticas, ou seja, os clados, o melhor critério é baseado em seus princípios: normalmente é correto o relacionamento mais simples encontrado entre dois indivíduos, aquele que apresente o menor número de passos intermediários ou mudanças evolucionárias.

¹⁰ medida da diferença de material genético entre diferentes espécies ou indivíduos da mesma espécie ou não.

¹¹ método para estimar os parâmetros de um modelo estatístico de maneira a maximizar a probabilidade dos dados observados (isto é, busca parâmetros que maximizem a função de verossimilhança).

¹² mudança gradual em um fenótipo (traço, caráter, feição) através do alcance de distribuição de uma espécie ou população, normalmente relacionada com uma transição geográfica ou ambiental. O termo foi criado pelo biólogo e humanista inglês Julian Huxley em 1938.

marcador útil para as relações supraespecíficas em Triatominae e que ITS-2 é complementar a ele, permitindo a resolução em nível específico e intraespecífico. Os autores terminam a revisão dizendo que “*todas as evidências sugerem que ITS-2 passará a ser o marcador de DNA de excelência para estudos de triatomíneos em níveis peculiares das espécies e subespécies, como é em outros grupos de organismos.*”

Marcilla *et al.* (2002) analisaram as sequências de ITS-2 de diferentes espécies do gênero *Panstrongylus* encontrados no Brasil, Equador, Colômbia e Peru e concluíram que as sequências nucleotídicas de *P. megistus* apareceram mais homogêneas quando comparadas com as de *Panstrongylus rufotuberculatus* Champion, 1899 e *P. geniculatus*. Vários microssatélites dinucleotídeos foram detectados nas sequências obtidas. Muitos deles apresentaram um número diferente de repetições em diferentes populações o que pode ser útil para a diferenciação das populações e análises dinâmicas. As sequências de *Panstrongylus lignarius* Walker, 1873 (silvestre), e *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 (vetor principal no Peru) foram idênticas. Além disso, análises intragenéricas mostraram clara separação de *P. rufotuberculatus*, com relações mais próximas entre *P. geniculatus* e *Panstrongylus chinai* Del Ponte, 1929 e *P. megistus* ocupando uma rama separada e também, as distâncias genéticas entre as espécies de *Panstrongylus* foram maiores do que aquelas entre *Panstrongylus* e outros Triatomini. A distância entre *P. megistus* e *P. lignarius/ herreri* foi a maior registrada até agora na tribo.

Em seu estudo, Bargues *et al.* (2006) encontraram 10 haplótipos para ITS-2 e 7 para ITS-1 em diferentes espécies do complexo *infestans* de 7 países da América do Sul. A variabilidade nucleotídica de ITS-2 intra-específica total detectada em *T. infestans* é a mais alta conhecida até agora em triatomíneos. Minissatélites¹³ de ITS-1, detectado pela primeira vez em triatomíneos, mostraram-se homólogos, sendo marcadores úteis. Apesar das espécies apresentarem o mesmo número de cromossomos (22), uma grande variação do conteúdo de DNA haplóide foi encontrada, incluindo uma diferença alta no conteúdo de DNA entre os insetos andinos e os não-andinos de *T. infestans*. As árvores filogenéticas mostraram um ancestral comum para o *T. infestans* e *Triatoma platensis* Neiva, 1913, uma origem

¹³ classe de DNA repetitivo presente no genoma dos eucariontes. Sequência de DNA que contém unidades (motivos) que se repetem em tandem: os motivos variam de 10 a 100 pb. Cada repetição em tandem se constitui em um loco de minissatélite cujos alelos se diferenciam por variações no tamanho total do minissatélite

de *T. infestans* no altiplano boliviano e duas linhas de dispersão diferentes, uma na região andina da Bolívia e do Peru e outra na planície não-andina do Chile, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil.

Pacheco *et al.* (2007) realizaram a análise fenética¹⁴ baseada em perfis de RAPD de espécimes de *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 capturados no Brasil, Argentina e Uruguai e mostraram 3 grupos distintos divergentes dos coeficientes de similaridade. A variabilidade da sequência do ITS-1 e ITS-2 pode ser considerada muito alta, sugerindo isolamento reprodutivo¹⁵ entre as populações. Nesse estudo, um total de 7 haplótipos foi encontrado, entre os quais 3 são específicos para o Brasil, outros 3 para o Uruguai, e o último comum para os 3 países estudados. A população estudada na Argentina não representa um haplótipo independente. Além disso, análises das sequências mostraram que as 5 populações estudadas são facilmente diferenciáveis e que há heterogeneidade dentro de cada uma. A grande variação intra-específica detectada pode ser a base da maleabilidade conhecida de *T. rubrovaria*, tornando-a um potencial invasor intradomiciliar e, conseqüentemente, um vetor apropriado para a transmissão da doença de Chagas.

Até 2008 a maior análise interpopulacional realizada em espécies de triatomíneos foi desenvolvida por Bargues *et al.* (2008) que analisaram a variabilidade intra-específica, os perfis haplotípicos, a filogeografia e o polimorfismo genético das populações de *T. dimidiata*. Nesse estudo, utilizando o ITS-2, foi possível estabelecer os limites de divergência nucleotídica entre *taxa* dentro da linhagem do gênero *Triatoma*.

¹⁴ tentativa de classificar os organismos com base na similaridade geral, geralmente em morfologia ou outras características observáveis, independentemente de sua filogenia, ou relação evolutiva.

¹⁵ condição biológica ou geográfica que pode levar a diferenciação e especiação, por não permitir o cruzamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral, mediante o sequenciamento de marcadores de DNA ribossomal nuclear, a caracterização molecular de *Panstrongylus megistus* do Estado do Paraná.

2.2 Objetivos Específicos

- Ampliar as informações moleculares em Triatominae;
- Caracterizar molecularmente diferentes populações de *Panstrongylus megistus* da região em questão;
- Fornecer informações moleculares para ampliar a discussão sobre a origem e dispersão da espécie;
- Aportar informações, à Secretaria de Saúde do estado do Paraná e à comunidade científica, para o devido o controle de *Panstrongylus megistus*;
- Inferir as relações filogenéticas entre *Panstrongylus megistus* do estado do Paraná e de outros estados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Procedência dos triatomíneos

Para o estudo das regiões intergênicas do DNA ribossomal nuclear, (ITS-1 e ITS-2), foram processados e analisados insetos do gênero *Panstrongylus* do estado do Paraná e outros estados brasileiros.

Alguns dos exemplares referentes ao estado em questão foram coletados pela equipe do Laboratório de Entomologia Médica, do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, associada ao projeto. Os demais foram cedidos pela Secretaria do Estado de Saúde do Paraná. Com relação aos insetos provenientes de outros estados, os mesmos foram enviados gentilmente pelo Prof. Dr. João Aristeu, responsável pelo Insetário do Serviço Especial de Saúde de Araraquara/SP e também pelo Prof. Dr. Rogério Luiz Kopp, do departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná.

Foram submetidos ao estudo 37 espécimes de *Panstrongylus megistus* de 18 localidades do estado do Paraná e de 6 outros estados brasileiros (Rio Grande do Sul, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Sergipe e Goiás) (TABELA 2). A foto por satélite do estado do Paraná mostra a distribuição dos municípios de onde provieram esses triatomíneos (FIGURA 5).



FIGURA 5 – LOCALIDADES NO PARANÁ ONDE FORAM COLETADOS TRIATOMÍNEOS *Paratrypanus megistus*.
 FONTE: GOOGLE EARTH (2011).

TABELA 2 – ESPÉCIMES, PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA E DATA DE COLETA DOS TRIATOMÍNEOS OBTIDOS. Nº EXEMPLAR = REFERÊNCIA DOS EXEMPLARES ESTUDADOS.

<i>Panstrongylus megistus</i> (PM)			
Nº exemplar	Procedência	Data Coleta	Região
PM1	Almirante Tamandaré	Fev/2011	Grande Curitiba – PR
PM2	Goioxim	Mar/2011	Centro-Sul - PR
PM3	Siqueira Campos	Mar/2011	Norte Pioneiro - PR
PM4	Wenceslau Braz	Nov/2010	Norte Pioneiro - PR
PM5	Castro	Fev/2011	Centro Oriental - PR
PM6	Rio Azul	Mar/2011	Sudeste - PR
PM7	Rebouças	Mar/2011	Sudeste - PR
PM8	Santana do Itararé	Mar/2011	Norte Pioneiro - PR
PM9	Tomazina	Mar/2011	Norte Pioneiro - PR
PM10	Campo Magro	Fev/2011	Grande Curitiba – PR
PM11	Bacacheri	Abr/2011	Bairro de Curitiba - PR
PM12	Nova Aurora	Jul/2011	Oeste - PR
PM13	Santana do Itararé	Mai/2011	Norte Pioneiro - PR
PM14	Prudentópolis	Mai/2011	Sudeste - PR
PM15	Prudentópolis	Mai/2011	Sudeste - PR
PM16	Arapongas	Fev/1999	Norte Central – PR
PM17	Arapongas	Jun/1999	Norte Central – PR
PM18	Rio Branco do Sul	Fev/2000	Grande Curitiba – PR
PM19	Rio Branco do Sul	Fev/2000	Grande Curitiba – PR
PM20	Piraquara	Jan/2000	Grande Curitiba – PR
PM21	Palmitópolis	Dez/2000	Oeste - PR
PM22	Palmitópolis	Dez/2000	Oeste - PR
PM23	Londrina	Ago/2000	Norte Central – PR
PM24	Cerro Azul	Dez/2001	Grande Curitiba – PR
PM25	Senador Salgado Filho	Out/2010	RS
PM26	Rio Grande do Sul	Abr/2001	RS
PM27	Rio Grande do Sul	Nov/2010	RS
PM28	São João da Boa Vista	Abr/2000	SP
PM29	Varginha	Out/2000	MG
PM30	Araraquara	Abr/2000	SP
PM31	Mambaí	Jul/2011	GO
PM32	Simão Dias	Out/2000	SE
PM33	Simão Dias	Out/2000	SE
PM34	Rio Grande do Sul	Abr/2000	RS
PM35	Minas Gerais	Mar/2000	MG
PM36	Minas Gerais	Mar/2000	MG
PM37	Santa Catarina	Out/2000	SC

3.1.1 Locais de coleta de triatomíneos *in situ* da Região Metropolitana de Curitiba (RMC)

A grande Curitiba é formada por 25 municípios e uma população de 3,3 milhões de habitantes (2007). A área é de 15.622 km². A RMC foi criada em 1973 envolvendo 14 municípios: Curitiba, Almirante Tamandaré, Araucária, Balsa Nova, Bocaiúva do Sul, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Colombo, Contenda, Mandirituba, Piraquara, Quatro Barras, Rio Branco do Sul e São José dos Pinhais. Desde então, ocorreram desmembramentos de municípios e ampliação da RMC. A configuração atual é de 2002, segundo a Lei Estadual 13.512/2002 (<http://www.guiageo-parana.com/regiao-metropolitana.htm>).

O mapa a seguir (FIGURA 6) contém os municípios referentes à RMC e os locais nos quais foram coletados triatomíneos *in situ* pela equipe do projeto encontram-se devidamente assinalados.



FIGURA 6 – LOCAIS DE COLETA DE TRIATOMÍNEOS *IN SITU* NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.

FONTE: http://www.comec.pr.gov.br/arquivos/File/RMC_2009_politico.pdf

Almirante Tamandaré está situado a 17 km de Curitiba. Sua população estimada em 2010 é de 103.245 habitantes segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Esse município teve seu desenvolvimento histórico ligado às explorações auríferas de Curitiba. Na época do descobrimento do Brasil, em 1500, o município era coberto por duas formações vegetais originais: floresta ombrófila mista e campos. O clima do município é o subtropical úmido mesotérmico, onde as temperaturas médias registradas anualmente são: máxima de 26°C, mínima de 12°C e compensada 19°C

(<http://www.tamandare.pr.gov.br/secretarias/template.php?secretaria=gabinete&sessao=historia>).

A coleta dos triatomíneos foi acompanhada por funcionários da Secretaria Municipal de Saúde de Almirante Tamandaré até o local da coleta (FIGURA 7) e durante todo o procedimento de captura dos triatomíneos. Nesse local, os insetos foram encontrados em um chalé de madeira, na parte superior, parecido com um sótão, dentre as frestas das paredes, bem como as do chão, e também em ninhos de prováveis roedores encontrados debaixo de telhas (FIGURA 8). Nesse dia, foram capturados 4 fêmeas adultas vivas e 6 ninfas igualmente vivas, além de várias exúvias, ovos eclodidos e a serem eclodidos, todos identificados como sendo *P. megistus*. O material foi devidamente coletado com pinças entomológicas e acondicionado em frascos apropriados.



FIGURA 7 – FOTO POR SATÉLITE INDICANDO O LOCAL DA COLETA EM ALMIRANTE TAMANDARÉ. COORDENADAS VIA GPS: 25°20'23.09"S / 49°18'04.11"O
 FONTE: GOOGLE EARTH (2011).

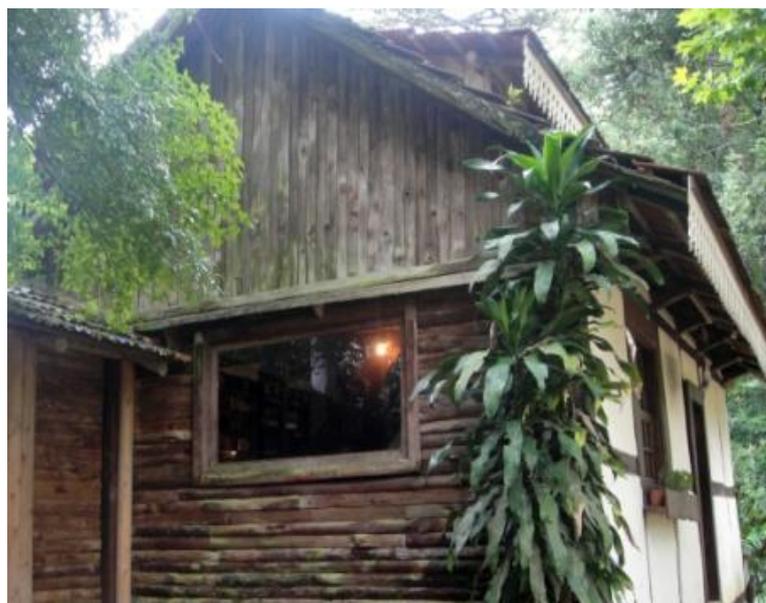


FIGURA 8 – FOTO DO LOCAL ONDE FORAM ENCONTRADOS *Panstrongylus megistus* EM ALMIRANTE TAMANDARÉ.
 FONTE: O AUTOR (2011).

A Cidade Industrial de Curitiba (CIC) é um bairro de classe média baixa que foi instalado na região oeste de Curitiba, a 10 km do centro. Seus 43.7 milhões de m² correspondem a 10% da extensão territorial total da cidade. Trata-se do maior bairro da cidade em área geográfica. Nele está sediado o distrito industrial de Curitiba, concebido, na década de 1970, como indutor de desenvolvimento industrial do município. Em 2010 a população estimada foi de 180.144 habitantes ([http://pt.wikipedia.org/wiki/Cidade_Industrial_\(Curitiba\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Cidade_Industrial_(Curitiba))).

Neste caso, foi o proprietário do local que encontrou o triatomíneo e o levou a uma unidade de saúde mais próxima, e essa, por sua vez, encaminhou a Secretaria de Saúde do Estado, que fez a identificação do inseto, e confirmou ser triatomíneo da espécie *P. megistus*. Com a autorização do proprietário, foi verificado se haviam mais exemplares existentes. O dono da chácara relatou ter encontrado o triatomíneo já morto, dentro do canil de seu cachorro, nos fundos do terreno (FIGURA 9).



FIGURA 9 – FOTO POR SATÉLITE INDICANDO O LOCAL DA COLETA NA CIDADE INDUSTRIAL CURITIBA. COORDENADAS VIA GPS: 25°26'35.76"S / 49°22'13.49"O
FONTE: GOOGLE EARTH (2011).

Campo Magro pertence à Região Metropolitana de Curitiba e sua denominação se deve ao fato de que na ocasião em que os tropeiros demandavam pela região, na época do inverno, o gado emagrecia e sobrava pouco pasto verde para as reses. Mais parecia um campo mingado, um campo magro. Montanhas e árvores constituem o cenário atual da região. Mais de 90% da área do município é formada por área de mananciais. Sua população em 2010 foi estimada em 24.836 habitantes (<http://prefeituradecampomagro.blogspot.com/p/nosso-municipio.html>).

O inseto foi capturado pela proprietária da casa, que relatou ter encontrado 3 exemplares no interior do domicílio. Os insetos foram enviados à secretaria municipal de saúde de Campo Magro e depois à Secretaria de Saúde do Estado que identificou os mesmos como sendo da espécie *P. megistus*. Na visita ao local (FIGURA 10), a moradora da casa relatou que havia capturado mais um inseto fazia uns 15 dias e o armazenado apropriadamente na geladeira. O inseto era uma fêmea de *P. megistus* e apresentava, no frasco a qual fora armazenada, diversos ovos a serem eclodidos e excretas, o que sugere uma provável alimentação recente. Também foi relatado que o inseto havia sido coletado em uma manhã, na parede interna do quarto de seu neto de 8 anos, o qual amanheceu com uma picada no braço, que permaneceu avermelhado e inchado por 24 horas.



FIGURA 10 – FOTO DO LOCAL ONDE FOI ENCONTRADO *Panstrongylus megistus* EM CAMPO MAGRO.
FONTE: O AUTOR (2011).

3.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA, utilizou-se o protocolo descrito pela NORGEN® *Biotek Corporation*, fabricante do *Genomic DNA Isolation Kit*. O tecido de escolha para a extração foi o da musculatura da perna. O DNA foi extraído de um exemplar adulto, ou ninfa de 5º estágio, de onde foram excisadas uma ou duas pernas de cada exemplar com auxílio de instrumentos cirúrgicos previamente esterilizados (FIGURA 11). A musculatura foi triturada em tubos plásticos de 1,5mL, adicionado de 300µL de tampão de digestão e posteriormente 12µL de proteinase K. Esse produto lisado e homogeneizado em vórtice foi incubado a 55°C por 1 hora. Após a lise das estruturas e membranas celulares, a extração do DNA seguiu-se com a adição de 300µL de solução de ligação e 300µL de etanol 99%, ambos misturados em vórtice. Transferiu-se 600µL da mistura para a coluna de micro rotação e centrifugado por 8 minutos a 5200 x g (\approx 8000RPM). Após centrifugação, o material foi descartado, a coluna de micro rotação remontada e o restante da mistura do lisado transferido como descrito anteriormente, até que toda a mistura fosse passada através da coluna. Aplicou-se 500µL de solução de lavagem na coluna e centrifugou-se durante 1 minuto a 14000 x g. Após essa centrifugação o material do fluxo foi descartado e a coluna de micro rotação remontada com seus tubos coletores. Novamente, aplicou-se 500µL de solução de lavagem na coluna e centrifugou-se durante 2 minutos a 14000 x g. Com a remoção cuidadosa da coluna de micro rotação do tubo coletor, montou-se a coluna de micro rotação (com o DNA ligado à resina) em um tubo de eluição de 1,7mL. Foram adicionados 200µL de tampão de eluição no centro da camada de resina e centrifugado por 1 minuto a 3000 x g. Desse modo, uma parte do tampão de eluição passou através da coluna e permitiu a hidratação do DNA. Centrifugou-se a 14000 x g por um período adicional de 2 minutos para o recolhimento do total volume de eluição. O DNA de cada amostra recolhida foi acondicionado em micro tubo e armazenado em congelador a uma temperatura de -20°C.



FIGURA 11 – EXTRAÇÃO DA MUSCULATURA DA PERNA DO TRIATOMÍNEO.
 FONTE: O AUTOR (2011).

3.3 Amplificação de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As reações de PCR foram realizadas em termociclador da Eppendorf Mastercycler® *gradient*. A reação foi realizada para um volume final de 25µL e utilizou-se dos seguintes componentes: 5µL de DNA (equivalente a 30ng), 5µL de dNTPs (2,5mM), 0,5µL de cada iniciador (10mM), 2,0µL de cloreto de magnésio (50mM), 0,3µL de enzima Taq polimerase (5U/µL) e 2,5µL de tampão (10x). As reações foram ajustadas para 25µL com água ultra purificada. As condições da PCR variaram de acordo com os iniciadores. Para a amplificação do Espaçador Transcrito Interno 1 (ITS-1) e Espaçador Transcrito Interno 2 (ITS-2) foram necessárias as seguintes condições: um ciclo inicial a 94°C por 1 minuto, seguidos por 30 ciclos compreendendo desnaturação (94°C, 40 segundos), anelamento (55°C, 30 segundos, para ITS-1 e 50°C, 30 segundos, para ITS-2) e extensão (72°C, 40 segundos) finalizando com um ciclo a 72°C por 4 minutos. Os iniciadores para a amplificação dos marcadores ITS-1, ITS-2 foram desenhados a partir de regiões conservadas dos genes flanqueantes 18S e 28S do RNAr nuclear conforme mostrado na TABELA 3 (PACHECO *et al.*, 2003; BARGUES *et al.*, 2006).

TABELA 3: INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES ITS-1 E ITS-2 DO DNAr NUCLEAR DE *Panstrongylus megistus*.

ITS-1	lin (<i>foward</i>)	5' – CTAAGCGGTGGATCACTCGG – 3'
	Infer (<i>reverse</i>)	5' – CTACCGCTTACTAATATC – 3'
ITS-2	5.8 t (<i>foward</i>)	5' – CTGCCCTTTGTACACACCG – 3'
	28 t (<i>reverse</i>)	5' – ACCCTCAGACAGGCGTAGCCC – 3'

Em cada experimento foram utilizados controles positivo e negativo.

A confirmação da amplificação dos marcadores foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Foram aplicados para essa confirmação 5 μ L de amostra em 3 μ L de tampão de amostra, além de um Marcador de Massa Molecular (MMM) para referência do tamanho do fragmento que foi amplificado, e visualizado através de um foto-documentador de luz ultravioleta.

3.4 Purificação de DNA

A purificação do produto de PCR foi realizada com acetato de amônio segundo Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989). Para cada amostra foram adicionados 2 μ L de acetato de amônio e 30 μ L de etanol 99%. As amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 1800 x *g*. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e mais 100 μ L de etanol 70% foram adicionados às amostras. As mesmas foram então submetidas a uma nova centrifugação, por 5 minutos a 1800 x *g*. Depois de descartado cuidadosamente o sobrenadante, os tubos foram colocados em estufa a 60°C, por 45 minutos, para a secagem total das amostras, restando somente os *pellets* no fundo dos mesmos, sendo resuspendidos então em 12 μ L de água ultra purificada para posterior marcação com BigDye™ (DNA Sequencing Kit, BigDye™ Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems).

3.5 Sequenciamento de DNA

A marcação do DNA para seu posterior sequenciamento foi realizada com o kit BigDye™. Para cada reação se utilizou 30ng de DNA previamente purificado, 1,0 μ L do kit *Premix Ready Reaction*, 3,0 μ L de tampão (*Sequencing Buffer 2,5x*) 5,0pmol de cada iniciador correspondente e água para completar a reação de 10,0 μ L.

Cada reação utiliza apenas um iniciador, ou seja, duas reações para cada fragmento de DNA amplificado (*forward* e *reverse*), ocorrendo a partir das duas extremidades para gerar sequências consenso. As condições para essa

amplificação foram as seguintes: 94°C por 1 minuto, 30 ciclos de 95° por 10 segundos, 50°C por 5 segundos (ITS-2) e 55°C por 5 segundos (ITS-1) e 60°C por 4 minutos, finalizando a 4°C.

Para a purificação do produto marcado, foram adicionados aos microtubos 40µL de isopropanol 75%. Feito isso, cada mistura foi passada para um tubo de 0,5 mL, homogeneizado e deixado à temperatura ambiente por 20 minutos. O material foi centrifugado por 25 minutos a 12000 x g. O isopropanol foi então removido e 200µL de etanol 70% foram adicionados. Depois de homogeneizados, os mesmos foram centrifugados por 5 minutos a 12000 x g. O etanol foi cuidadosamente removido e as amostras secadas em estufa a 60° por 45 minutos.

Cada amostra foi ressuspensa em 10µL de formamida e todas colocadas em placa de sequenciamento para serem desnaturadas em termociclador por 5 minutos a 95°C.

O sequenciador, ABI 3130 da *Applied Biosystems* foi utilizado para a separação e detecção do DNA marcado.

3.6 Análises das sequências de DNA

As sequências foram analisadas e corrigidas através do programa STADEN Package (STADEN, JUDGE & BONFIELD, 2001) e alinhadas pelo programa MEGA versão 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011). Para a obtenção da composição nucleotídica e aminoacídica, cálculo das distâncias e posições nucleotídicas variáveis foi utilizado o programa MEGA versão 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011). As análises filogenéticas das sequências de DNA também foram processadas utilizando-se o programa MEGA versão 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011).

4 RESULTADOS

4.1 Análise das sequências nucleotídicas da região intergênica do DNA ribossomal nuclear incluindo os espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) dos espécimes analisados de *Panstrongylus megistus*.

Para a nomenclatura dos haplótipos compostos (CH), as diferentes letras em maiúsculo (de A até T) representam os haplótipos de ITS-1 e os números (de 1 a 10) os haplótipos de ITS-2, segundo proposto por Bargues *et al.* (2006).

Dos 37 espécimes submetidos à extração e sequenciamento de DNA, foi possível obter 32 sequências capazes de serem analisadas.

4.2 Análise das sequências nucleotídicas do primeiro espaçador transcrito interno (ITS-1) do DNA ribossomal nuclear dos espécimes analisados de *Panstrongylus megistus*.

Um total de 20 haplótipos do fragmento nucleotídico ITS-1 foi detectado entre os exemplares analisados da espécie *P. megistus*. O comprimento do fragmento variou entre 758 a 766 pares de base (pb) com uma média de 762,5pb (TABELA 4). O alinhamento dos 20 haplótipos descritos para ITS-1, incluindo as inserções¹⁶/deleções¹⁷, apresentou um comprimento de 766pb e a porcentagem de A+T foi de 68,9% (TABELA 4).

¹⁶ adição de um ou mais pares de bases de nucleótidos numa sequência genética.

¹⁷ perda de sequência(s) nucleotídica(s) pelo genoma de um organismo.

TABELA 4 – PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E COMPRIMENTO (pb) PARA O FRAGMENTO DE ITS-1 DOS HAPLÓTIPOS DE *Panstrongylus megistus*.

<i>Panstrongylus megistus</i> (PM)						
ESPÉCIMES	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	TOTAL (pb)	HAPLÓTIPO
PM 01 Almirante Tamandaré - PR	32,9	12,7	36,0	18,4	766,0	CH-A
PM 02 Goioxim - PR	32,9	12,6	36,0	18,5	762,0	CH-B
PM 03 Siqueira Campos - PR	32,8	12,9	35,8	18,5	758,0	CH-C
PM 04 Wenceslau Braz – PR	32,9	12,8	35,9	18,5	764,0	CH-D
PM 05 Castro – PR	32,9	12,8	35,8	18,5	763,0	CH-E
PM 06 Rio Azul – PR	32,9	12,9	35,7	18,5	762,0	CH-F
PM 07 Reboças – PR	32,9	12,7	36,0	18,4	766,0	CH-A
PM 08 Santana do Itararé – PR	32,9	12,9	35,7	18,5	762,0	CH-F
PM 09 Tomazina – PR	32,9	12,8	35,9	18,5	764,0	CH-D
PM 10 Campo Magro – PR	32,8	12,8	35,8	18,6	765,0	CH-G
PM 11 Curitiba – PR	32,9	12,7	36,0	18,4	766,0	CH-A
PM 16 Arapongas – PR	32,8	12,7	36,0	18,5	763,0	CH-H
PM 17 Arapongas – PR	32,8	12,6	36,2	18,4	762,0	CH-I
PM 18 Rio Branco do Sul – PR	32,9	12,8	35,8	18,5	763,0	CH-E
PM 19 Rio Branco do Sul – PR	32,8	12,8	35,9	18,6	760,0	CH-J
PM 20 Piraquara – PR	32,8	12,8	35,9	18,6	760,0	CH-J
PM 21 Palmitópolis – PR	32,9	12,6	36,3	18,3	761,0	CH-K
PM 22 Palmitópolis – PR	32,9	12,7	35,9	18,4	765,0	CH-L
PM 23 Londrina – PR	32,9	12,7	36,2	18,3	766,0	CH-M
PM 24 Cerro Azul – PR	32,8	12,6	36,2	18,4	762,0	CH-I
PM 25 Senador salgado Filho – RS	32,9	12,7	36,1	18,3	765,0	CH-M
PM 26 Rio Grande do Sul	32,9	12,6	36,1	18,4	761,0	CH-N
PM 27 Rio Grande do Sul	32,8	12,9	35,7	18,6	759,0	CH-O
PM 28 São João da Boa Vista – SP	32,8	12,7	36,0	18,5	762,0	CH-P
PM 29 Varginha – MG	33,2	12,6	35,8	18,4	762,0	CH-Q
PM 30 Araraquara – SP	32,9	12,6	36,2	18,2	762,0	CH-R
PM 32 Simão Dias – SE	32,8	12,7	36,0	18,5	762,0	CH-P
PM 33 Simão Dias – SE	32,8	12,7	36,0	18,5	762,0	CH-P
PM 34 Rio Grande do Sul	32,8	12,9	35,8	18,5	758,0	CH-C
PM 35 Minas Gerais	33,0	12,6	36,0	18,5	764,0	CH-S
PM 36 Minas Gerais	33,0	12,6	36,0	18,5	764,0	CH-S
PM 37 Santa Catarina	32,8	12,6	36,3	18,3	760,0	CH-T
MÉDIA	32,9	12,7	36,0	18,4	762,5	

Um total de 22 diferenças nucleotídicas foi detectado para esse fragmento, das quais 11 são verdadeiras mutações (sendo 7 transições¹⁸ e 4 transversões) e 11 são inserções/deleções, sendo 9 consideradas com informação de parcimônia (TABELA 5).

¹⁸ mutação que provoca a transformação de uma purina numa outra purina, ou uma pirimidina em outra pirimidina.

TABELA 5 – DIFERENÇAS NUCLEOTÍDICAS ENTRE OS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE *Panstrongylus megistus* (PM) PARA A REGIÃO INTERGÊNICA DO DNAr NUCLEAR ITS-1.

Espécime	Posição nucleotídica																				Haplótipo			
	1	1	2	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5		5	6	
	0	2	1	1	3	6	9	9	9	9	4	4	4	4	6	6	8	8	8	8	9	0		
	3	5	8	0	1	5	3	4	5	6	0	1	2	3	8	9	2	1	2	3	8	5		
	♣	♣		♠	♠	♣	♣			♣							♣	♣	♠		♣	♠		
PM 01	A	C	T	A	T	A	G	T	G	G	A	A	A	--	T	A	G	A	A	T	G	A	CH-A	
PM 02	.	T	.	.	A	G	--	--	.	.	.	--	--	--	CH-B	
PM 03	A	G	A	--	--	.	--	--	--	--	.	.	--	--	--	.	.	C	CH-C	
PM 04	A	.	.	.	--	--	--	.	.	C	CH-D	
PM 05	--	--	--	.	.	C	CH-E	
PM 06	--	--	.	.	.	--	--	--	.	.	C	CH-F
PM 07	--	CH-A	
PM 08	--	--	.	.	.	--	--	--	.	.	C	CH-F
PM 09	A	.	.	.	--	--	--	.	.	C	CH-D	
PM 10	A	G	--	--	C	CH-G	
PM 11	--	CH-A	
PM 16	G	T	--	.	A	G	A	--	--	C	CH-H	
PM 17	G	T	--	.	A	G	A	--	--	.	.	.	--	--	A	.	CH-I	
PM 18	--	--	.	.	.	--	--	--	.	.	C	CH-E
PM 19	G	T	--	.	A	G	A	--	--	--	--	--	.	.	C	CH-J	
PM 20	G	T	--	.	A	G	A	--	--	--	--	--	.	.	C	CH-J	
PM 21	.	T	--	.	A	G	A	--	--	.	--	--	--	A	.	CH-K		
PM 22	--	--	CH-L	
PM 23	--	A	.	CH-M		
PM 24	G	T	--	.	A	G	A	--	--	.	.	--	--	A	.	CH-I			
PM 25	--	--	A	.	CH-M			
PM 26	G	T	--	.	A	G	A	--	--	.	.	--	--	A	.	CH-N			
PM 27	A	G	A	--	.	--	--	--	--	.	.	.	--	--	--	.	.	C	CH-O	
PM 28	G	T	--	.	A	G	A	--	--	.	.	--	--	C	CH-P	
PM 29	G	T	.	T	A	G	A	.	--	--	.	--	--	CH-Q		
PM 30	G	T	--	.	.	.	A	--	--	.	.	--	--	A	.	CH-R			
PM 32	G	T	--	.	A	G	A	--	--	.	.	--	--	C	CH-P	
PM 33	G	T	--	.	A	G	A	--	--	.	.	--	--	C	CH-P	
PM 34	A	G	A	--	--	.	--	--	--	.	.	.	--	--	--	.	.	C	CH-C	
PM 35	G	T	--	T	A	G	.	.	.	A	.	.	--	--	A	.	CH-S			
PM 36	G	T	--	T	A	G	.	.	.	A	.	.	--	--	A	.	CH-S			
PM 37	G	T	--	.	A	G	A	--	--	.	.	--	--	--	--	A	.	.	A	.	CH-T			

(.) NUCLEOTÍDEO SEMELHANTE AO PM01;

(--) INSERÇÃO / DELEÇÃO;

(♣) TRANSIÇÕES;

(♠) TRANSVERSÕES.

■ POSIÇÃO NUCLEOTÍDICA COM INFORMAÇÃO DE PARCIMÔNIA

O fragmento em questão apresenta sequências de microsátélites AT em diversas regiões de seu comprimento total. Apresenta no máximo 7 sequências

TABELA 6 – PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E COMPRIMENTO (pb) PARA O FRAGMENTO DE ITS-2 DOS HAPLÓTIPOS DE *Panstrongylus megistus*.

<i>Panstrongylus megistus</i> (PM)						
ESPÉCIMES	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	TOTAL (pb)	HAPLÓTIPO
PM 02 Goioxim - PR	41,4	11,7	33,6	13,4	599,0	CH-1
PM 03 Siqueira Campos - PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 04 Wenceslau Braz – PR	41,7	11,5	33,5	13,3	600,0	CH-3
PM 05 Castro – PR	41,7	11,5	33,5	13,3	600,0	CH-3
PM 06 Rio Azul – PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 07 Rebouças – PR	41,7	11,5	33,5	13,3	600,0	CH-3
PM 08 Santana do Itararé – PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 09 Tomazina – PR	41,7	11,5	33,5	13,3	600,0	CH-3
PM 10 Campo Magro – PR	41,5	11,5	33,5	13,5	600,0	CH-4
PM 11 Curitiba – PR	41,7	11,5	33,5	13,3	600,0	CH-3
PM 16 Arapongas – PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 17 Arapongas – PR	41,6	11,5	33,6	13,2	598,0	CH-5
PM 18 Rio Branco do Sul – PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 19 Rio Branco do Sul – PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 20 Piraquara – PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 21 Palmitópolis – PR	41,5	11,6	33,7	13,2	597,0	CH-6
PM 22 Palmitópolis – PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 23 Londrina – PR	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 24 Cerro Azul – PR	41,7	11,4	33,7	13,2	597,0	CH-7
PM 25 Senador salgado Filho – RS	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 26 Rio Grande do Sul	41,5	11,6	33,7	13,2	597,0	CH-6
PM 27 Rio Grande do Sul	41,6	11,7	33,6	13,2	599,0	CH-5
PM 28 São João da Boa Vista – SP	41,4	11,5	33,6	13,5	599,0	CH-8
PM 30 Araraquara – SP	41,7	11,4	33,7	13,2	597,0	CH-7
PM 32 Simão Dias – SE	41,5	11,6	33,7	13,2	597,0	CH-6
PM 33 Simão Dias – SE	41,6	11,5	33,6	13,4	599,0	CH-2
PM 34 Rio Grande do Sul	41,6	11,7	33,4	13,4	599,0	CH-5
PM 35 Minas Gerais	41,5	11,7	33,5	13,2	597,0	CH-9
PM 36 Minas Gerais	41,5	11,7	33,5	13,2	597,0	CH-9
PM 37 Santa Catarina	41,5	11,7	33,6	13,2	598,0	CH-10
MÉDIA	41,6	11,5	33,6	13,3	598,7	

Um total de 10 diferenças nucleotídicas foi encontrado nas 10 diferentes sequências de ITS-2, das quais, 7 foram verdadeiras mutações (sendo 4 transições e 3 transversões) e 4 foram inserções/deleções, sendo 3 com informações de parcimônia (TABELA 7).

TABELA 7 – DIFERENÇAS NUCLEOTÍDICAS ENTRE OS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DE *Panstrongylus megistus* PARA A REGIAO INTERGÊNICA DO DNAr NUCLEAR ITS-2.

Espécime	Posição nucleotídica										Haplótipo
	0	1	1	1	1	1	4	4	4	5	
	6	0	0	0	1	7	4	5	9	9	
	2	7	8	9	0	5	7	6	5	5	
	♣	♣				♠	♠	♠	♣	♣	
PM 02	C	G	C	G	C	C	A	--	G	T	CH-1
PM 03	T	--	.	.	CH-2
PM 04	T	T	.	.	CH-3
PM 05	T	T	.	.	CH-3
PM 06	T	--	.	.	CH-2
PM 07	T	T	.	.	CH-3
PM 08	T	--	.	.	CH-2
PM 09	T	T	.	.	CH-3
PM 10	G	.	T	.	.	CH-4
PM 11	T	T	.	.	CH-3
PM 16	T	--	.	.	CH-2
PM 17	T	.	--	--	.	.	C	A	.	.	CH-5
PM 18	T	--	.	.	CH-2
PM 19	T	--	.	.	CH-2
PM 20	T	--	.	.	CH-2
PM 21	.	.	--	--	.	.	.	--	.	.	CH-6
PM 22	T	--	.	.	CH-2
PM 23	T	--	.	.	CH-2
PM 24	T	.	--	--	.	.	.	--	.	.	CH-7
PM 25	T	--	.	.	CH-2
PM 26	.	.	.	--	--	.	.	--	.	.	CH-6
PM 27	T	C	--	A	.	CH-5
PM 28	T	--	.	G	CH-8
PM 30	T	.	.	--	--	.	.	--	.	.	CH-7
PM 32	.	.	--	--	.	.	.	--	.	.	CH-6
PM 33	T	--	.	.	CH-2
PM 34	T	C	--	.	.	CH-5
PM 35	.	.	--	--	.	.	C	--	.	.	CH-9
PM 36	.	.	--	--	.	.	C	--	.	.	CH-9
PM 37	.	A	--	--	.	.	C	T	.	G	CH-10

(.) NUCLEOTÍDEO SEMELHANTE AO PM02;

(--) INSERÇÃO / DELEÇÃO;

(♣) TRANSIÇÕES;

(♠) TRANSVERSÕES.

■ POSIÇÃO NUCLEOTÍDICA COM INFORMAÇÃO DE PARCIMÔNIA

Para a segunda região intergênica do DNA nuclear foi detectado microsátélites AT: $(AT)T_3(AT)_4ACAT_4(AT)A(AT)GT(AT)_5$. Diferenças nestes microsátélites aparecem em 3 insetos provenientes do estado do Paraná (Goioxim, Campo Magro e Palmitópolis (espécime PM 10) e nos demais estados com exceção dos representantes de São Paulo. Esta alteração apresenta a seguinte fórmula: $(AT)T_3(AT)_6AC(AT)T_3(AT)A(AT)GT(AT)_5$.

4.4 Análise conjunta dos resultados das regiões intergênicas do DNA ribossomal nuclear (ITS-1 e ITS-2) dos exemplares analisados de *Panstrongylus megistus*

No total, 24 diferentes haplótipos foram descritos dentre os exemplares analisados da espécie *P. megistus*. A longitude da região intergênica, nos exemplares analisados, variou entre 1357 e 1366pb, com uma média de 1361,1pb. A longitude do alinhamento geral para todos os haplótipos descritos foi de 1366pb, incluindo as inserções/deleções. A proporção de bases nucleotídicas esteve direcionada para A+T com uma média de 71,6% (TABELA 8).

TABELA 8 – PORCENTAGEM DE BASES NUCLEOTÍDICAS E COMPRIMENTO PARA OS FRAGMENTOS DE ITS-1 E ITS-2 DOS HAPLÓTIPOS DE *Panstrongylus megistus*.

<i>Panstrongylus megistus</i> (PM)						
	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	TOTAL (pb)	HAPLÓTIPO
PM 02 Goioxim - PR	36,7	12,2	34,9	16,2	1361,0	CH-B_1
PM 03 Siqueira Campos - PR	36,7	12,2	34,8	16,2	1364,0	CH-C_2
PM 04 Wenceslau Braz – PR	36,8	12,3	34,8	16,2	1363,0	CH-D_3
PM 05 Castro – PR	36,7	12,3	34,8	16,2	1361,0	CH-E_3
PM 06 Rio Azul – PR	36,7	12,2	34,9	16,2	1366,0	CH-F_2
PM 07 Rebouças – PR	36,7	12,3	34,8	16,2	1361,0	CH-A_3
PM 08 Santana do Itararé – PR	36,7	12,2	34,8	16,2	1364,0	CH-F_2
PM 09 Tomazina – PR	36,6	12,2	34,8	16,3	1365,0	CH-D_3
PM 10 Campo Magro – PR	36,7	12,2	34,9	16,2	1366,0	CH-G_4
PM 11 Curitiba – PR	36,7	12,3	34,8	16,2	1357,0	CH-A_3
PM 16 Arapongas – PR	36,7	12,3	34,8	16,2	1362,0	CH-H_2
PM 17 Arapongas – PR	36,7	12,2	34,9	16,2	1364,0	CH-I_5
PM 18 Rio Branco do Sul – PR	36,7	12,2	35,0	16,1	1365,0	CH-E_2
PM 19 Rio Branco do Sul – PR	36,7	12,2	35,0	16,1	1364,0	CH-J_2
PM 20 Piraquara – PR	36,7	12,4	34,8	16,2	1358,0	CH-J_2
PM 21 Palmitópolis – PR	36,7	12,4	34,7	16,2	1357,0	CH-K_6
PM 22 Palmitópolis – PR	36,6	12,2	34,9	16,2	1362,0	CH-L_2
PM 23 Londrina – PR	36,7	12,1	35,1	16,1	1360,0	CH-M_2
PM 24 Cerro Azul – PR	36,6	12,2	34,9	16,3	1359,0	CH-I_7
PM 25 Senador salgado Filho – RS	36,6	12,2	34,9	16,3	1359,0	CH-M_2
PM 26 Rio Grande do Sul	36,7	12,2	35,1	16,1	1358,0	CH-N_6
PM 27 Rio Grande do Sul	36,7	12,1	35,1	16,1	1359,0	CH-O_5
PM 28 São João da Boa Vista – SP	36,7	12,2	35,1	16,1	1358,0	CH-P_8
PM 30 Araraquara – SP	36,6	12,2	34,9	16,3	1361,0	CH-R_7
PM 32 Simão Dias – SE	36,8	12,1	35,1	16,0	1359,0	CH-P_6
PM 33 Simão Dias – SE	36,6	12,2	35,0	16,2	1359,0	CH-P_2
PM 34 Rio Grande do Sul	36,7	12,2	34,9	16,2	1361,0	CH-C_5
PM 35 Minas Gerais	36,6	12,2	35,1	16,1	1358,0	CH-S_9
PM 36 Minas Gerais	36,7	12,2	34,9	16,2	1361,0	CH-S_9
PM 37 Santa Catarina	36,7	12,2	34,9	16,2	1361,0	CH-T_10
MÉDIA	36,7	12,2	34,9	16,2	1361,1	

4.5 Análises filogenéticas

4.5.1 Análises filogenéticas para a região intergênica do DNA ribossomal nuclear incluindo os espaçadores transcritos internos (ITS-1 e ITS-2) dos espécimes de *Panstrongylus megistus*

A árvore construída com o método de máxima verossimilhança (FIGURA 12) foi selecionada dentre as várias construídas por outros métodos para a região intergênica do primeiro espaçador interno (ITS-1). Nela, pode-se observar dois cladogramas principais, cada um com 15 espécimes de *P. megistus*. No clado superior formaram-se agrupamentos de espécimes de diversas regiões do estado do Paraná juntamente com espécimes dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Já no clado inferior, formaram-se agrupamentos de espécimes de *P. megistus* de diferentes regiões do estado do Paraná juntamente com espécimes dos estados do Rio Grande do Sul, Sergipe, São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina.

O mesmo método foi utilizado para a construção da árvore referente a região intergênica do segundo espaçador interno (ITS-2). Neste caso, não houve evidente separação entre os cladogramas como visto anteriormente, porém pode-se observar a formação de distintos grupos (FIGURA 13).

A análise conjunta dos dois marcadores (ITS-1 e ITS-2) mostra uma topologia semelhante à árvore filogenética de ITS-1, onde uma diferença significativa é observada: dois espécimes referentes ao estado do Rio Grande do Sul, que antes faziam parte do clado inferior, agora estão agrupados no clado superior (FIGURA 14).

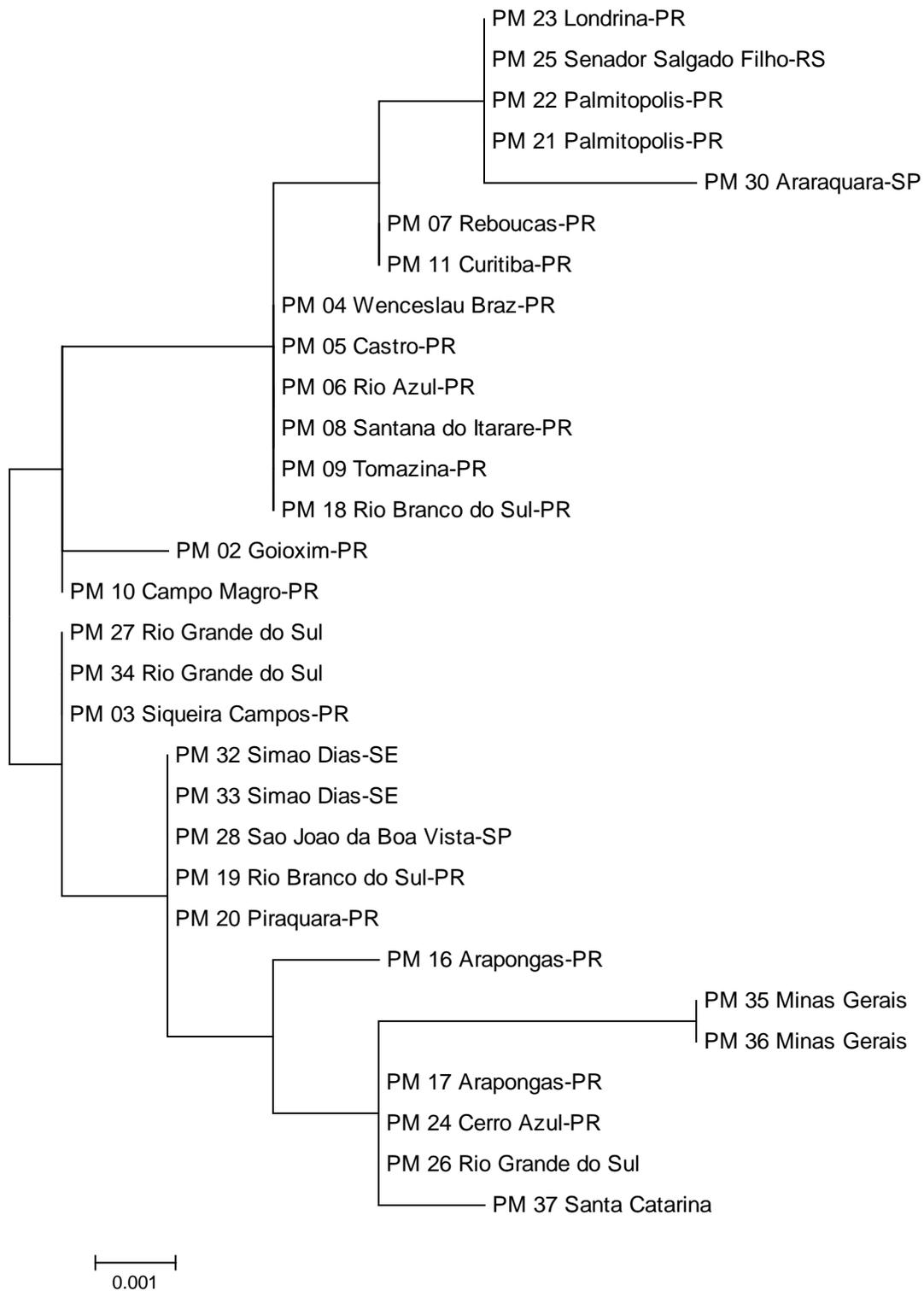


FIGURA 12 – ÁRVORE FILOGENÉTICA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA – KIMURA 2-PARÂMETROS PARA O PRIMEIRO ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO (ITS-1) DOS ESPÉCIMES ANALISADOS DE *Panstrongylus megistus*.

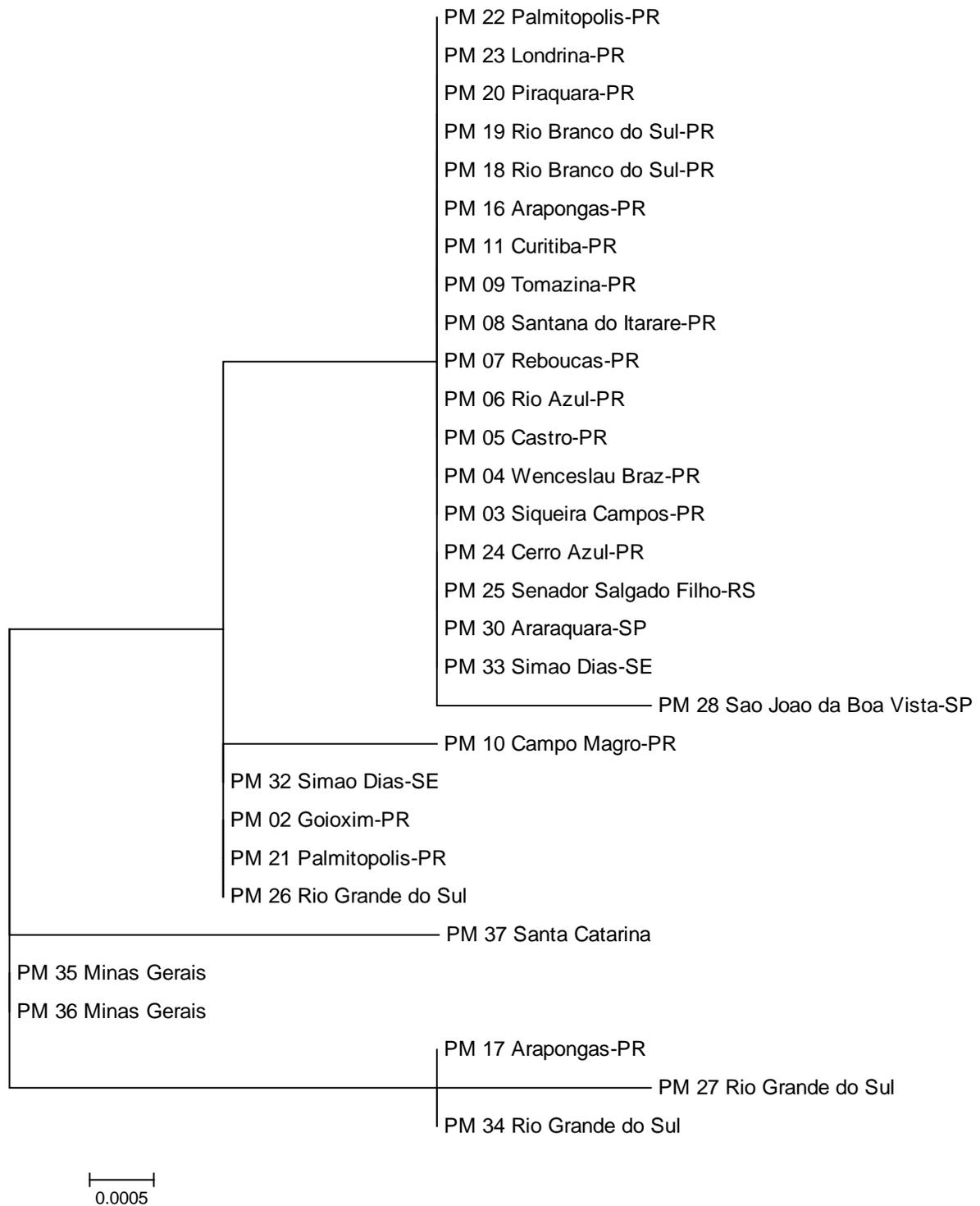


FIGURA 13 – ÁRVORE FILOGENÉTICA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA – KIMURA 2-PARÂMETROS PARA O SEGUNDO ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO (ITS-2) DOS ESPÉCIMES ANALISADOS DE *Panstrongylus megistus*.

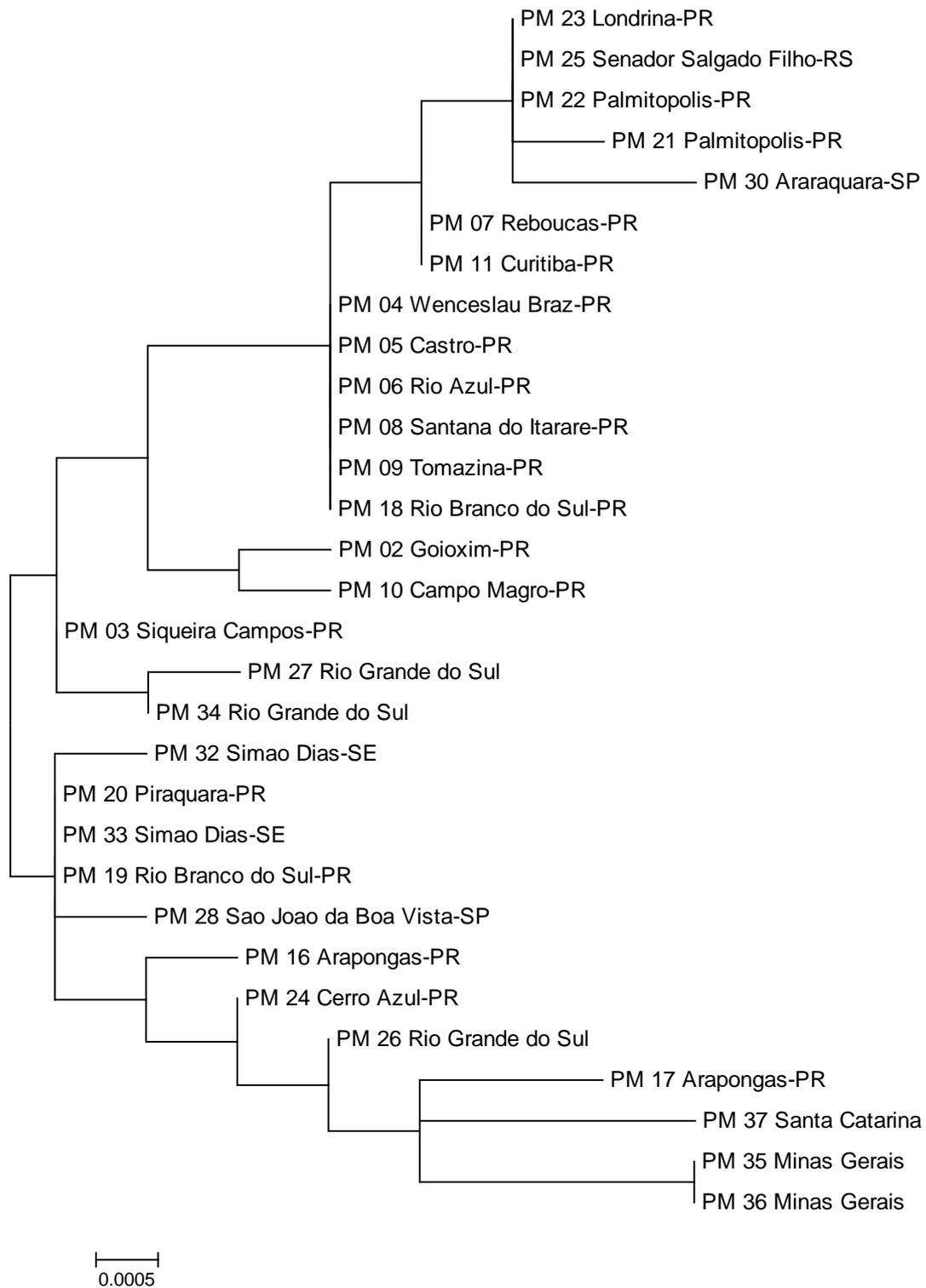


FIGURA 14 – ARVORE FILOGENÉTICA PELO MÉTODO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA – KIMURA 2-PARÂMETROS PARA O PRIMEIRO E O SEGUNDO ESPAÇADOR TRANSCRITO INTERNO (ITS-1 E ITS-2) DOS ESPÉCIMES ANALISADOS DE *Panstrongylus megistus*.

4.5.2 Distribuição geográfica dos haplótipos de *Panstrongylus megistus* analisados

Para melhor visualizar a disposição dos haplótipos encontrados dentre todos os espécimes analisados a FIGURA 15 apresenta um mapa do Brasil com os estados e seus respectivos haplótipos encontrados em destaque. A ampliação do estado do Paraná mostra também a distribuição dos haplótipos localizados em cada município, separados por mesorregiões.

Ao ser considerado somente o segundo espaçador transcrito interno é observado que o haplótipo 2 está presente em todos os planaltos paranaense e também para uma localidade do Rio Grande do Sul e de Sergipe. Também no primeiro planalto estão presentes outros 3 haplótipos. O haplótipo 7 também descrito para um inseto proveniente de São Paulo e o haplótipo 4 somente descrito para esta região. No segundo planalto paranaense é observado somente dois haplótipos que também são observados no primeiro planalto. Para o terceiro planalto foi descrito a presença 4 haplótipos. Nesta área além do haplótipo 2 há a presença do haplótipo 6 que é descrito também para um inseto proveniente de Sergipe e para o Rio Grande do Sul e do haplótipo 5 descrito para o Rio Grande do Sul. O quarto haplótipo desta região não foi descrita para nenhuma outra localidade estudada.

Os insetos provenientes do estado de Santa Catarina, de Minas Gerais e um de São Paulo não apresentam haplótipos correspondentes para o estado do Paraná.

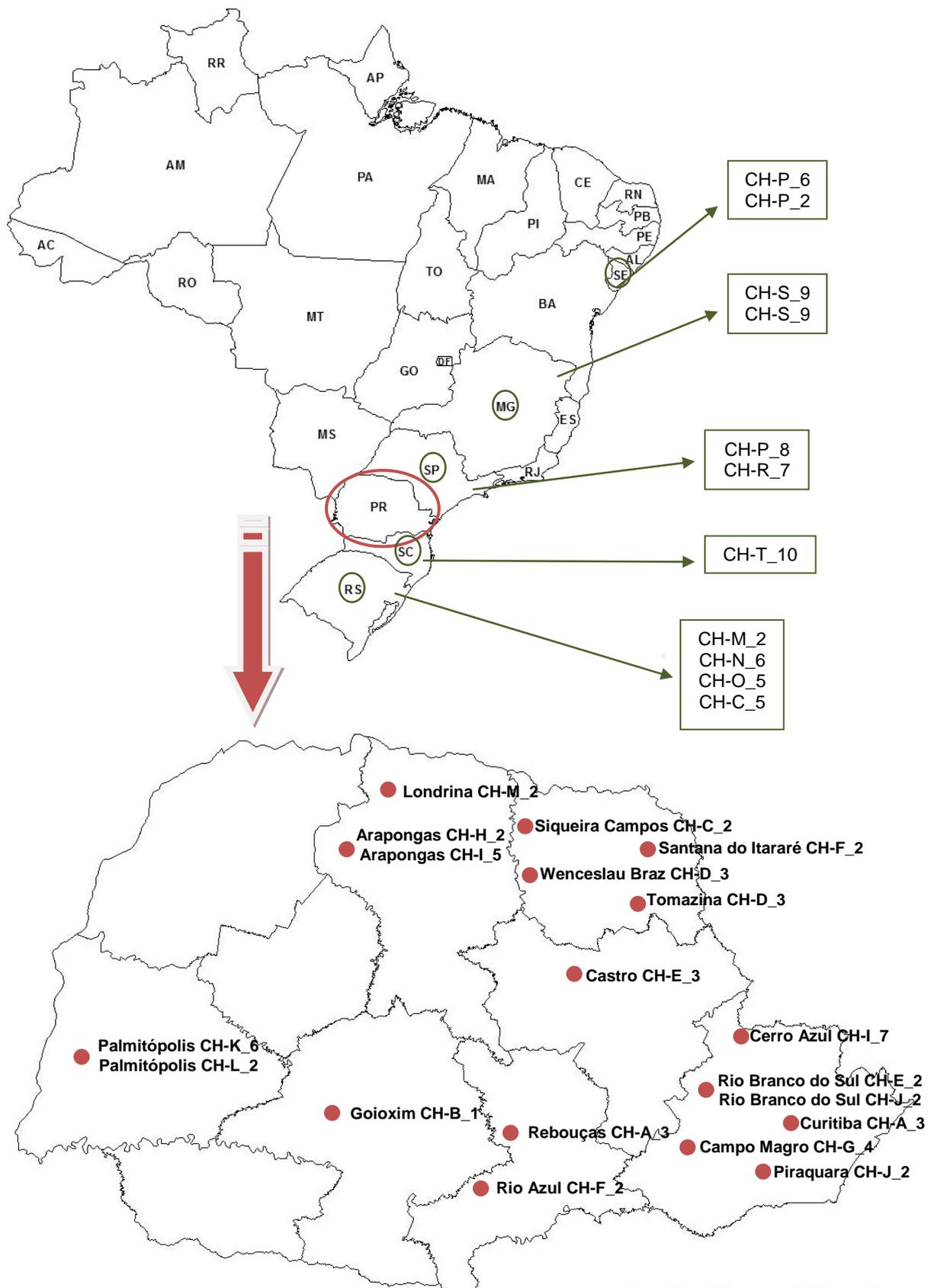


FIGURA 15 – MAPA DO BRASIL E DO ESTADO DO PARANÁ INDICANDO A DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS DOS FRAGMENTOS NUCLEOTÍDICOS ITS-1 E ITS-2 ANALISADOS DE ESPÉCIMES DE *Panstrongylus megistus*.
 FONTE: O AUTOR (2011).

5. DISCUSSÃO

Originário da Mata Atlântica, *Panstrongylus megistus* ocupa especialmente regiões de clima úmido, sem grandes amplitudes térmicas. Está associado principalmente a mamíferos como o gambá no ambiente silvestre e é espécie de grande importância na transmissão do *Tripanosoma cruzi* no Brasil, podendo colonizar peri e intradomicílios, apresentando alto potencial de reinfestação, exigindo controle e vigilância permanentes (PINTO, 2000).

Visto o alto poder invasivo de *P. megistus* em relação ao ambiente humano, encontrá-lo em ambientes peridomiciliares pode indicar a probabilidade de domiciliação desses triatomíneos no estado do Paraná (STEINDEL *et al.*, 1994). Falavigna-Guilherme *et al.* (2001) relataram o encontro de *P. megistus* em domicílio no Paraná e Guilherme *et al.* (2001) também observaram sua colonização em casas habitadas em outras regiões do Brasil.

Em razão disso, o presente estudo preocupou-se em analisar as diferentes populações de triatomíneos encontrados no Paraná, caracterizando-os molecularmente mediante o sequenciamento de marcadores de DNA ribossomal nuclear e compará-las com espécimes de outros estados. As informações obtidas poderão auxiliar à Secretaria de Saúde do Estado do Paraná e à comunidade científica para a vigilância epidemiológica e o devido controle de *P. megistus* na região.

Os marcadores moleculares permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre diversidade genética e relações filogenéticas dos indivíduos analisados (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). A utilização dos espaçadores transcritos internos do DNA ribossomal nuclear é considerada como excelente marcador molecular em sistemática, ecologia, evolução e filogenia de parasitos e vetores (MASCOMA; ESTEBAN & BARGUES, 1999). Apesar destas considerações a utilização conjunta dos espaçadores transcritos internos do DNA ribossomal nuclear para o estudo de triatomíneos ainda não é amplamente utilizado. Espécies do gênero *Panstrongylus* carecem de estudos moleculares. O único trabalho em que se utilizou esses marcadores ribossomais foi desenvolvido por Marcilla *et al.* (2002), que sequenciaram o ITS-2 de 6 espécies do gênero *Panstrongylus* provenientes de 4 países.

Até o momento a utilização conjunta dos marcadores ITS-1 e ITS-2 somente foi utilizada para análises de *Triatoma rubrovaria* (PACHECO *et al.*, 2003; KLISIEWICZ *et*

al., 2004 e PACHECO *et al.*, 2007), do subcomplexo *infestans* (BARGUES *et al.*, 2005) e para o gênero *Mepraia* (CALLEROS *et al.*, 2009).

Para os 32 espécimes analisados no presente estudo (20 deles do estado do Paraná e 12 de outros 5 estados), foram descritos 24 haplótipos (considerando as inserções/deleções) referentes aos espaçadores ITS-1 e ITS-2 em conjunto. A relação de cada localidade apresentar praticamente um diferente haplótipo também foi observada por Pacheco *et al.* (2003) para *T. rubrovaria* onde, analisando 12 espécimes de 2 localidades do sul do Brasil, descreveram 4 haplótipos. Klisiowicz *et al.* (2004) deram continuidade a esse trabalho inserindo mais 4 exemplares de *T. rubrovaria* de 2 localidades do Uruguai, descrevendo mais 3 novos haplótipos para essa espécie, e demonstrando a alta diversidade nucleotídica desses fragmentos. Para o gênero *Mepraia*, que apresenta uma sistemática incerta foram estudados 36 exemplares silvestres de diversas províncias chilenas, sendo descritos 21 haplótipos no estudo conjunto dos marcadores: 12 para ITS-1 e 16 para ITS-2. Esta relação não foi observada para o subcomplexo *infestans* (BARGUES *et al.*, 2006). Nesse estudo para 34 espécimes de *Triatoma infestans*, de 7 países, foram descritos 7 haplótipos. A relativa baixa variabilidade haplotípica para *T. infestans* foi explicada pela sua completa domiciliação nos países em que estão distribuídos. Este fato não ocorre nos insetos provenientes da Bolívia onde é considerado o centro de dispersão da espécie. Nesse país, onde ainda existe focos de populações silvestres, a variabilidade é significativamente maior, em que dos 7 haplótipos descritos para a espécie, 4 estão presentes na Bolívia. Para esse mesmo subcomplexo, *Triatoma delpontei* Romaña & Abalos, 1947 e *Triatoma platensis* são consideradas espécies morfológicamente semelhantes entre si, e compartilham sequências nucleotídicas idênticas para esses marcadores (BARGUES *et al.*, 2006).

Como justificado acima, insetos silvestres e com processo de dispersão apresentam uma maior diversidade nucleotídica para os fragmentos estudados, explicando desta forma o grande número de haplótipos para as populações paranaenses de *P. megistus*. Um estudo abrangendo diversas populações de espécimes provenientes da Bahia e de Minas Gerais, onde há uma forte domiciliação desta espécie (FORATTINI *et al.*, 1970; FORATTINI, 1980) provavelmente será detectada uma menor variabilidade.

A média do comprimento das sequências para os dois marcadores utilizados no presente estudo foi de 1361,1 pares de base (pb). Após o alinhamento completo

de todas as amostras, obteve-se o comprimento total de 1366pb. Esse resultado é muito parecido com os dados obtidos nos demais estudos de Triatominae. Para *T. rubrovaria* foi descrito 1377pb (PACHECO *et al.*, 2003; PACHECO *et al.*, 2007), para o subcomplexo *infestans* 1375pb e para o gênero *Mepraia* 1371pb (CALLEROS *et al.*, 2009).

A comparação dos dados obtidos no presente trabalho pode ser mais bem detalhada pelo segundo espaçador transcrito interno (ITS-2). Esse marcador foi utilizado separadamente para um maior número de trabalhos, o que possibilita uma melhor discussão.

No presente estudo o comprimento do fragmento de ITS-2 varia entre 597 a 600pb e sua porcentagem de A+T é de 75,2%. Marcilla *et al.* (2000) analisaram sequências nucleotídicas completas de ITS-2 do DNAr de 7 populações de *T. infestans* do Paraguai e seu comprimento foi de 458pb, muito semelhante a outras espécies da tribo Triatomini. Todos os insetos coletados no Paraguai exibiram uma sequência idêntica, com um conteúdo A+T de 78%. Quando comparados com *T. infestans* da Bolívia, em 6 populações paraguaias foram detectadas diferenças: 2 transversões e 4 nucleotídeos adicionais resultantes de um alongamento de microsatélites (AT)₂. O fato de *T. infestans* ser domiciliado explica a menor variabilidade genética quando comparado ao presente estudo, em que *P. megistus* do estado do Paraná é considerado silvestre.

Marcilla *et al.* (2001) realizaram outro estudo, também utilizando ITS-2 como marcador molecular, e dessa vez analisaram 35 insetos de 31 populações diferentes (sendo 12 espécies da tribo Triatomini e 3 espécies da tribo Rhodniini). A comparação das sequências pelos métodos de parcimônia, distância e máxima verossimilhança indicaram que ITS-2 se mostrou um marcador útil para resolver relações supraespecíficas, específicas, subespecíficas, e até mesmo ao nível populacional em Triatominae. As árvores filogenéticas mostraram uma antiga divergência nucleotídica entre Triatomini da América do Sul e aqueles da América do Norte e Central. Um futuro estudo acrescentando os resultados obtidos no presente trabalho aos de Marcilla *et al.* (2001) poderá apoiar as afirmações referentes ao ITS-2 como um bom marcador.

Marcilla *et al.* (2002) ao estudarem ITS-2 de diversas espécies do gênero *Panstrongylus*, concluíram que o grupo apresenta entre 470 a 600pb e 76,5% sua porcentagem de A+T, sendo que o espécime de *P. megistus* proveniente do estado

de Minas Gerais apresentou comprimento de 600pb. Já os insetos representantes do estado de Minas Gerais do presente estudo, apresentaram o comprimento de 597pb. Esta pequena variabilidade, em números de pares de bases, também foi observada entre os insetos do estado do Paraná.

A presença de minisatélites no ITS-1 de triatomíneos foi demonstrada para o subcomplexo *infestans*, em que repetições de 10 e 15 pares de bases encontravam-se presentes. Exemplos de *T. infestans* provenientes da Bolívia apresentaram número maior de repetições destes minisatélites (BARGUES *et al.*, 2006). O fato sugere que insetos provenientes desse país deram origem à dispersão da espécie e que no processo de domiciliação e dispersão esses minisatélites foram desaparecendo. Para os insetos analisados no presente estudo, o ITS-1 apresentou 2 sequências de 17pb absolutamente iguais, separadas por 34pb. Também para esse fragmento foi descrito outro minisatélite, observando 2 repetições de 12pb sem nenhuma interposição de base nucleotídica. O significado dessas repetições poderá ser discutido mais profundamente quando o estudo for expandido para uma distribuição mais ampla da espécie. Uma hipótese seria de que insetos domiciliados teriam menor número de repetições em tandem como demonstrado em *T. infestans*.

Microsatélites são normalmente descritos para ITS-2 (MARCILLA *et al.*, 2000; MARCILLA *et al.*, 2001; MARCILLA *et al.*, 2002; PACHECO *et al.*, 2003 e 2007 e BARGUES *et al.*, 2006) sendo também detectados no presente estudo.

O estudo filogenético não permitiu uma clara separação geográfica dos triatomíneos do estado do Paraná e os insetos provenientes dos demais estados estão em diversos ramos das árvores filogenéticas. No trabalho de Kopp *et al.* (2009), onde são analisadas isoenzimas para vários espécimes de *P. megistus*, verificou-se a falta de isolamento dos insetos provenientes de outros estados e uma não separação geográfica dos exemplares do Paraná. No entanto, a população de Minas Gerais foi agrupada com as duas populações do Paraná, e as do Rio Grande do Sul agrupadas com a de Sergipe e três do Paraná. A população de *P. megistus* de Minas Gerais que estava isolada da população de Santa Catarina já foi previamente observado por Barbosa *et al.*, 1999 e 2001. Esses autores também realizaram estudos com *P. megistus* de Pernambuco, Bahia e Rio de Janeiro, utilizando 15 sistemas isoenzimáticos e que não encontraram diferenças entre as três populações. No presente estudo as amostras referentes ao estado de Minas Gerais também estão separadas das do estado de Santa Catarina e

filogeneticamente próximas à de Arapongas-PR. Porém os 4 insetos referentes ao estado do Rio Grande do Sul estão situados em 3 diferentes localizações da árvore; tanto para a árvore construída para os dois fragmentos (ITS-1 e ITS-2) como para análises isoladas. Outro fato a ser considerado são as duas amostras referentes ao estado de São Paulo que estão em posições distantes filogeneticamente uma da outra.

Como dito anteriormente, *P. megistus* é considerado um triatomíneo proveniente de regiões úmidas e florestadas (FORATTINI *et al.*, 1977; FORATTINI, 1980). Sua dispersão é justificada pelas condições adversas de temperatura e umidade, bem como pela ação antrópica. Assim, a hipótese de que essas condições poderiam explicar a presença de diferentes linhagens de *P. megistus* no Paraná pode ser mais bem explicado com o marcador molecular ITS-2, pois o mesmo mostrou melhor clareza na distribuição dos haplótipos. É possível justificar a entrada principal do triatomíneo através da Mata Atlântica costeira, pela ampla diversidade de haplótipos no primeiro planalto paranaense. Essa entrada teria ocorrido por meio ativo, ou seja, sem a ação antrópica. Através do mapa da distribuição geográfica (FIGURA 15) observa-se que no segundo planalto paranaense é observado somente 2 haplótipos de ITS- 2 e que são coincidentes com o primeiro planalto. Já no terceiro planalto há a presença de 4 haplótipos sendo 3 deles diferentes dos demais e somente um haplótipo não encontrado em outros estados. O terceiro planalto teve uma forte imigração humana no passado, fazendo com que as regiões norte e sudoeste se transformassem em verdadeiras zonas pioneiras - pela aceleração do desmatamento, pela forte taxa de ocupação do solo destinado à agricultura e abertura de estradas, e também pela criação de vilarejos e cidades ligadas entre si (BALHANA, MACHADO & WESTPHALEN, 1969) e que pode ter recebido passivamente insetos de outros estados pela ação antrópica. O haplótipo 2 foi encontrado em todas as regiões paranaenses estudadas, bem como nos estados do Rio Grande do Sul e Sergipe. Ele pode ser considerado até o momento como sendo o haplótipo que provavelmente deu início a dispersão da espécie a partir do centro de endemismo proposto por Forattini (1980). Na região oeste paranaense também foi descrito um haplótipo que está presente no Rio grande do Sul e Sergipe. A presença de um determinado haplótipo em diferentes regiões geográficas já foi descrito como precursor da dispersão de *T. rubrovaria* (PACHECO *et al.*, 2003 e

2007), *T. infestans* (BARGUES *et al.*, 2006) e *Triatoma dimidiata* (BARGUES *et al.*, 2008).

Forattini *et al.* (1977 e 1982) discutiram em seus estudos a tendência do *P. megistus* de instalar-se no meio domiciliar. Nesse sentido, a presença de matas residuais albergando população desse triatomíneo constitui fator essencial para a invasão daquele ambiente. A domiciliação acontece com a ocupação dos anexos domiciliares para os quais ocorre acentuada preferência por parte do inseto. A regularidade ecológica da população local de *P. megistus* também se faz pelo ecletismo alimentar, com elevado percentual de fontes múltiplas para os repastos sanguíneos. O estado do Paraná apresenta a maior faixa contínua de Mata Atlântica, o que hoje representa apenas 7% de sua área original. A continuidade deste estudo é de elevada importância para o entendimento sobre o passado histórico e o futuro epidemiológico da importante espécie que se tornou *P. megistus* após a ausência prolongada de *T. infestans*.

Forattini (1982) cita: “o levantamento da enzootia no seu aspecto doméstico pode constituir-se em elemento útil na vigilância epidemiológica, nas áreas onde a transmissão domiciliar pelo *Triatoma infestans* foi interrompida graças às medidas de controle. Ela possibilitará detectar as fases iniciais da reintrodução do parasito nesse ambiente”.

Estudos com novos marcadores moleculares e a ampliação da amostra estudada possibilitará a um melhor entendimento sobre a origem e dispersão de *P. megistus*. Tais estudos poderão ter grande utilidade e fornecer várias informações para a epidemiologia da doença de Chagas no estado do Paraná e em outros estados do Brasil (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2002).

6 CONCLUSÕES

- O estudo molecular, abrangendo os espaçadores transcritos internos do DNA nuclear (ITS-1 e ITS-2) para a espécie *Panstrongylus megistus* foi pela primeira vez realizado;
- Um total de 24 haplótipos para o conjunto dos marcadores foi descrito;
- O fragmento ITS-1 apresentou 20 diferentes haplótipos e o ITS-2 10 haplótipos;
- Insetos provenientes do primeiro planalto paranaense apresentaram maior diversidade em haplótipos, sendo o segundo planalto, com dois haplótipos similares ao primeiro planalto;
- O terceiro planalto demonstrou a presença de haplótipos similares aos encontrados no Rio Grande do Sul, em Sergipe e um sem similaridade com outros insetos estudados, e ainda, o haplótipo mais descrito no primeiro planalto;
- O haplótipo CH-2 foi descrito em todos os planaltos paranaenses, bem como para Rio Grande do Sul e Sergipe e pode ser considerado o haplótipo de origem de dispersão da espécie estudada;
- Os resultados apóiam a hipótese de origem e dispersão da espécie a partir da Mata Atlântica;
- Novos estudos moleculares e a ampliação da amostra estudada deverão ser realizados para fornecer melhores informações epidemiológicas à Secretaria do Estado de Saúde do Paraná.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F. & MONTEIRO, F. A. 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **Anais Academia Brasileira de Ciências** **77** (3): 437-54;
- ARAGÃO, M. B. 1961. Aspectos climáticos da Doença de Chagas. II – Área de ocorrência do *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835). **Revista Brasileira Malariologia e Doenças Tropicais** **13**: 171-93;
- ARAGÃO, M. B. 1981. Sobre a domiciliação dos triatomíneos. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **14**: 13-27;
- BALHANA, A. P.; MACHADO, B. P.; WESTPHALEN, C. M. 1969. **História do Paraná**. Curitiba: Grafipar, vol.1;
- BARGUES, M. D.; MARCILLA, A.; DUJARDIN, J. P. & MAS-COMA, S. 2002. 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;
- BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. 2005. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analysis. **Journal Helminthology** **79**: 1-11;
- BARGUES, M. D.; KLISIEWICZ, D. R.; PANZERA, F.; NOIREAU, F.; MARCILLA, A.; PEREZ, R.; ROJAS, M. G.; O'CONNOR, J. E.; GONZÁLES-CANDELAS, F.; GALVÃO, C.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R. U.; DUJARDIN, J. P. & MAS-COMA, S. 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. **Infection, Genetics and Evolution** **6** (1): 46-62;
- BARGUES, M. D. *et al.* 2008. Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. **PLoS Neglect Tropical Disease** **2** (5): e233
- CALLEROS *et al.* 2009. Systematics of *Mepraia* (Hemiptera-Reduviidae): cytogenetic and molecular variation. **Infection, Genetics and Evolution** **10** (2010): 221–228;
- CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J. & LENT, H. 1999, vol. I, II e III. “**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. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. **Entomología y Vectores** **7** (suppl. 1): 1-99;
- CERETTI JUNIOR, W. *et al.* 2008. Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo Serviço Especial de Saúde de Araraquara, inferida de sequências do 16S rDNA mitocondrial. **Revista Brasileira de Entomologia** **52** (3);

- CECERE, M.C.; GURLER, R.E.; CANALE, D.M.; CHUIT, R.; COHEN, J.E. 2002. Effects of partial housing improvement and insecticide spraying on the reinfestation dynamics of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. **Acta Tropica**, **84** (2): 101-16;
- CHAGAS, C. 1909. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **1**: 159-218;
- COLEMAN, A. W. 2003. ITS-2 is a double-edged tool for eukaryote revolutionary comparisons. **Trends Genetics** **19** (7): 370-5;
- COSTA, C. F. F. 1940. Comunicação a respeito de triatomíneos em Curitiba. *Triatoma megista* (Burmeister, 1835). **Revista Médica do Paraná** **9**: 299 - 300;
- COURA, J. R. 2003. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, Jan. Acesso em: 06 Dec. 2010. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000967252003000100022&lng=en&nrm=iso;
- DIAS, J. C. P. 1988. Reseña histórica de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y reflexiones sobre algunos aspectos políticos y sócio-económicos de la epidemia en el contexto latinoamericano. **Revista de la Federación Argentina de Cardiología** **29**: 129-35;
- DIAS, J. C. P. & COURA, J. R. 1997. 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;
- DIAS, J. C. P. 2000. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A. & BARRALNETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p;
- DIOTAIUTI *et al.* 2008. **Triatomíneos**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz;
- DOTSON, E.M. & BEARD, C.B. 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. **Insect Molecular Biology** **10** (3): 205-15;
- DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C.J. and PANZERA, F. 2002. Los Vectores de la Enfermedad de Chagas. Investigaciones taxónomicas, biológicas y genéticas. Versión ampliada y actualizada. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Classe des Sciences naturelles et médicales, 189p;
- ELIZARI, M. V. 1999. La miocardiopatia chagásica perspectiva histórica. **Medicina (Buenos Aires)** **59**: 25-40,
- FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. *et al.* 2001. Secondary triatomines species in dwellings and other nearby structures in municipalities under epidemiological

surveillance in State of Paraná, Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública 9**: 385-392;

FERREIRA, E. L. L. 1968. Forma aguda de doença de Chagas. In: Cançado J.R., **Doença de Chagas**. Impresso Oficial Minas Gerais, Belo Horizonte;

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília, EMBRAPA - CENARGEN, 220p;

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

FORATTINI, O. P. *et al.* 1977. Aspectos ecológicos da Tripanosomíase Americana. VII – Domiciliação de *Panstrongylus megistus* e sua presença extradomiciliar. **Revista de Saúde Pública de São Paulo 11**: 73-86;

FORATTINI, O. P. *et al.* 1971. Aspectos ecológicos da Tripanossomose Americana. II – Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. **Revista de Saúde Pública de São Paulo 5**: 163-91;

FORATTINI, O. P.; BARATA, J. M. S.; DELLATORRE, C. C. and BURALLI, G. M. **Nota sobre domiciliação de *Panstrongylus megistus* no litoral Sul do Estado de São Paulo, Brasil**. Revista de Saúde Pública [online]. 1982, vol.16, n.2, pp. 127-131;

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

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

GALVAO, C. *et al.* 1998. Distribuição Geográfica e Dispersão Alti-latitudinal de Alguns Gêneros e Espécies da Tribo Triatomini Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, Jan. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761998000100007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 16 May 2011;

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

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

- GARCIA, B. A.; MANFREDI, C.; FICHERA, L.; SEGURA, E. L., 2003. Short report: variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **68**: 692-694;
- GORLA, D. E.; DUJARDIN, J. P.; SCHOFIELD, C. J. 1997. Biosystematics of Old World Triatominae. **Acta Tropica** **63**: 127-140;
- GUILHERME, A. L. F. *et al.* 2001. *Panstrongylus megistus* in artificial ecotopes on islands of the Paraná River. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 5;
- GUHL, F.; SCHOFIELD, C. J. 1996. Population genetics and control of Triatominae. **Parasitology Today** **12**: 169-70;
- GUHL, F.; PINTO, N.; AGUILERA, G. 2009. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104 (Suppl. 1): 71-75;
- JUSTINO, H. H. G. 2004. **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;
- KOHLHEPP, G. 2002. **Conflitos de interesse no ordenamento territorial da Amazônia brasileira**. Estudos avançados, São Paulo, v. 16, n. 45. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01030142002000200004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 Jan 2011;
- KLISIEWICZ, D. R. *et al.* 2004. Molecular discrimination between *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) populations based on sequence analyses of the ribosomal DNA intergenic region. In: **Symposium Trypanosomes, Triatomine and Chagas disease: basic knowledge and applied research**;
- KOPP, R. L. *et al.* 2009. Phenetic analysis of *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the State of Paraná-Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 2;
- LENT, H.; WYGODZINSKY, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American Museum of Natural History** **163**: 123-520;
- LOBO, A. G. S.; BORBA, A. M.; SOUZA, J. 1953. Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica dos triatomíneos domiciliários e seus índices de infecção natural pelo *Schizotrypanum cruzi* no Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 571-584;
- LUZ, E. 1976. Focos silvestres do *Trypanosoma cruzi* no Litoral e Primeiro Planalto Paranaense. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná** **19**: 7-15;

LUZ, E.; BORBA, A. M. 1966. Triatomíneos encontrados no Paraná. Aspectos biológicos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Paraná** **9/10** (1-2): 165 - 172, 1966;

LYMAN, D.F.; MONTEIRO, F.A.; ESCALANTE, A.A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D.M.; DUJARDIN, J.P. & BEARD, C.B. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **60** (3): 377-86;

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. 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution** **1**: 225-35;

MARCILLA, A.; CANESE, A.; ACOSTA, N.; LOPEZ, E.; ROJAS DE ARIAS, A.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S., 2000 a. Population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Paraguay: A molecular analysis base on the second internal transcribed spacer of the rDNA. **Research and Reviews in Parasitology** **60** (3-4): 99-105;

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

MAS-COMA, M. S.; ESTEBAN, J. G.; BARGUES, M. D. 1999. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. **Bulletin of the World Health Organization** **77** (4);

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

MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J. & BEARD, C.B. 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **62**: 460-5;

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;

MOURA, A., LUZ, E., CORRÊA-LIMA, E., BORBA, A. M., CHRISTAN, A., VEIGA, A. A.. 1969. Cardiopatia chagásica de origem silvestre no litoral paranaense. Estudo

epidemiológico da área. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **11**: 408 - 424;

OPS - ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2004. Definición de variables y criterios de riesgos para la caracterización e identificación de áreas prioritarias en el control y vigilancia de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas. **Pan American Health Organization/dpc/cd/302/04.30p**;

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

PACHECO, R. S.; ALMEIDA, C. E.; KLISIEWICZ, D. R.; COSTA, J.; PIRES, M. Q.; PANZERA, F.; BAR, M. E.; MAS-COMA, S.; BARGUES, M. E. 2007. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. **Parasite** **14**: 231–237;

PICCINALI, R. V. *et al.* 2009. Molecular Population Genetics and Phylogeography of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in South America. **Journal of Medical Entomology** **46** (4): 796-809;

PINTO, P. L. S. 2000. **Circulação e caracterização de *Trypanosoma cruzi* isolados de mamíferos silvestres capturados no Estado de São Paulo, Brasil.** Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo;

RUAS-NETO, A. L.; KRUG, L. 1995. Epidemiologia da doença de Chagas no Rio Grande do Sul: a distribuição vetorial. **Boletim de la Sociedad Zoologica del Uruguay**, Montevideu, 9 (Segunda época) p. 20-32;

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

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

SEGURA, E. L.; TORRES, A. G.; FUSCO, O.; GARCÍA, B. A. 2009. Mitochondrial 16S DNA variation in populations of *Triatoma infestans* from Argentina. **Medical and Veterinary Entomology** **23**: 34–40;

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

SCHMUNIS, G.A.; YADON, Z. E. 2009. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**;

SCHOFIELD, C. J. & GALVÃO, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta Tropica** **110** (2-3): 88-100;

- SCHOFIELD, C. J.; KABAYO, J. P. 2008. Trypanosomiasis vector control in Africa and Latin America. **Parasitologia de Vectores 1**: 24;
- STEINDEL, M. *et al.* 1994. Colonization of artificial ecotopes by *Panstrongylus megistus* in Santa Catarina Island, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 36**: 43–50.
- SILVEIRA, A. C.; REZENDE, D. F. 1984. Risk measure of domestic transmission of Chagas' disease, through a new entomological indicator. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 79**: 51-53;
- SILVEIRA, A. C. 2003. Modelos factibles de vigilancia de la enfermedad de Chagas. **Revista Patologia Tropical 32**: 175-184;
- SILVEIRA, C. S.; FEITOSA, V. R.; BORGES, R., 1984. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975/83, Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais 36**: 15 – 312;
- SILVEIRA, A.C., 2000. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. **Cadernos de Saúde Pública 16** (2): 35-42;
- SILVEIRA, A. C. *et al.* 2002. **El control de la enfermedad de Chagas en los Países del Cono Sur de America**. Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro – Brasil;
- SIMÕES, A. J. P. 1943. Doença de Chagas no Estado do Paraná, Brasil. Esboço Epidemiológico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 39**: 279-290;
- SOUZA-ARAÚJO, H. C. 1954. A doença de Chagas no Paraná. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 52**: 477-485;
- STADEN, R, JUDGE D.P.; BONFIELD, J.K., 2001. Sequence assembly and finishing methods. **Methods of Biochemical Analysis 43**: 303-22;
- SWAIN, T. N. 1988. Fronteiras do Paraná: da colonização à migração. In: ALBERTIN, Catherine. **Organização Fronteiras**. Brasília/Paris, Ed. UNB/ORSTOM;
- TAMURA, K. *et al.* 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**;
- TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CERON, C. R. 2004. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arquivos de Ciências da Saúde 11** (1): 44-47;
- TAVARES, M. C. 1972. **Da substituição de importações ao capitalismo financeiro: ensaios sobre a economia brasileira**. Rio de Janeiro: Zahar;

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* 2002. *Trypanosoma cruzi*: isoenzyme analysis suggests the presence of an active Chagas sylvatic cycle of recent origin in Paraná State, Brazil. **Experimental Parasitology** **100**: 81-86.

VAZQUEZ-PROKOPEC, G. M.; CEBALLOS, L. A.; KITRON, U.; GURTLER, R.E., 2004. Active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural northwestern Argentina. **Journal of Medical Entomology** **41** (4): 614-21;

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

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. **WHO Technical Report Series**. No. 905, Geneva;

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2007. Grupo de trabalho científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR/GTC/09, Geneve;

ZEVIANI, M.; TIRANTI, V.; PIANTADOSI, C. 1998. Mitochondrial disorders. **Medicine** **77**: 59-72;

<http://www.guiageo-parana.com/regiao-metropolitana.htm>. <acesso em: 15 de maio de 2011>;

<http://www.tamandare.pr.gov.br/secretarias/template.php?secretaria=gabinete&sessao=historia>. <acesso em: 22 de março de 2011>;

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Cidade_Industrial_\(Curitiba\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Cidade_Industrial_(Curitiba))). <acesso em: 22 de março de 2011>;

<http://prefeituradecampomagro.blogspot.com/p/nosso-municipio.html>. <acesso em: 22 de março de 2011>.

<http://marcosbau.com/geobrasil-2/biomas-brasileiros/>. <acesso em: 30 de julho de 2011>.