

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Triatoma infestans e Triatoma brasiliensis: avaliação da resistência ao
piretróide deltametrina e análise intraespecífica da variabilidade genética

por

Ivan Vieira Sonoda

Belo Horizonte

maio/2009

TESE DBCM-CPqRR

I.V. SONODA

2009

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis: avaliação da resistência ao
piretróide deltametrina e análise intraespecífica da variabilidade genética

por

Ivan Vieira Sonoda

Tese apresentada com vistas à obtenção
do Título de Doutor em Ciências na área
de concentração Biologia Celular e
Molecular

Orientação: Dra. Liléia Gonçalves
Diotaiuti

Co-orientação: Dr. Alvaro José Romanha
e Dr. João Carlos Pinto Dias

Belo Horizonte
maio/2009

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S698t
2009 Sonoda, Ivan Vieira.

Triatoma infestans e *Triatoma brasiliensis*:
avaliação da resistência ao piretróide deltametrina e
análise intraespecífica da variabilidade genética /
Triatoma infestans and *Triatoma brasiliensis*:
evaluation of the resistance to pyrethroid deltamethrin
and intraspecific analysis of the genetic variability /
Ivan Vieira Sonoda. – Belo Horizonte, 2009.

XVI, 80 f. il. ; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 83 - 96

Tese – Tese para obtenção do título de Doutor em
Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em
Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René
Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e
Molecular.

1. Doença de Chagas/prevenção & controle 2.
Triatoma/crescimento & desenvolvimento 3.
Triatoma/genética 4. Inseticidas/efeitos adversos I.
Título II. Diotaiuti, Liléia Gonçalves (Orientação). III.
Romanha, Alvaro José (Co-orientação). IV. Dias, João
Carlos Pinto (Co-orientação)

CDD – 22. ed. - 616.936 3

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis: avaliação da resistência ao
piretróide deltametrina e análise intraespecífica da variabilidade genética

por

Ivan Vieira Sonoda

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti (Presidente)

Dra. Roberta Lima Caldeira

Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

Dra. Dalva Mascarenhas

Dr. Evandro Marques de Menezes

Suplente: Dr. Nilton Barnabé Rodrigues

Tese defendida e aprovada em: 21/05/2009

Às minhas filhas, Marina e Jara,
que tanto me inspiram..

Agradecimentos

Agradeço acima de tudo à minha família por todo o apoio e amor. Em especial à minha esposa Lucineide que sempre me apoiou em todos os momentos;

Agradeço à minha orientadora, Dra. Liléia Diotaiuti, pela oportunidade de trabalho, por todos os ensinamentos nestes quatro anos e principalmente pela paciência, respeito e amizade;

Agradeço aos meus co-orientadores, Dr. Alvaro Romanha e Dr. João Carlos por toda ajuda durante o trabalho;

Agradeço à Fapemig e Fiocruz pelo apoio financeiro para a realização deste estudo;

Agradeço às Secretarias de Saúde do Rio Grande do Sul e do Ceará pela disponibilidade de triatomíneos para a realização deste estudo, em especial a Célia Lammerhist e Cláudia Menezes;

Agradeço à Bayer pela disponibilidade de inseticidas piretróides que foram utilizados no estudo;

Agradeço à Letícia e Grazielle por toda ajuda do desenvolvimento deste estudo;

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório pelos momentos felizes. Em especial a João Paulo e Marcos pela amizade, que certamente será duradoura;

Agradeço à Inês Mascarenhas por toda ajuda no dia-a-dia;

Agradeço a todos os colegas do Centro de Pesquisas René Rachou pela amizade. Em especial a Simone, Flávio, Elisângela, Rômulo e Nilton;

Agradeço às ex-coordenadoras do Programa de Pós-Graduação, Dra. Virginia Schall e Dra. Cristiana Ferreira, bem como ao novo coordenador Dr. Paulo Pimenta pelo esforço e organização do curso;

Agradeço às secretárias do Programa de Pós-Graduação, Cristiane Gomes e Andréa Dias, pela atenção em todos os momentos necessários;

Agradeço à Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma;

A todos, muito obrigado!

Sumário

Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	XI
Lista de abreviaturas e símbolos	XIII
Resumo	XV
Abstract	XVI
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2 Específicos	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	22
3.1 Doença de Chagas	22
3.1.1 Epidemiologia	23
3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
3.3 Biologia de triatomíneos	24
3.4 <i>Triatoma infestans</i>	25
3.4.1 Variabilidade genética de <i>Triatoma infestans</i>	26
3.5 <i>Triatoma brasiliensis</i>	28
3.5.1 Variabilidade genética de <i>Triatoma brasiliensis</i>	29
3.6 Controle da doença de Chagas	31
3.7 Resistência de triatomíneos a inseticidas	33
4 MÉTODOS	36
4.1 Triatomíneos estudados	36
4.1.1 <i>Triatoma infestans</i>	36
4.1.2 <i>Triatoma brasiliensis</i>	37
4.2 Ensaio biológicos	38
4.2.1 Inseticida utilizado	38
4.2.2 Procedimentos no ensaio	39
4.2.3 Avaliação da resistência	40
4.3 Estudo da variabilidade genética de <i>Triatoma infestans</i> e <i>Triatoma brasiliensis</i>	40
4.3.1 Extração de DNA e PCR	40
4.3.2 Sequenciamento e genotipagem	42

4.3.3 Genética de populações	42
5 RESULTADOS	45
5.1 Ensaio com Inseticida	45
5.1.1 <i>Triatoma infestans</i>	45
5.1.2 <i>Triatoma brasiliensis</i>	46
5.2 Variabilidade genética de <i>Triatoma infestans</i>	47
5.2.1 Variabilidade genética do gene <i>cytB</i>	47
5.2.2 Variabilidade genética dos loci de microssatélites	53
5.3 Variabilidade genética de <i>Triatoma brasiliensis</i>	57
6 DISCUSSÃO	62
6.1 Resistência de triatomíneos a deltametrina	62
6.2 Variabilidade genética de <i>Triatoma infestans</i>	65
6.3 Variabilidade genética de <i>Triatoma brasiliensis</i>	71
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	74
8 ANEXO	76
9 REFERÊNCIAS	83

Lista de figuras

Figura 1: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. a) tripomastigota em lâmina de sangue; b) epimastigota em meio de cultura e c) amastigotas no interior de célula muscular. Fonte: WHO/TDR (www.who.int/tdr - acessado dia 15/04/2009). 24

Figura 2: Principais triatomíneos de importância epidemiológica na doença de Chagas nas Américas: a) *Triatoma infestans*, b) *Triatoma brasiliensis*, c) *Triatoma sordida*, d) *Triatoma pseudomaculata*, e) *Triatoma dimidiata*, f) *Panstrongylus megystus* e g) *Rhodnius prolixus*. Fonte: Msc. Angélica de Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ). 25

Figura 3: Formas cromáticas descritas para *Triatoma brasiliensis*. a) brasiliensis, b) melanica, c) macromelasoma e d) juazeiro. Fonte: Instituto Oswaldo Cruz (www.fiocruz.br/ioc - Acessado dia 15/04/2009). 30

Figura 4: Mapa do Estado do Rio Grande do Sul evidenciando as localidades de obtenção dos *Triatoma infestans*: 1 - Doutor Maurício Cardoso (27°30'21"S / 54°21'39"W), 2 - Três de Maio (27°46'24"S / 54°14'24"W), 3 - Guarani das Missões (28°08'27"S / 54°33'29"W), e 4 - Mato Queimado (28°15'21"S / 54°36'57"W). Fonte: Wikipedia (www.wikipedia.org – acessado dia 15/04/2009). 36

Figura 5: Mapa do Estado do Ceará evidenciando o município de Tauá (em cinza). Fonte: Wikipedia (www.wikipedia.org – acessado dia 15/04/2009). 38

Figura 6: DL50 e RR observadas para as amostras de *Triatoma infestans* estudadas. Os valores também são mostrados na tabela 2. 46

Figura 7: DL50 e RR observadas para as amostras de *Triatoma brasiliensis* estudadas. Os valores também são mostrados na tabela 3. 47

Figura 8: Network dos haplótipos do gene mitocondrial *cytB* observados nos *Triatoma infestans* do Brasil, Argentina e Bolívia. As elipses representam os haplótipos, e a área delas a frequência dos haplótipos. Os círculos menores

representam haplótipos perdidos ou não amostrados, necessários para a correta conexão dos haplótipos estudados. 52

Figura 9: Network dos haplótipos do gene mitocondrial *cytB* observados nos *Triatoma brasiliensis* do município de Tauá, Estado do Ceará. As elipses representam os haplótipos e os pontos representam haplótipos perdidos ou não amostrados, necessários para a correta conexão dos haplótipos estudados. a) Network representando os números de cada haplótipo. b) Representação dos ambientes de obtenção dos exemplares. Verde: ambiente silvestre; Amarelo: ambiente peridomiciliar e; Vermelho: ambiente intradomiciliar. 60

Figura 10: Dendrograma neighbor-joining dos haplótipos do gene mitocondrial *cytB* de *Triatoma brasiliensis* do município de Tauá comparados com haplótipos previamente descritos para os quatro fenótipos de *T. brasiliensis* (*brasiliensis*, *macromelasoma*, *juazeiro* e *melanica*). *Triatoma infestans* foi utilizado como grupo irmão e *Rhodnius prolixus* como grupo externo. Os números representam os 50 haplótipos descritos neste trabalho. As letras são os haplótipos previamente descritos (Monteiro *et al.*, 2004). 61

Figura 11: Esquema da proteína Canal de Sódio evidenciando os quatro domínios constituídos cada um por seis hélices transmembrana. Os domínios se dobram para formar um poro na membrana celular. Fonte: Soderlund e Knipple (2003). 68

Lista de tabelas

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação dos 10 loci de microsatélite em <i>Triatoma infestans</i> .	41
Tabela 2: Valores de DL50, Slope e RR para <i>Triatoma infestans</i> do Rio Grande do Sul, Montes Claros, Posse e Yacuiba.	45
Tabela 3: Valores de DL50, Slope e RR para populações de <i>Triatoma brasiliensis</i> do Estado do Ceará, Nordeste do Brasil.	46
Tabela 4: AMOVA para as amostras de <i>Triatoma infestans</i> estudadas calculadas com base nas sequências do gene mitocondrial <i>cytB</i> .	48
Tabela 5: Variabilidade genética de sequências do gene mitocondrial <i>cytB</i> em populações de <i>Triatoma infestans</i> do Brasil, Argentina e Bolívia.	50
Tabela 6: Testes de neutralidade calculados para as populações de <i>Triatoma infestans</i> do Brasil, Argentina e Bolívia, através de sequências do gene mitocondrial <i>cytB</i> .	50
Tabela 7: Frequência dos haplótipos do gene mitocondrial <i>cytB</i> observados nas populações de <i>Triatoma infestans</i> estudadas.	51
Tabela 8: F_{ST} pareado entre as amostras de <i>Triatoma infestans</i> estudadas, calculados através das sequências do gene mitocondrial <i>cytB</i> .	53
Tabela 9: Variabilidade genética de 10 loci de microsatélites em populações de <i>Triatoma infestans</i> do Brasil, Argentina e Bolívia.	53
Tabela 10: Variação genética apresentada pelos 10 loci de microsatélite nas populações de <i>Triatoma infestans</i> estudadas.	54

Tabela 11: Relação dos alelos observados nos 10 loci de microssatélite nas populações de <i>Triatoma infestans</i> estudadas.	55
Tabela 12: AMOVA para as amostras de <i>Triatoma infestans</i> estudadas através dos 10 loci de microssatélite.	56
Tabela 13: F_{ST} pareado entre as amostras de <i>Triatoma infestans</i> estudadas, calculados através dos 10 loci de microssatélite.	57
Tabela 14: AMOVA para as amostras de <i>Triatoma brasiliensis</i> do município de Tauá, Estado do Ceará, calculada através das sequências do gene mitocondrial <i>cytB</i> .	58
Tabela 15: Variabilidade genética do gene mitocondrial <i>cytB</i> em <i>Triatoma brasiliensis</i> do município de Tauá, Estado do Ceará.	58
Tabela 16: Testes de neutralidade calculados para as populações de <i>Triatoma brasiliensis</i> do Município de Tauá, através de sequências do gene mitocondrial <i>cytB</i> .	59

Lista de abreviaturas e símbolos

\bar{D} - Número Médio de Diferenças Pareadas;

H - Diversidade de Nucleotídeos;

S - Número de Singletons;

AMOVA - Analysis of Molecular Variance (Análise de Variância Molecular);

AVAI - Anos de Vida Ajustados à Incapacidade;

HCH – Hexaclorobenzeno (BHC);

Bti - Toxina Botulínica;

CGLAB - Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública;

CIPEIN - *Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas*;

CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou;

cytB - Gene mitocondrial do citocromo B;

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano;

DL50 - Dose Letal 50%;

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético);

F1 - Primeira Geração;

F2 - Segunda Geração;

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz;

F_{SC} , F_{CT} e F_{ST} - Índices de Endocruzamento;

\hat{H} - Diversidade Genética;

H - Número de Haplótipos;

H_e - Heterozigosidade Esperada;

H_o - Heterozigosidade Observada;

kdr - *Knockdown Resistance* (Resistência Knockdown).

LATEC - Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas;

MS - Ministério da Saúde;

N_a - Número de Alelos;

OPAS - Organização Panamericana da Saúde;

PCDCH - Programa de Controle da Doença de Chagas;

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase);

RAPD - Random Amplified Polimorphic DNA (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente);

RR - Razão de Resistência;

RT-PCR - *Reverse Transcriptase* PCR (Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa);

S - Número de Sítios Polimórficos;

SES-CE - Secretaria de Estado de Saúde do Ceará;

SES-RS - Secretaria do Estado de Saúde do Rio Grande do Sul;

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde;

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro;

UV - Ultra Violeta;

WHO - World Health Organization (Organização Mundial da Saúde);

Resumo

O Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) teve suas atividades iniciadas por volta da década de 1960 em âmbito nacional. Em 1991, com a Iniciativa dos Países do Cone Sul, o PCDCh passou a priorizar as áreas de ocorrência do *Triatoma infestans*, enquanto a vigilância epidemiológica era implantada nas áreas já sob controle da transmissão vetorial. A utilização de inseticidas piretróides nas atividades de controle permitiram ao PCDCh obter resultados satisfatórios, como a interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas em amplas áreas. A preocupação atual refere-se à possibilidade de desenvolvimento de resistência aos inseticidas utilizados devido à existência de uma região abrangendo o norte da Argentina e o sul da Bolívia onde *T. infestans* apresenta-se resistente aos piretróides. Além disso, outras espécies de triatomíneos já foram descritas com resistência inicial a estes inseticidas (ex. *Rhodnius prolixus* na Venezuela e *Triatoma sordida* em Minas Gerais). Estas informações nos impulsionaram a avaliar as populações remanescentes de *T. infestans* do Rio Grande do Sul, comparando-as com amostras resistentes da Argentina e Bolívia, e amostras de *Triatoma brasiliensis* do Ceará, através de ensaios com o piretróide deltametrina. Complementarmente, foi estudada a variabilidade genética das populações através de sequências do gene mitocondrial *cytB* e microssatélites. Os resultados dos ensaios com deltametrina demonstraram que todas as amostras de *T. infestans* e *T. brasiliensis* do Brasil apresentaram-se suscetíveis ao inseticida. A variabilidade genética para *T. infestans* foi baixa, com valores muito inferiores aos observados em *T. brasiliensis*. Também foi verificado que a variabilidade genética demonstrada através dos loci de microssatélites em *T. infestans* foi muito maior que a apresentada pelas sequências do gene *cytB*. Apesar disso, a análise das sequências deste gene se mostrou adequada para avaliar a diferenciação genética das populações. Em nosso trabalho foram observados valores de resistência menores dos já descritos para *T. infestans* do Rio Grande do Sul e da Bolívia. Estas diferenças indicam que o fenômeno de resistência é muito mais complexo do que se imaginava, e por isso merece maior atenção.

Abstract

Chagas disease control program (CDCP) had its activities started about 1960's. In 1991, based on the Southern Cone Initiative, the CDCP prioritized the areas of *Triatoma infestans*, while the epidemiologic vigilance was established on areas under controlled vectorial transmission. The use of pyrethroids insecticides on control campaign allowed the CDCP to get great results, like the interruption of vectorial transmission of Chagas disease in wide areas. The current concern is related to the possibility of development of resistance to the used insecticides, due to the existence of a region including the northern Argentine and southern Bolivia, where *T. infestans* present high resistance to pyrethroids. Moreover, other triatomine species were already described having initial resistance to these insecticides (ex. *Rhodnius prolixus* from Venezuela and *Triatoma sordida* from Minas Gerais). These information stimulate us to evaluate the remainder *T. infestans* populations from Rio Grande do Sul, comparing them against the insecticide resistant samples from Argentina and Bolivia, and samples from *Triatoma brasiliensis* from Ceara, through bioassays using the pyrethroid deltamethrin. Complementarily, was studied the genetic variability through mitochondrial cytb gene sequences and microsatelites. The results were encouraging, demonstrating that all evaluated samples of *T. infestans* and *T. brasiliensis* from Brazil presented susceptibility to tested insecticides. The observed genetic variability to *T. infestans* were little, very lesser than that observed to *T. brasiliensis*. It was also observed that the genetic variability of the microsatelite loci from *T. infestans* was very bigger than demonstrated by cytb gene sequences. In spite of this, the analysis of the cytb sequences was more indicated to analyze the genetic differentiation among populations. In this work was observed lower resistance ratios in *T. infestans* from Rio Grande do Sul and Bolivia, in comparison to the already observed. These differences indicated that the phenomenon of resistance is much more complex, and due to this it needs to have more attention.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma antropozoonose endêmica na América Latina que afeta aproximadamente 9 milhões de pessoas com outras 40 milhões em risco de contraí-la (Schofield *et al.*, 2006). Ela é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, que é transmitido ao homem através das fezes dos hemípteros triatomíneos infectados (WHO, 2002). A doença afeta o tecido nervoso autônomo e os tecidos musculares lisos do coração, esôfago e cólon, além de comprometer o sistema nervoso periférico. Estas lesões desencadeiam diversas complicações do sistema circulatório e digestivo (revistas por Moncayo, 1999, Pুনukollu *et al.*, 2004).

As principais estratégias para o controle da doença de Chagas são baseadas na interrupção da transmissão vetorial, principalmente pelo combate aos triatomíneos vetores utilizando inseticidas residuais aplicados nas residências onde tenha sido encontrada alguma espécie de triatomíneo. As atividades de controle no Brasil foram iniciadas por volta de 1950, pelo então Serviço Nacional de Malária, mas só tiveram um alcance nacional a partir de 1975 (Vinhaes e Dias, 2000). Estas atividades alcançaram o máximo da operacionalidade nos anos 80, mas a partir de 1986 o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH) sofreu redução das suas atividades devido ao surgimento de epidemias de dengue, sendo, porém, mantidas as atividades de borrifação das residências infestadas em amplas áreas do país. Em 1991, com a Iniciativa dos Países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai), o PCDCH passou a priorizar as áreas de ocorrência do *Triatoma infestans*, principal espécie domiciliada, enquanto a vigilância epidemiológica era implantada nas áreas já sob controle da transmissão vetorial (Dias *et al.*, 2002; WHO, 2002).

As características biológicas e epidemiológicas das diferentes espécies de triatomíneos são fatores decisivos para o sucesso do controle da doença de Chagas. Tais características foram revisadas por Silveira (2000) e servem para orientar as operações de controle e explicar os quadros epidemiológicos nas diferentes regiões. São elas: (1) capacidade de adaptação ao ambiente domiciliar: as espécies estritamente domiciliares, tais como *T. infestans* no Brasil, são as principais responsáveis pela transmissão da doença ao homem, uma vez que realizam repasto sanguíneo constante neste hospedeiro; (2) antropofilia: apenas as espécies de triatomíneos que se alimentam no homem seriam responsáveis pela transmissão da doença; (3) infectividade e/ou tempo entre repasto e dejeção: nas áreas onde a taxa

de triatomíneos infectados é muito baixa, quase nula, é muito difícil ocorrer a transmissão da doença ao homem. O tempo entre o repasto sanguíneo e a dejeção também é importante para a transmissão da doença, uma vez que as fezes com os parasitas devem ter contato com o hospedeiro, assim, aquelas espécies que defecam quase imediatamente ao repasto seriam as mais importantes na transmissão; (4) área de origem das espécies: os triatomíneos podem ser considerados como nativos ou introduzidos. As espécies nativas são aquelas autóctones daquele ecossistema natural e podem reinvidir e/ou recolonizar as residências que sofreram tratamento com inseticidas. As espécies introduzidas são, ao contrário, estranhas àquele ambiente silvestre e estão naquela área devido ao transporte passivo. Estas são passíveis de eliminação, uma vez que as populações, por não estarem no ambiente silvestre, não serão capazes de reinfestar as moradias tratadas com inseticidas.

O uso de inseticidas residuais no combate a triatomíneos foi demonstrado pela primeira vez no final da década de 40 (Dias e Pellegrino, 1948) com a utilização do inseticida organoclorado hexaclorobenzeno (HCH ou BHC). A partir da disponibilidade técnica deste produto, foi possível elaborar programas de controle em larga escala. Os resultados destas atividades se mostraram excelentes, tendo-se obtido com este produto a interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas em amplas áreas. Em meados da década de 80 o uso agrícola do BHC foi proibido, devido a sua grande toxicidade ao meio ambiente, inviabilizando sua produção para fins comerciais. Felizmente, neste momento, a eficácia de vários piretróides havia sido comprovada no combate aos triatomíneos, e estes inseticidas passaram a ser utilizados na rotina do PCDCH (Diotaiuti *et al.*, 1994; Dias, 2002).

Os primeiros países a se declararem livres da transmissão vetorial foram o Uruguai e o Chile em 1997 e 1999, respectivamente (WHO, 2002). Em 9 de Junho de 2006 o Brasil foi formalmente declarado ser livre da transmissão vetorial, promovida pelo *T. infestans*, e da transmissão transfusional da doença de Chagas (Schofield *et al.*, 2006). Com o controle do *T. infestans*, outras espécies de triatomíneos consideradas até então de importância secundária na transmissão do *T. cruzi* passaram a ganhar maior atenção (Costa *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2002), principalmente aquelas espécies nativas que ocupam predominantemente o peridomicílio, dificultando o seu controle (Noireau *et al.*, 2005).

O *Triatoma brasiliensis* é a espécie autóctone de triatomíneo mais importante no Nordeste do Brasil, sendo encontrada principalmente na região do

semi-árido (Dias *et al.*, 2000; Silveira e Vinhaes, 1999). Este triatomíneo é nativo desta região do país, sendo seu controle complicado (Diotaiuti *et al.*, 2000), uma vez que populações silvestres invadem constantemente as residências próximas que foram tratadas com inseticidas (Diotaiuti *et al.*, 2000).

Os dados atuais sobre a incidência da doença de Chagas são muito animadores. Ao longo de pouco mais de 15 anos foi conseguida a redução da prevalência da doença nas Américas, de aproximadamente 18 milhões para atuais 9 milhões de infectados (Schofield *et al.*, 2006). Outra grande conquista foi a redução da área de ocorrência do *T. infestans* no Brasil a focos restritos na Bahia e Rio Grande do Sul.

Apesar das medidas de controle terem sido baseadas nas características biológicas e ecológicas do *T. infestans*, uma espécie bem adaptada ao ambiente domiciliar, espécies autóctones que apresentam comportamento ubiquista exigem estratégias de controle adaptadas a diferentes condições, uma vez que estes vetores podem reinfestar as moradias a partir de populações silvestres.

Outra preocupação no combate aos triatomíneos refere-se ao desenvolvimento de resistência a inseticidas, uma vez que foram descritas mais de 500 espécies de insetos e ácaros com resistência a uma ou mais classes de inseticida (Feyereisen, 1995; Brogdon e McAllister, 1998).

Poucos estudos sobre resistência a inseticidas foram realizados com triatomíneos. A primeira evidência de resistência a inseticida nestes insetos foi relatada na Venezuela, na década de 70, em áreas de ocorrência de *Rhodnius prolixus* tratadas seguidamente com dieldrin (Rocha e Silva, 1979). Apesar deste trabalho pioneiro, os primeiros resultados de resistência aos inseticidas piretróides, que são utilizados no controle destes insetos, foram obtidos pelo *Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas* (CIPEIN), em Buenos Aires, na década de 1990 (Vassena *et al.*, 2000). Neste trabalho foram estudados *R. prolixus* oriundos da Venezuela e *T. infestans* do Brasil, especificamente do Estado do Rio Grande do Sul. Os autores encontraram valores de razão de resistência (RR) que caracterizaram as populações como possuindo resistência inicial. Com a realização destes estudos aumentou ainda mais o interesse de investigar a ocorrência de resistência a piretróides em triatomíneos, especificamente em *T. infestans*.

Atualmente a resistência a inseticidas em *T. infestans* é encontrada na Argentina e na Bolívia (Zerba e Picollo, 2007). No primeiro país os *T. infestans* resistentes são encontrados principalmente na Província de Salta, e no segundo

país, nos Departamentos de Potosí, Chuquisaca, Cochabamba e Tarija, e uma vez que não são avaliadas populações de *T. infestans*, e outras espécies, em outros países, existe a necessidade de estudos complementares que possam melhor definir a frequência com que a resistência a piretróides ocorre em diferentes regiões e espécies de triatomíneos. Recentemente, Pessoa *et al.* (2007) avaliaram populações de *Triatoma sordida* de Minas Gerais, encontrando valores para algumas amostras que a caracterizaram como possuindo resistência inicial ao piretróide deltametrina. Com esse estudo, ficou ainda mais evidente que o uso prolongado desta classe de inseticidas (piretróides) no controle de triatomíneos no Brasil (mais de 20 anos), pode ter selecionado populações com resistência ou suscetibilidade alterada a estes inseticidas. A ampliação da área de ocorrência destas populações pode comprometer severamente o sucesso do PCDCh.

Nosso trabalho pretende analisar estas possibilidades, através de dupla abordagem, qual seja o estudo da resistência de duas espécies de triatomíneos de importância epidemiológica na epidemiologia da doença de Chagas no Brasil, o *Triatoma infestans* e o *Triatoma brasiliensis*, e avaliação, em paralelo, da variabilidade genética das mesmas populações utilizando um fragmento do gene mitocondrial *cytB* e 10 loci de microssatélites.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a resistência de *Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis* ao piretróide deltametrina e avaliar a variabilidade genética destas populações.

2.2 Específicos

Avaliar amostras de *T. infestans* do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Goiás quanto à resistência e/ou suscetibilidade ao piretróide deltametrina;

Avaliar amostras de *T. brasiliensis* do Ceará quanto à resistência e/ou suscetibilidade ao piretróide deltametrina;

Aprimorar a técnica de monitoramento da resistência e/ou suscetibilidade de triatomíneos a inseticidas;

Estudar a variabilidade genética das amostras de *T. infestans* através de análises de um fragmento do gene mitocondrial *cytB* e 10 loci de microssatélites;

Estudar a variabilidade genética das amostras de *T. brasiliensis* através de análises de um fragmento do gene mitocondrial *cytB*;

Tentar correlacionar a variabilidade genética das amostras de *T. infestans* e *T. brasiliensis* com a resistência e/ou suscetibilidade ao piretróide deltametrina;

Determinar marcadores moleculares exclusivos para *T. infestans* obtidos em países vizinhos ao Brasil (Argentina e Bolívia), que são conhecidamente resistentes ao piretróide deltametrina.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma zoonose endêmica na América Latina, causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi*, que é transmitido ao homem através das fezes dos hemípteros triatomíneos infectados (WHO, 2002). A doença apresenta uma diversidade de sinais e sintomas os quais foram agrupados em duas fases: aguda e crônica (Massad, 2008). No início da fase crônica a doença se apresenta assintomática com sorologia positiva e nenhuma evidência clínica do envolvimento de órgãos. Este período é conhecido como forma crônica indeterminada, e seu tempo de duração não é fixo, podendo variar de 10 a 30 anos (Punukollu *et al.*, 2007).

A fase aguda da doença pode ser caracterizada por febre e taquicardia, mialgia, dor muscular, transpiração, hepatomegalia, esplenomegalia (Punukollu *et al.*, 2007), edema orbital unilateral, linfangite e aumento de ganglio satélite, os quais são conhecidos como sinal de Romaña, um eletrocardiograma pode apresentar alterações na repolarização ventricular, isquemia subepicárdica e bloqueio atrioventricular de primeiro grau (Massad, 2008).

Na fase crônica da doença de Chagas, além da forma crônica indeterminada, pode-se distinguir outras duas formas clínicas: doença crônica do coração e forma digestiva da doença (revistas por Teixeira, 2007). A cardiomiopatia é a manifestação mais comum da doença e é caracterizada por arritmias cardíacas e tromboembolismo venoso e arterial. Incompetência valvular também é uma das manifestações cardíacas, e é causada pela dilatação cardíaca que pode também evoluir para aneurisma apical.

Na forma digestiva da doença ocorre uma dificuldade progressiva na deglutição, podendo chegar a uma constipação crônica (Massad, 2008). Essas alterações ocorridas no tubo digestivo são devidas a perda de coordenação e alteração do controle da mobilidade das paredes da víscera. Tais alterações são resultado dos danos sobre as fibras musculares lisas da parede do tubo digestivo, como consequência de lesões dos neurônios parassimpáticos intramurais (Teixeira, 2007).

Com todas estas alterações fisiológicas e morfológicas dos tecidos do coração e tubo digestivo, os pacientes chagásicos desenvolvem incapacidade progressiva. Estudos realizados em 1993 comparando os “Anos de Vida Ajustados à

Incapacidade” (AVAI, que seriam os anos perdidos devido à incapacidade), entre várias doenças foi observado que a doença de Chagas só era superada pela soma das doenças respiratórias, diarreia e AIDS, e que estava à frente de outras doenças parasitárias, tais como malária, esquistossomose e leishmanioses (World Bank, 1993 *apud* Silveira, 2002).

3.1.1 Epidemiologia

Com a Iniciativa dos Países do Cone Sul, que, entre outras coisas, priorizou as áreas de ocorrência do *T. infestans*, a doença de Chagas apresentou uma redução significativa em sua incidência: ao longo de pouco mais de 15 anos foi conseguida a redução da prevalência da doença de aproximadamente 18 milhões para atuais 9 milhões (Schofield *et al.*, 2006). Outras conquistas foram o aumento do monitoramento da infecção por *T. cruzi* no sangue de doadores, que atualmente está sendo realizado na maioria dos países das Américas, e a marcada redução da infestação dos triatomíneos domésticos, não apenas do *T. infestans*, levando à consequente interrupção da transmissão vetorial da doença em amplas áreas.

3.2 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae com uma enorme diversidade molecular, que é capaz de parasitar diversas células nucleadas de mamífero. Apesar do ciclo do *T. cruzi* já estar elucidado a quase um século (Chagas, 1909), estudos de biologia celular e molecular têm demonstrado detalhes não observados anteriormente (Burleigh e Andrews, 1995).

No sangue de mamíferos infectados por *T. cruzi* existem as formas tripomastigotas (figura 1a). Quando o triatomíneo se alimenta nesse mamífero, ele ingere essas células que vão parar no seu intestino médio. Neste ponto as formas tripomastigotas se transformam em formas epimastigotas (figura 1b), que são replicantes, e migram para o intestino posterior (Tyler e Engman, 2001).

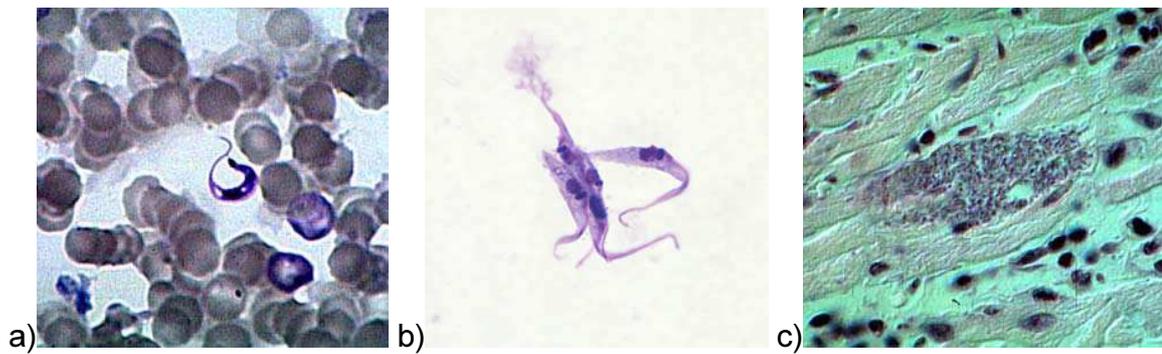


Figura 1: Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. a) tripomastigota em lâmina de sangue; b) epimastigota em meio de cultura e c) amastigotas no interior de célula muscular. Fonte: WHO/TDR (www.who.int/tdr - acessado dia 15/04/2009).

As formas epimastigotas se ligam à parede do intestino do triatomíneos para se diferenciar em formas tripomastigotas metacíclicas. Este processo é denominado metaciclogênese, e uma vez formadas, as formas metacíclicas se destacam da parede do intestino e são excretadas juntamente com as fezes. Estas fezes contaminadas quando entram em contato com a pele ou mucosas de um novo mamífero permitem a entrada do *T. cruzi* neste hospedeiro, sendo iniciada a infecção pela invasão das formas tripomastigotas nas células fagocíticas no local de entrada (Teixeira e Hecht, 2007). Dentro destas células, as formas tripomastigotas se diferenciam em formas amastigotas (figura 1c), multiplicam-se, e podem se diferenciar em formas tripomastigotas novamente, estourar a célula e invadir novas células do mamífero, ou serem ingeridas, quando no sangue, por um novo triatomíneo, ao realizar repasto sanguíneo, onde iniciará novamente todo o ciclo.

Em todos os momentos do ciclo de vida do *T. cruzi* ocorrem interações entre moléculas de superfície do parasito com moléculas do tubo digestivo (quando no triatomíneo) e moléculas das células invadidas (quando no mamífero). Estas moléculas e suas funções foram revistas amplamente (Burleigh e Andrews, 1995; Tyler e Engman, 2001). Aparentemente quase todas as espécies de triatomíneos são capazes de transmitir o *T. cruzi*, entretanto a implicação da espécie na epidemiologia da doença de Chagas vai depender grandemente de sua ecologia e distribuição geográfica (Schofield, 1994).

3.3 Biologia de triatomíneos

Os triatomíneos são insetos hemimetábolos pertencentes à ordem Hemiptera, sub-ordem Triatominae, que apresentam cinco estádios imaturos de desenvolvimento após a eclosão do ovo (Diotaiuti, 2007). Diferentemente dos

culicídeos e flebotomíneos, todos os estádios de desenvolvimento dos triatomíneos (ninfas de I a V e adulto), e ambos os sexos, são hematófagos exclusivos, e necessitam de pelo menos um repasto sanguíneo para desencadear a ecdise nos estádios imaturos (Lent e Wygodzinsky, 1979; Schofield, 1994; Diotaiuti, 2007).

Este grupo de insetos é distribuído amplamente (Lent e Wygodzinsky, 1979), sendo encontrado nos mais variados ecossistemas, principalmente nas Américas. Atualmente são reconhecidas 140 espécies pertencentes a 18 gêneros de 6 tribos (Galvão, 2007; Patterson *et al.*, 2008). Apesar dessa grande diversidade de espécies, os triatomíneos mais importantes na epidemiologia da doença de Chagas são as espécies *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida*, *Triatoma dimidiata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (figura 2) (WHO, 2002).

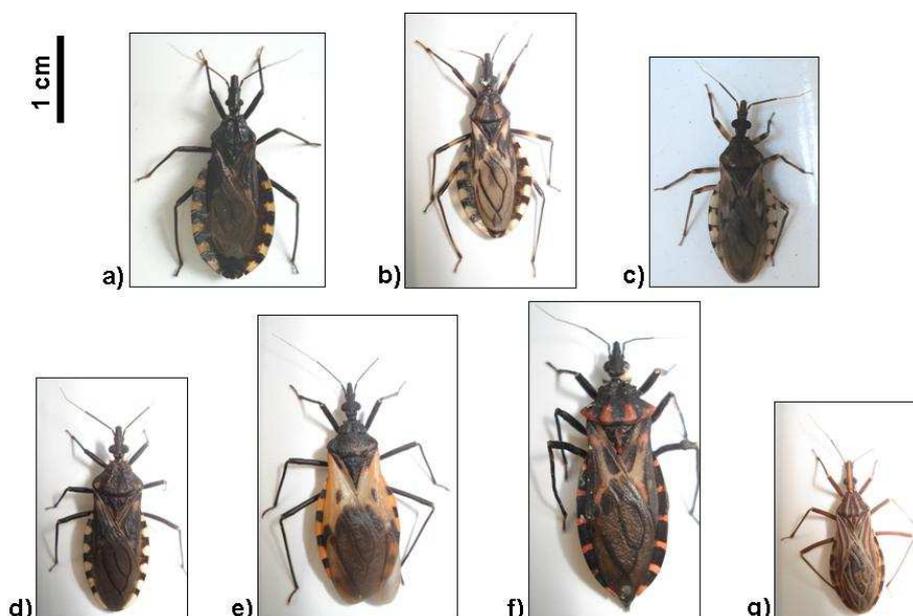


Figura 2: Principais triatomíneos de importância epidemiológica na doença de Chagas nas Américas: a) *Triatoma infestans*, b) *Triatoma brasiliensis*, c) *Triatoma sordida*, d) *Triatoma pseudomaculata*, e) *Triatoma dimidiata*, f) *Panstrongylus megistus* e g) *Rhodnius prolixus*. Fonte: Msc. Angélica de Oliveira (CPqRR/FIOCRUZ).

3.4 *Triatoma infestans*

T. infestans é encontrado quase exclusivamente em ambientes domésticos e peridomésticos, se abrindo em buracos e fendas das moradias humanas e locais de criação de animais (Forattini, 1980). Acreditava-se que esta espécie só era encontrada em ambiente silvestre nos vales andinos de Cochabamba e Sucre, na Bolívia (Bermúdez *et al.*, 1993). Entretanto, mais recentemente focos de *T. infestans*

silvestres foram encontrados em Caracato (Departamento de La Paz), Cotapachi (Departamento de Cochabamba) e Urilica (Departamento de Potosí), todos estes a uma altitude acima de 2.500 m (Rojas Cortez *et al.*, 2007). Outro foco silvestre também foi observado a uma altitude mediana (1.750 m) em Mataral (Cochabamba) (Noireau *et al.*, 2005). Estes insetos foram encontrados em associação a pequenos roedores e marsupiais, em afloramentos rochosos. Em Cotapachi, vale baixo de Cochabamba, zona endêmica da doença de Chagas, é conhecido um ciclo ativo de transmissão silvestre de *T. cruzi* sustentado basicamente por pequenos mamíferos silvestres (Cortez *et al.*, 2006), onde nas épocas chuvosas, quando as populações destes pequenos animais silvestres estão maiores, novas colônias de triatomíneos se desenvolvem.

Também na província de Santa Cruz (Bolívia) exemplares de *T. infestans* foram capturados em ninhos de papagaios (*Myiopsitta monachus*), em bromélias e principalmente ocos de árvores (Noireau *et al.*, 1997; Noireau *et al.*, 2000). Estes espécimes se diferenciavam de outras populações de *T. infestans* por sua coloração negra ou muito escura. Devido a estas características cromáticas, estes insetos foram denominados “*dark morph*”. Outra característica destes insetos é possuir um habitat arbóreo, diferentemente dos *T. infestans* andinos. Recentemente *T. infestans* “*dark morph*” foram coletados ao norte do Paraguai e na Província do Chaco na Argentina (Rojas Cortez *et al.*, 2007). Estes trabalhos sugerem que a população “*dark morph*” não se restringe ao Chaco boliviano, mas estaria presente em todo o Grande Chaco, o qual abrange partes da Bolívia, Paraguai, Brasil e Argentina, sendo caracterizado por bosques e savanas. Apesar desta grande distribuição de *T. infestans* “*dark morph*”, estes nunca foram observados colonizando casas.

3.4.1 Variabilidade genética de *Triatoma infestans*

Segundo Schofield (1988 *apud* Giordano *et al.*, 2005), *T. infestans* tem sua origem geográfica e epicentro de distribuição no Vale de Cochabamba (Bolívia). Essa dedução se deu principalmente devido ao conhecimento, até a década de 1990, de focos silvestres desta espécie apenas nessa região (Bermudez *et al.*, 1993; Panzera *et al.*, 2007a). Recentemente Dujardin *et al.* (1998) estudou *T. infestans* proveniente de Chuquisaca (Bolívia), comparando-os com outros espécimes provenientes de regiões andinas e não-andinas, através de marcadores isoenzimáticos, e determinaram que o centro de origem e dispersão desta espécie está em Chuquisaca, também na Bolívia. Este mesmo resultado foi observado por

Giordano *et al.* (2005) utilizando seqüências do gene mitocondrial *cytB*. Estes estudos determinaram estas origens de distribuição comparando a variabilidade genética das populações estudadas, uma vez que as populações mais antigas são as que apresentam os maiores índices de variabilidade (Schofield & Dias, 1999). Apesar dos diferentes resultados entre estes trabalhos, não resta dúvida de que *T. infestans* é originário da Bolívia.

Após a adaptação do *T. infestans* ao ambiente doméstico, que está estimado que tenha ocorrido há 3.500 anos (Schofield, 1988 *apud* Panzera *et al.*, 2007b), o principal mecanismo de dispersão desta espécie de triatomíneo, que o permitiu ampliar tanto a sua área de dispersão, se deu através das migrações humanas, uma vez que sua capacidade de vôo é reduzida (Schofield, 1994; Dujardin *et al.*, 1998). Reconstruções históricas sobre a dispersão do homem indicam que *T. infestans* doméstico se dispersou nos últimos dois ou três séculos, partindo do sul da Bolívia até o resto de sua área de distribuição (Panzera *et al.*, 2007b).

A dispersão de *T. infestans* da Bolívia para o restante do Cone Sul resultou em grandes mudanças genéticas, principalmente evidenciadas pela perda de DNA dos espécimes não-andinos (Panzera *et al.*, 2004). Neste trabalho os autores observaram mais de 35% de perda de DNA, principalmente material heterocromático, nas populações não-andinas. Variações nos padrões de bandeamento C também foram observadas entre exemplares de *T. infestans*: os espécimes da região andina apresentam maior número de bandas C que os da região não-andina. Devido a estas grandes diferenças genéticas, *T. infestans* pode ser agrupado em dois grandes grupos alopátricos, andino e não-andino (Bargues *et al.*, 2006; Panzera *et al.*, 2004). A existência de populações geneticamente distintas pode indicar variações também no seu comportamento, capacidade de dispersão e capacidade vetorial.

Estudos procurando determinar a magnitude de diferenças genéticas entre *T. infestans* da Bolívia e Argentina foram realizados, empregando análises de sensilas antenais e seqüências do gene mitocondrial *cytB* (Catalá & Dujardin, 2001; Catalá *et al.*, 2007). Nestes estudos foram observadas diferenças no número e tipo de sensilas entre as amostras, e não foi observado nenhum haplotipo, do gene *cytB*, em comum em ambos os países. Na Argentina também foram observados haplótipos exclusivos para as regiões andinas e não-andinas dentro do país, apesar de também terem sido observados alguns haplótipos em comum.

Entre as populações de *T. infestans* bolivianas e brasileiras também são observadas grandes diferenças. Como descrito por Panzera *et al.* (2004) as populações do Brasil apresentam menos DNA e bandas C que as populações da Bolívia. Em estudos utilizando marcadores isoenzimáticos (Dujardin *et al.*, 1998; Schofield *et al.*, 1999) também foi observada uma maior variabilidade genética nos insetos provenientes da Bolívia. Também foram observadas variações morfológicas nos órgãos sexuais masculinos entre insetos destes países (Pires *et al.*, 1998), mas que aparentemente não ocasionavam isolamento reprodutivo entre os espécimes.

Os estudos de variações apresentadas por sequências de genes nucleares (Bargues *et al.*, 2006) e mitocondriais (Garcia *et al.*, 2003) entre amostras de *T. infestans* da região não-andina demonstram uma maior variabilidade genética nas amostras oriundas no norte da Argentina, comparada com amostras do Brasil, Paraguai e Uruguai. Estes resultados indicam a ocorrência de uma segunda expansão populacional de *T. infestans*, tendo o norte da Argentina como centro de dispersão (Panzera *et al.*, 2007).

Com todos estes estudos sobre a variabilidade genética de *T. infestans*, empregando os mais diversos marcadores moleculares e fenotípicos (Garcia *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 1999; Pérez de Rosas *et al.*, 2007; Pérez de Rosas *et al.*, 2008; Schachter-Broide *et al.*, 2004), fica claro, hoje, que *T. infestans* apresenta de baixos a moderados índices de variabilidade genética intra-populacional e de moderada a grande diferenciação genética inter-populacional. Talvez este perfil seja fruto da grande dispersão desta espécie na América Latina, por regiões de diferentes características ambientais e também das constantes intervenções dos programas de controle, através da aplicação de inseticidas, que promovem seleção das populações desta espécie, com a conseqüente redução da variabilidade genética local.

3.5 *Triatoma brasiliensis*

O *T. brasiliensis* é encontrado principalmente na região do semi-árido do Nordeste do Brasil (Dias *et al.*, 2000; Silveira e Vinhaes, 1999), se estendendo até o norte de Minas Gerais (Schofield, 1994). Nesta área de distribuição este triatomíneo é observado nos ambientes doméstico e silvestre, sendo que no último é encontrado principalmente associado a tocas de roedores, entre pedras, onde se alimentam e procriam (Forattini *et al.*, 1981; Diotaiuti *et al.*, 2000; Diotaiuti, 2007).

Segundo Dias *et al.* (2000), o Nordeste brasileiro apresentou três cenários históricos em relação à ocorrência de triatomíneos: (1) até a década de 1950, os autores acreditam que a transmissão da doença de Chagas ocorreu principalmente por meio de *P. megistus* e *T. brasiliensis*; (2) Entre a década de 1950 e final da década de 1980, *T. infestans* invadiu amplas áreas da região Nordeste onde passou a ser a principal espécie responsável pela transmissão da doença; (3) a partir de 1990, *T. infestans* foi controlado, restando apenas focos residuais na Bahia. Outra espécie de grande importância, o *P. megistus*, também teve sua densidade reduzida. Assim, o *T. brasiliensis* se manteve (e se mantém) como principal vetor. Outra espécie também do semiárido, o *T. pseudomaculata*, vem ampliando sua área de ocorrência e se instalando nos ecótopos artificiais, passando a ser considerado como outra espécie de grande importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas no Brasil (Dias *et al.*, 2000).

Por ser uma espécie nativa no Nordeste do Brasil e apresentar comportamento ubiquista (podendo se adaptar a diferentes ambientes), o controle do *T. brasiliensis* é difícil. Trabalhos realizados no Estado do Ceará demonstram que a partir do quarto mês após tratamento das residências infestadas com inseticida de ação residual, esta espécie de triatomíneo já pode ser encontrada, principalmente no ambiente peridomiciliar (Diotaiuti *et al.*, 2000; Oliveira Filho *et al.*, 2000), devido a sucessivas reinvasões a partir das populações silvestres da espécie. Uma vez que é virtualmente impossível controlar estas populações silvestres, também fica impossível evitar as constantes invasões (Diotaiuti *et al.*, 2000).

3.5.1 Variabilidade genética de *Triatoma brasiliensis*

Poucos estudos foram realizados com o intuito de avaliar a variabilidade genética de *T. brasiliensis*. Atualmente esta espécie é descrita como possuindo quatro populações alopátricas com diferenças cromáticas, denominadas: *brasiliensis*, *melanica*, *macromelasoma* e *juazeiro* (figura 3) (Costa e Felix, 2007).

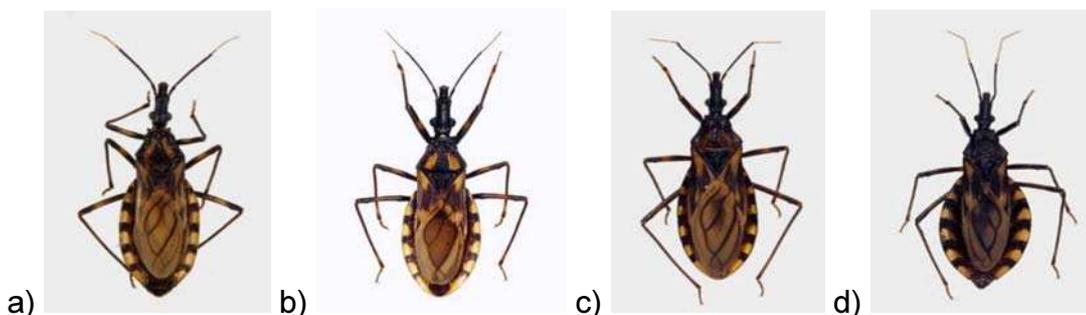


Figura 3: Formas cromáticas descritas para *Triatoma brasiliensis*. a) *brasiliensis*, b) *melanica*, c) *macromelasoma* e d) *juazeiro*. Fonte: Instituto Oswaldo Cruz (www.fiocruz.br/ioc - acessado dia 15/04/2009).

Estudos anteriores utilizando marcadores isoenzimáticos (Costa *et al.*, 1997) demonstraram moderada variabilidade genética de amostras pertencentes às quatro formas cromáticas de *T. brasiliensis*, obtidas nos Estados do Rio Grande do Norte (*brasiliensis*), Pernambuco (*macromelasoma*), Bahia (*juazeiro*) e Minas Gerais (*melanica*). Neste estudo foram observados valores de distância genética variando de 0,295 a 1,128, o que demonstra moderadas a grandes distâncias. Apesar destes resultados, os autores não calcularam índices de endocruzamento (ex. F_{ST}), que são os melhores parâmetros para avaliar diferenciação genética entre populações, por permitirem uma comparação objetiva do efeito total da subdivisão da população sem entrar em detalhes acerca das frequências alélicas ou heterozigosidades observadas, entre outras coisas (Hartl e Clark, 1997).

Posteriormente, Costa (2000) aprofundou as análises nas mesmas amostras avaliadas anteriormente (Costa *et al.*, 1997), e mais quatro novas amostras coletadas na Bahia, avaliando morfometria dos genitais externos dos machos, microscopia eletrônica de varredura dos ovos, cruzamentos entre os diferentes padrões cromáticos e análise de marcadores isoenzimáticos. Neste estudo foram observadas diferenças significativas entre os padrões cromáticos, nas análises de morfometria e microscopia eletrônica. Através das análises de isoenzimas, foi observada baixa variabilidade genética intrapopulacional, e moderada diferenciação genética interpopulacional, sendo a forma *melanica* (Minas Gerais) a mais distinta dentre as demais. Nos cruzamentos para a F1 não foi observada incompatibilidade genética (Costa, 2000), porém nos cruzamentos da F2 foi observada alta porcentagem de ovos estéreis, período de desenvolvimento maior e alta taxa de mortalidade em ninfas de quinto estágio, nos cruzamentos entre machos do padrão *brasiliensis* com fêmeas do padrão *melanica* (Costa, 1999).

Na tentativa de esclarecer ainda mais estas diferenças genéticas entre os padrões cromáticos de *T. brasiliensis*, Panzera *et al.* (2000) estudaram as variações cromossômicas apresentadas por amostras dos quatro padrões, obtidos nos Estados do Ceará, Piauí, Pernambuco (município de Terra Nova), Rio Grande do Norte (todos do padrão *brasiliensis*), Pernambuco (município de Petrolina, padrão *macromelasoma*), Bahia (padrão *juazeiro*) e Minas Gerais (padrão *melanica*). Contrariamente ao descrito anteriormente, não foram observadas diferenças citogenéticas entre as amostras, com todos os padrões apresentando um número diploide $2n = 20A + XY, XX$. Também nos padrões de bandas C não foram observadas diferenças significativas, e estas análises evidenciaram uma variação de heterocromatina nos autossomos de 25 a 32 %.

Estudos utilizando sequências do gene mitocondrial *cytB* também foram empregados nas análises de populações de *T. brasiliensis* dos quatro padrões cromáticos (Monteiro *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2004). Foram observados baixos valores de variabilidade genética intrapopulacional, com F_{ST} variando de 0,0044 a 0,0096. Talvez esta baixa variabilidade genética seja fruto do baixo número amostral de algumas amostras. Nestes mesmos trabalhos foram observadas de moderadas a grandes distâncias genéticas, porém as amostras pertencentes aos padrões *brasiliensis* e *macromelasoma* apresentaram haplótipos em comum, além de indivíduos coletados em campo com características aparentemente intermediárias entre as duas formas, no Estado de Pernambuco. Este achado sugere a existência de híbridos naturais no campo, com a conseqüente ausência de isolamento reprodutivo entre eles.

Marcadores RAPD foram utilizados na análise de amostras dos Estados do Piauí e Ceará (Borges *et al.*, 2000a; Borges *et al.*, 2000b; Borges *et al.*, 2005). Com uso destes marcadores foi possível observar pouca variabilidade genética nas amostras estudadas, e moderada diferenciação genética entre as amostras dos dois Estados. Recentemente, os marcadores RAPD se mostraram eficientes na identificação e diferenciação de *T. brasiliensis* obtidos nos ambientes domésticos e silvestres (Borges *et al.*, 2005).

3.6 Controle da doença de Chagas

A estratégia para controle da doença de Chagas consiste basicamente na interrupção da transmissão vetorial, pelo combate aos triatomíneos domésticos, e

maior controle nos bancos de sangue, através de monitoramento da infecção por *T. cruzi* (revisto por Massad, 2008).

O combate aos triatomíneos encontrados em ambiente doméstico é realizado com a aplicação de inseticidas de ação residual. Atualmente são utilizados inseticidas do grupo dos piretróides, mas anteriormente eram utilizados inseticidas clorados (ex. BHC e dieldrin) e fosforados (ex. fenitrothion) (Rocha e Silva, 1979). Essas atividades, voltadas ao controle dos triatomíneos, tiveram início, no Brasil, por volta dos anos 1950 pelo então Serviço Nacional de Malária. A partir de 1975 essas atividades se tornaram programa de controle nacional (Vinhaes e Dias, 2000), porém só alcançaram toda a área endêmica entre 1983 e 1986.

Em 1986, com o surgimento de epidemias de dengue, o PCDCH sofreu reduções de suas atividades, sendo, porém, mantidas as atividades de borrifação das residências infestadas em amplas áreas do país (Vinhaes e Dias, 2000).

Em 1991, os países da América Latina, endêmicos para a doença de Chagas, decidiram juntar esforços contra a doença, firmando uma cooperação internacional denominada Iniciativa dos Países do Cone Sul, envolvendo Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai (WHO, 2002). Com isso o PCDCH passou a priorizar áreas de ocorrência do *T. infestans*, e a vigilância epidemiológica teve sua instalação ampliada para as áreas já sob controle da transmissão vetorial (Dias *et al.*, 2002; WHO, 2002).

Após mais de 30 anos de ação do PCDCH, mudanças operacionais para o controle da doença de Chagas foram propostas (Dias, 2007):

- Introduzir o conceito de eliminação da transmissão para as áreas ou sub-regiões com nenhuma ou mínima infestação e soroprevalência negativa em crianças;
- Dar atenção e melhorar o monitoramento da tolerância dos triatomíneos aos inseticidas, prevenindo possíveis situações de resistência;
- Dar atenção aos triatomíneos considerados de importância secundária, principalmente no Brasil;
- Melhorar a qualidade e sensibilidade na detecção de triatomíneos nas situações de baixa densidade populacional;
- Melhorar as estratégias e ferramentas para o controle dos triatomíneos em ambientes peridomésticos;

- Desenvolver e melhorar as atividades de educação em saúde, tendo o objetivo de ter participação da comunidade permanentemente nas situações de vigilância epidemiológica;
- Aceitar o resultado de apenas uma técnica sorológica para o monitoramento de bancos de sangue, desde que o laboratório responsável seja considerado como serviço de referência e seja equipado com o maior padrão de qualidade;
- Estimular todos os países envolvidos a realizar monitoramento sorológico de rotina em crianças de áreas tratadas, para medir o impacto das ações e mesmo determinar e explorar focos de transmissão residuais;
- Criar um subprograma regular para tratamento específico de indivíduos soropositivos de até 15 anos;
- Estimular a avaliação epidemiológica do risco de doença de Chagas congênita em todos os países, e implementar um subprograma para gerência da doença congênita;
- Dar total suporte ao projeto “*The Benefit Trial*” e a pesquisas em casos crônicos correlacionados, procurando disponibilidade e possíveis benefícios do tratamento específico, em longo prazo;
- Disseminar e estimular cursos regulares e qualificações técnicas.

3.7 Resistência de triatomíneos a inseticidas

A primeira evidência de resistência a inseticida nos triatomíneos foi observada na Venezuela, na década de 70, em áreas de ocorrência de *R. prolixus* tratadas seguidamente por dieldrin, inseticida organoclorado (Rocha e Silva, 1979). Apesar deste trabalho, os primeiros resultados de resistência aos inseticidas piretróides foram obtidos pelo *Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas* (CIPEIN), de Buenos Aires na década de 1990 (Vassena *et al.*, 2000). Neste trabalho pioneiro foram estudados *R. prolixus* oriundos da Venezuela e *T. infestans* do Brasil, do Estado do Rio Grande do Sul. Os autores encontraram valores de razão de resistência (RR) que caracterizaram as populações como possuindo resistência inicial. *R. prolixus* apresentou os maiores valores de resistência: RR = 12,4 para cipermetrina e 11,4 para deltametrina, e *T. infestans* do Rio Grande do Sul apresentou um valor menor (RR = 7,0 para deltametrina), apesar de ser considerado como resistência inicial.

Em meados de 2002 o CIPEIN passou a receber exemplares de *T. infestans* coletados nas proximidades do município Salvador Mazza, Província de Salta, Argentina (Zerba e Picollo, 2007). Estes insetos foram submetidos à dose discriminante (a dose DL99 da linhagem suscetível, a qual se espera matar 99% da amostra) e os autores ficaram surpresos com a baixa mortalidade observada. Neste trabalho, foram avaliadas quatro localidades, e os espécimes coletados em Salta apresentaram os maiores valores para resistência (RR = 7,89) (Gonzáles Audino *et al.*, 2004).

A partir destes dados foram investigadas outras localidades da Província de Salta: El Chorro, La Toma, El Sauzal e Salvador Mazza, onde o Serviço Nacional de Chagas daquele país (Argentina) vinha advertindo falhas no controle de *T. infestans* (Zerba e Picollo, 2007). Foram, então, estabelecidas as razões de resistência para estas localidades (Picollo *et al.*, 2005), e os dados se mostraram alarmantes, com as RR variando de 99 (El Chorro) a 133,1 (Salvador Mazza). Para estas localidades também foram avaliados outros inseticidas, e os resultados mostraram que a resistência que inicialmente foi detectada para deltametrina cruzava com todos os inseticidas piretróides utilizados no estudo (Betaciflutrina, Betacipermetrina, Lambdacialitrina e Cispermtrina). Para outras classes de inseticidas, a resistência não se manteve: Fenitrotion (organofosforado), Bendiocarb (carbamato) e Fipronil (fenilpirazol) (Zerba e Picollo, 2007).

Após a observação da ocorrência de *T. infestans* resistentes a piretróides na Argentina e sucessivas falhas de controle no campo, no norte da Argentina e Sul da Bolívia (Vassena *et al.*, 2007), foram investigadas amostras provenientes dos Departamentos de Tarija (Yacuiba, El Palmar, Villamontes e Entre Rios), Chuquisaca (Sucre-Rural) e Cochabamba (Mataral) (Orihuela *et al.*, 2008), todos pertencentes à Bolívia. Neste estudo, a aplicação de dose discriminante evidenciou que todas as amostras eram resistentes. Na determinação das DL50 para Yacuiba, utilizando quatro inseticidas diferentes (deltametrina, fenitrotion, fipronil e bendiocarbe) foi observado que esta população só apresentou resistência ao piretróide testado (deltametrina), com uma DL50 de 28,42 (ng/inseto) e RR de 154,4 (Vassena *et al.*, 2007).

Os resultados sobre resistência de *T. infestans* a piretróides demonstraram a existência de uma área crítica, com elevados valores de RR, que abrange o norte da Argentina e o Sul da Bolívia. Estas informações são, entretanto, consideradas insuficientes para a delimitação da área de resistência para *T. infestans*, sendo

necessário avaliar outras áreas de ocorrência desta espécie, já que todos estes trabalhos foram restritos à Argentina e Bolívia, e ampliar este tipo de estudo para outras espécies de triatomíneos de importância epidemiológica na doença de Chagas.

Com a necessidade de estudos sobre a resistência a inseticidas em triatomíneos do Brasil, o Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas (LATEC/CPqRR/FIOCRUZ) estruturou um grupo para estudos desta natureza. Com isso, recentemente Pessoa *et al.* (2007) estudando 14 amostras de *Triatoma sordida* de Minas Gerais, através de bioensaios com deltametrina, conseguiu observar valores de RR acima de 5 ($RR > 5$) em cinco das amostras estudadas. Segundo a OPAS (2005), os valores de RR superiores a 5 indicam resistência inicial ao inseticida testado. Com estes resultados, o estudo da resistência a inseticidas em triatomíneos de outras áreas além das já descritas para a Argentina e Bolívia se tornou ainda mais importante.

Esta necessidade se torna mais preocupante devido ao uso prolongado de inseticidas piretróides no controle de triatomíneos no Brasil (há mais de 20 anos), o que pode ter selecionado várias populações com resistência ou suscetibilidade alterada a estes inseticidas. A ampliação da área de ocorrência destas possíveis populações pode comprometer severamente o sucesso do PCDCh.

4 MÉTODOS

4.1 Triatomíneos estudados

Os triatomíneos utilizados neste trabalho são mantidos no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas (LATEC) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR/FIOCRUZ) sob condições de temperatura e umidade controladas.

4.1.1 *Triatoma infestans*

Os exemplares de *T. infestans* do Brasil utilizados neste estudo foram provenientes do Estado do Rio Grande do Sul (Sul do Brasil), Estado de Minas Gerais (Sudeste do Brasil) e Estado de Goiás (Centro-Oeste do Brasil). Também foram utilizados exemplares provenientes de Salvador Mazza (Província de Salta, Argentina) e Yacuiba (Departamento de Tarija, Bolívia). As amostras do Rio Grande do Sul foram obtidas com auxílio da Secretaria do Estado de Saúde do Rio Grande do Sul (SES-RS). Estas amostras são oriundas dos municípios: Doutor Maurício Cardoso, Guarani das Missões, Mato Queimado e Três de Maio (figura 4), os quais estão presentes nas áreas dos últimos resíduos de *T. infestans* no Rio Grande do Sul.



Figura 4: Mapa do Estado do Rio Grande do Sul evidenciando as localidades de obtenção dos *Triatoma infestans*: 1 - Doutor Maurício Cardoso (27°30'21"S / 54°21'39"W), 2 - Três de Maio (27°46'24"S / 54°14'24"W), 3 - Guarani das Missões (28°08'27"S / 54°33'29"W), e 4 - Mato Queimado (28°15'21"S / 54°36'57"W). Fonte: Wikipedia (www.wikipedia.org – acessado dia 15/04/2009).

A SES-RS também nos enviou *T. infestans* provenientes dos municípios Alegria, Augusto Pestana, Santo Cristo e Coronel Barros, porém destas amostras só foi possível estabelecer colônia de Coronel Barros, e esta não se desenvolveu adequadamente. Os insetos destes municípios não foram utilizados neste trabalho.

As colônias de *T. infestans* de Minas Gerais e Goiás se encontram mantidas em laboratório sem contato com inseticida há mais de 10 gerações. A linhagem de Minas Gerais é oriunda de Montes Claros e a linhagem de Goiás é oriunda do município de Posse. Esta última foi cedida gentilmente pelo Dr. Alfredo Martins de Oliveira Filho (UFRJ). Estas populações remanescentes de *T. infestans* de Minas Gerais e Goiás já foram eliminadas no campo, e estes exemplares de laboratório são considerados suscetíveis a inseticidas.

As amostras provenientes dos municípios Salvador Mazza (Salta) e Yacuiba (Tarija) já estão caracterizadas como resistentes a piretróides e apresentam razões de resistência (RR) de 133,1 (Salvador Mazza, Picollo *et al.*, 2005) e 154,4 (Yacuiba, Vassena *et al.*, 2007). A amostra de Salvador Mazza foi cedida gentilmente pelo CIPEIN, através do Dr. Eduardo Zerba, e estes insetos foram obtidos no campo em meados de 2006. A amostra proveniente de Yacuiba foi avaliada nos ensaios biológicos juntamente com as amostras do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Goiás para servir como um controle positivo dos ensaios biológicos. Estes exemplares foram obtidos no campo em meados de 2008, capturados por integrantes do LATEC.

4.1.2 *Triatoma brasiliensis*

As amostras de *T. brasiliensis* utilizadas neste estudo foram obtidas no município de Tauá (figura 5), Estado do Ceará, com auxílio da Secretaria de Estado de Saúde do Ceará (SES-CE). As amostras foram obtidas nas localidades Cachoeira do Júlio, Cachoeira dos Pedrosas, Dormideira, Mutuca, Morada Nova do Thomas e Milagres, em dois momentos: antes de borrifação das residências com inseticida piretróide e um ano depois. Devido à eliminação de insetos em algumas residências após a borrifação, não foi possível obter amostras dos mesmos locais nos dois momentos de captura. Na primeira captura foram obtidos *T. brasiliensis* apenas no ambiente intradomiciliar nas localidades: Cachoeira do Júlio, Cachoeira dos Pedrosas, Dormideira e Mutuca. Na segunda captura foram obtidos insetos nos ambientes peridomiciliar e silvestre nas localidades: Cachoeira dos Pedrosas (peri), Dormideira (peri), Milagres (peri), Morada Nova do Thomas (peri), Mutuca (peri) e Cachoeira dos Pedrosas (silvestre). A colônia de Milagres não foi utilizada nos

ensaios biológicos com deltametrina devido ao número reduzido de insetos, sendo apenas utilizada nas análises de variabilidade genética.

Uma linhagem laboratorial de *T. brasiliensis*, proveniente de Crateús (CE), mantida em insetário há mais de 10 gerações, sem contato com inseticidas, foi utilizada como suscetível, para o cálculo das razões de resistência das amostras estudadas.

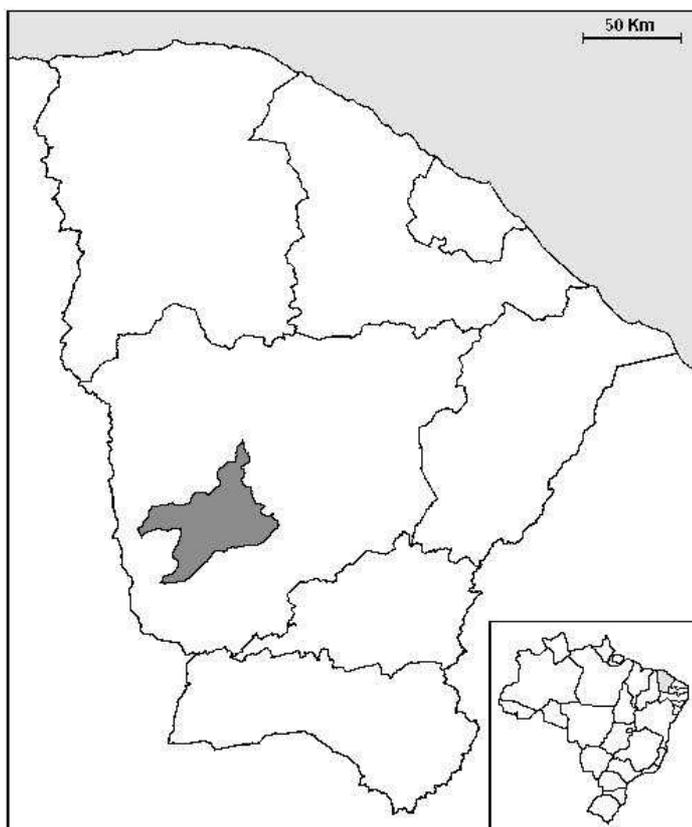


Figura 5: Mapa do Estado do Ceará evidenciando o município de Tauá (em cinza). Fonte: Wikipedia (www.wikipedia.org – acessado dia 15/04/2009).

4.2 Ensaios biológicos

4.2.1 Inseticida utilizado

Para o estudo de resistência a inseticida foi escolhido o piretróide deltametrina (99,1 %, Bayer), uma vez que o PCDC utiliza piretróides em suas ações de controle do vetor em todo o país há mais de 30 anos (Dias *et al.*, 2002), e dentre os piretróides existentes, é o que reúne maior quantidade de informações técnicas. Isso nos possibilita fazer comparações dos nossos resultados com a literatura.

O inseticida originariamente em pó era diluído em acetona [PA] em concentrações seriadas formando um gradiente variando na potência de 10. Após os

primeiros testes para cada localidade, e com os dados de mortalidade para essas concentrações iniciais, eram criadas concentrações intermediárias do inseticida para estabelecer uma curva de mortalidade onde se encontrasse valores variando de 0% a 100%. Estas soluções eram mantidas a -20°C até o máximo de duas semanas, sendo descartadas após este período e refeitas. Este procedimento tinha o objetivo de eliminar erro nos ensaios devido à alteração das concentrações das soluções promovida pela evaporação da acetona.

Antes da utilização das soluções nos ensaios as mesmas eram mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos ou até que sua temperatura se igualasse com a do meio, evitando assim os danos causados pela baixa temperatura das soluções aos triatomíneos testados.

4.2.2 Procedimentos no ensaio

O ensaio biológico consistia na aplicação de 0,5 μ l da solução de deltametrina na região dorsal de ninfas de primeiro estágio com cinco dias de vida, em jejum. A aplicação das soluções era realizada com auxílio de microseringa Hamilton provida de dispensador de repetição (50 repetições). Este instrumento é extremamente preciso no volume manuseado.

Nestes ensaios eram utilizadas pelo menos oito concentrações de deltametrina que determinassem taxas de mortalidade variando de 0% a 100%. Para cada concentração eram utilizadas 30 ninfas, assim o número total de ninfas utilizadas era, pelo menos, 240 por linhagem (localidade) estudada.

Após a aplicação do inseticida, as ninfas tratadas eram mantidas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 24°C (22°C) com umidade de 75% (85%). A mortalidade das ninfas era avaliada 72 horas após a aplicação do inseticida. Neste momento as ninfas eram caracterizadas como normais (quando não apresentavam nenhuma alteração de locomoção), intoxicadas (quando apresentavam leves sintomas de desequilíbrio ao se locomover), ou nocauteadas (quando apresentavam fortes sintomas de desequilíbrio ao se locomover ou não conseguiam se locomover).

No cálculo da dose letal 50 (DL50) as ninfas normais foram consideradas como vivas, e as ninfas intoxicadas e nocauteadas foram agrupadas como mortas. Este procedimento é necessário para a utilização do programa que calcula os valores de doses letais (DL).

4.2.3 Avaliação da resistência

Os dados de mortalidade, obtidos nos ensaios biológicos, foram utilizados em análise *probit* para o cálculo da dose letal 50 (DL50) para cada linhagem (localidade). Foi utilizado o programa *Probit Analysis* (Raymond, 1985) nesta etapa do trabalho. Nesta análise também foi possível definir o *Slope* das amostras, o qual representa sua homogeneidade. Posteriormente os valores de DL50 foram agrupados em planilhas, e a razão de resistência (RR) definida pela divisão dos valores deste parâmetro entre as amostras de campo e as linhagens de laboratório (Razão de Resistência RR = DLcampo / DLlaboratório).

4.3 Estudo da variabilidade genética de *Triatoma infestans* e *Triatoma brasiliensis*

A variabilidade genética das amostras de *T. infestans* do Brasil, Argentina e Bolívia foi avaliada por duas maneiras, através da análise de um fragmento de 448 nucleotídeos do gene mitocondrial *cytB* e análises de 10 loci de microssatélites. Já a variabilidade genética das amostras de *T. brasiliensis* do município de Tauá (CE) foi avaliada apenas através de sequências do gene *cytB*.

4.3.1 Extração de DNA e PCR

O DNA dos exemplares de *T. infestans* e *T. brasiliensis* estudados foi extraído com o uso de STE [1X] (NaCl 0,01M; Tris-HCl 0,1M e EDTA 1M), baseado nos procedimentos descritos por Balbino *et al.* (2006), com pequenas alterações. Para isso, ninfas de primeiro estágio foram separadas individualmente em tubos de 1,5 mL e maceradas. Após isso eram acrescentados 50 μ L de STE [1X] e os tubos eram mantidos em banho-maria a 90°C por 10min. Em seguida as amostras eram centrifugadas a 13.000 rpm por 1min e o sobrenadante recolhido e diluído 2X em água ultra pura (Gibco). Esta solução era então mantida a -20°C até o momento do seu uso em PCR.

As reações de PCR foram específicas para cada marcador estudado. Para o gene mitocondrial *cytB*, foi amplificada uma região de 448 nucleotídeos, com os iniciadores CitBF (5' - GGA CAA ATA TCA TGA GGA GCA ACA G - 3') e CitBR (5' ATT ACT CCT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G - 3') (Lyman *et al.*, 1999), correspondente em *T. dimidiata* ao fragmento do nucleotídeo 425 ao nucleotídeo 872 na sequência completa do gene. Este fragmento se posiciona na porção próxima à extremidade 3' do gene. A PCR teve um volume final de 25 μ L contendo

os seguintes reagentes: 1,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 3 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada dNTP, 10 μmol de cada *primer* e 1 μl da solução de DNA (as amostras de DNA não foram quantificadas). A amplificação consistiu de um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min e 35 ciclos a 95 °C por 30 seg, 47 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min, seguidos por um passo de extensão final a 72 °C por 5 min.

Para os microssatélites, foram utilizados dez pares de iniciadores, descritos por Garcia *et al.* (2004) (tabela 1). Todos os iniciadores *forward* foram marcados com fluoresceína na extremidade 5'. As reações foram feitas com volume final de 10 μl contendo os seguintes reagentes: 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μM de cada dNTP, 5 μmol de cada iniciador e 1 μl da solução de DNA. O ciclo desta PCR consistiu de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min e 30 ciclos a 95 °C por 20 seg, 55 °C por 30 seg e 72 °C por 40 seg, seguidos por uma amplificação final a 72 °C por 5 min.

Tabela 1: Iniciadores utilizados para amplificação dos 10 loci de microssatelite em *Triatoma infestans*.

Locus	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Repetição	Tamanho do menor fragmento possível
TiA02	F: GGAAACTCATGTTATGGACACG R: AAACCTTATTGTTAGTTCGTTTTGG	$(GT)_nG(GT)_nAT(GT)_n$	169 pb
TiC02	F: CTCTGGGGATCATCGTTCTG R: TTTAGGATTCATACCGCCTTT	$(GT)_n$	141 pb
TiC08	F: TTAAGTCCACATTGCGTCAT R: TCGTGATTGCAAGGAGGAAT	$(GT)_nATGTATT(GT)_n$	181 pb
TiC09	F: TTTGCCACATTTACCATTTCC R: TCAAGAGAAGCCGTCCAAC	$(GT)_n$	123 pb
TiD09	F: TGGACATAAGCCCCCTGTAA R: GGATCCTACTGTGCGGATGT	$(GT)_n(ATGT)_n$	174 pb
TiE02	F: AGCACGGTTTGCAACTTTTC R: TGTGGAATTGAAGGAGCACA	$(GT)_nCTGCCT(GTGC)_n$	119 pb
TiE12	F: CCTTTAATTTCCCTTTGCCATC R: CCTACACGAAATGCCCAAGT	$(GT)_nGGGA(GT)_n$	269 pb
TiF03	F: AAAATGGCGGACAAACATTC R: TTCCTCAACACAAACACAAACC	$(GT)_n$	148 pb
TiF11	F: TCAATAAAACGAAAATGCGACTT R: GCGGGATCTAAGCCAACAGT	$(GT)_n$	176 pb
TiG03	F: CGGAAATGCAAAATTTTTAGGCG R: ATTCTGATCGTGGCAATTTT	$(TA)_nCATAT(GT)_nGC(GT)_nAT(GT)_n$	190 pb

Nota: Estes loci foram identificados e caracterizados por Garcia *et al.* (2004).

4.3.2 Sequenciamento e genotipagem

O tratamento posterior à PCR foi diferente para cada marcador. Os produtos de PCR do *cytB* foram separados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 10% e visualizados em transiluminador UV. As bandas referentes ao fragmento estudado (~450 pb) eram então cortadas do gel e colocadas em tubos de 1,5 mL. A purificação do DNA contido nas bandas foi realizada através do kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida o DNA puro foi utilizado em PCR de sequenciamento.

Na PCR de sequenciamento foi utilizado o kit *DYEnamic ET DYE Terminator* (Amersham) e os iniciadores CitBFint (5' - ATT GCC GCA TTA ACA ATA ATT CAT C - 3') e CitBRint (5' - GTA ATT GAT ACT CCT ATT AAG TC - 3') que são direcionados a regiões mais internas do fragmento amplificado. A utilização de iniciadores mais internos teve o objetivo de promover o sequenciamento, com boa qualidade, das pontas do fragmento estudado. Estes iniciadores foram desenhados com base no alinhamento de seqüências deste gene de vários insetos, incluindo os triatomíneos. Os produtos destas PCRs foram seqüenciados duas vezes para cada iniciador, em seqüenciador MegaBACE500, e as seqüências produzidas avaliadas quanto à qualidade e montadas através do programa *Phred* (Ewing *et al.*, 1998), sendo considerados apenas os sítios que exibiram qualidade acima de 20.

Os produtos de PCR dos microssatélites foram diluídos 10 vezes e 2 μ L desta solução foram misturados individualmente, em placas de PCR com 96 poços, com 0,25 μ L do marcador de peso molecular ET-400R (Amersham) mais 8 μ L de Tween20 a 0,1%. Estes produtos sofreram choque térmico, consistindo no aquecimento da placa a 95°C e logo em seguida colocando a mesma em caixa contendo gelo, para que os fragmentos amplificados se desnaturassem, e foram, então, genotipados no mesmo seqüenciador descrito acima. Os produtos resultantes desta genotipagem foram analisados no programa *Fragment Profiler* (Amersham), sendo considerados apenas aqueles picos com altura acima de 100 e que apresentassem tamanho de acordo com o locus avaliado, que foram caracterizados por Garcia *et al.* (2004), apresentados na tabela 1.

4.3.3 Genética de populações

Nas análises do gene *cytB* as populações de *T. infestans* aqui avaliadas foram comparadas com haplótipos do gene *cytB* de *T. infestans* provenientes de

Chuquisaca, Bolívia (Giordano *et al.*, 2005), disponíveis no *site* do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sob números de acesso de AY702018 a AY702024.

As amostras de *T. brasiliensis* do município de Tauá aqui estudadas, também foram comparadas com populações de *T. brasiliensis* previamente estudadas (Monteiro *et al.*, 2004). Foram utilizados haplótipos do gene *cytB* de *T. brasiliensis* dos quatro padrões cromáticos: *brasiliensis*, *macromelasoma*, *juazeiro* e *melanica*, obtidos no GenBank sob os números de acesso: AY336524-AY336527 e AY494140-AY494170.

As seqüências foram alinhadas usando uma versão do programa *Clustal X* (Thompson *et al.*, 1997) integrada ao pacote *Seqtools* v. 8.2.085 (<http://www.seqtools.dk>). O polimorfismo das seqüências estudadas foi avaliado através dos parâmetros número médio de diferenças pareadas (\bar{D}), diversidade de nucleotídeos ($\frac{D_{NA}}{L}$), número de sítios polimórficos (S), número de *singletons* ($\frac{S}{L}$), número de haplótipos (H) e diversidade genética (\hat{H}). Estes parâmetros foram calculados através do programa Arlequin v. 2 (Schneider *et al.*, 2000), exceto o número de *singletons* que foi calculado através do programa DnaSP v.4 (Rozas *et al.*, 2003). A hipótese da evolução neutra (Kimura, 1968) foi avaliada através de três testes de neutralidade: teste D de Tajima (Tajima, 1989), teste D* de Fu e Li (Fu e Li, 1993) e teste F* de Fu e Li (Fu e Li, 1993). Todos estes parâmetros foram calculados através do programa DnaSP v. 4 (Rozas *et al.*, 2003).

Na análise dos 10 loci de microssatélites foram calculados os parâmetros número médio de diferenças pareadas (\bar{D}), diversidade genética média por loci ($\frac{D_{NA}}{L}$), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (H) e diversidade genética (\hat{H}). Estes parâmetros foram calculados através do programa Arlequin v. 2 (Schneider *et al.*, 2000). Também foram calculadas as heterozigosidades observadas e esperadas para cada locus por população.

A diferenciação genética entre as populações foi avaliada através do método AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), calculado pelo programa Arlequin v. 2.000 (Schneider *et al.*, 2000). Para *T. infestans* foram consideradas três regiões geográficas: (1) Estado do Rio Grande do Sul, (2) Brasil e (3) América do Sul. Para a primeira região (Rio Grande do Sul) foi considerada uma hierarquia: um grupo, formado por todas as amostras provenientes do Estado. Na segunda região (Brasil) foram consideradas duas hierarquias: um grupo, formado por todas as amostras do Brasil (Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Goiás), e três grupos, (I) Rio Grande do Sul, (II) Montes Claros e (III) Goiás. Na América do Sul também foram consideradas

duas hierarquias: um grupo, constituído por Brasil, Salvador Mazza (Argentina) e Yacuiba (Bolívia), e três grupos, (I) Brasil, (II) Salvador Mazza e (III) Yacuiba.

Para *T. brasiliensis* foram consideradas quatro hierarquias: (1) um grupo, formado por todas as amostras descritas; (2) dois grupos, (I) intradomicílio e peridomiciliar, (II) ambiente silvestre; (3) três grupos, (I) intradomicílio, (II) peridomicílio e (III) ambiente silvestre; e (4) seis grupos, (I) Cachoeira do Júlio, (II) Cachoeira dos Pedrosas, (III) Dormideira, (IV) Milagres, (V) Morada Nova e (VI) Mutuca.

Além da AMOVA, também foram calculados os F_{ST} pareados entre todas as amostras, através do programa Arlequin v.2 (Schneider *et al.*, 2000).

Os dendrogramas foram construídos através do programa *MEGA* v. 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) com base no algoritmo *neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987) utilizando as distâncias genéticas pareadas das populações estudadas. No intuito de compreender as relações entre os haplótipos do gene *cytB* observados nas amostras estudadas, foram construídos *network* de haplótipos usando o critério de 95% de parsimônia, através do programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000).

5 RESULTADOS

5.1 Ensaio com Inseticida

5.1.1 *Triatoma infestans*

Na determinação das DL50 entre as linhagens laboratoriais de *T. infestans* foi observado o menor valor para a linhagem de Montes Claros, 0,36 (ng/ninfa), sendo esta linhagem então selecionada para calcular as razões de resistência (RR) das amostras de *T. infestans* do Rio Grande do Sul e Yacuiba aqui estudadas (tabela 2). O Slope desta linhagem foi 2,09. A linhagem de Posse apresentou DL50 de 0,42 e Slope de 2,68. A RR desta linhagem foi 1,17.

Tabela 2: Valores de DL50, Slope e RR para *Triatoma infestans* do Rio Grande do Sul, Montes Claros, Posse e Yacuiba.

<i>Triatoma infestans</i>	DL50	IC 95%		Slope	IC 95%	RR (DL50)
Montes Claros	0,36	0,24	0,41	2,09	± 0,33	-
Posse	0,42	0,32	0,52	2,68	± 0,47	1,17
Mato Queimado	0,53	0,35	0,71	1,80	± 0,38	1,47
Guarani das Missões	0,35	0,24	0,55	1,35	± 0,22	0,97
Três de Maio	0,67	0,52	0,93	1,99	± 0,31	1,86
Doutor Maurício Cardoso	0,26	0,20	0,36	1,93	± 0,28	0,72
Yacuiba	10,84	7,71	14,64	1,52	± 0,19	30,11

Nota: Montes Claros é a linhagem laboratorial escolhida para se calcular as RR das demais populações. As DL50 estão representadas como nanograma do inseticida por ninfa tratada (ng/nt). Montes Claros (MG); Posse (GO); Yacuiba (Bolívia).

Os valores de DL50 para as amostras do Rio Grande do Sul variaram de 0,26 (Doutor Maurício Cardoso) a 0,67 (Três de Maio), gerando RR que variaram de 0,72 a 1,86 (tabela 2 e figura 6). Duas localidades estudadas (Doutor Maurício Cardoso e Guarani das Missões) apresentaram valores de DL50 menores que a linhagem de laboratório (Montes Claros). A DL50 observada para a linhagem de Yacuiba foi a maior neste estudo (DL50 = 10,84) e gerou uma RR de 30,11 (tabela 2 e figura 6). Os valores de slope das amostras do Rio Grande do Sul variaram de 1,35 (Guarani das Missões) a 1,99 (Três de Maio). Este parâmetro define a inclinação da reta no gráfico, e representa a homogeneidade da amostra analisada. Assim, Guarani das Missões é a amostra mais homogênea quanto a variação na mortalidade avaliada nos ensaios com deltametrina, e Três de Maio é a mais heterogênea.

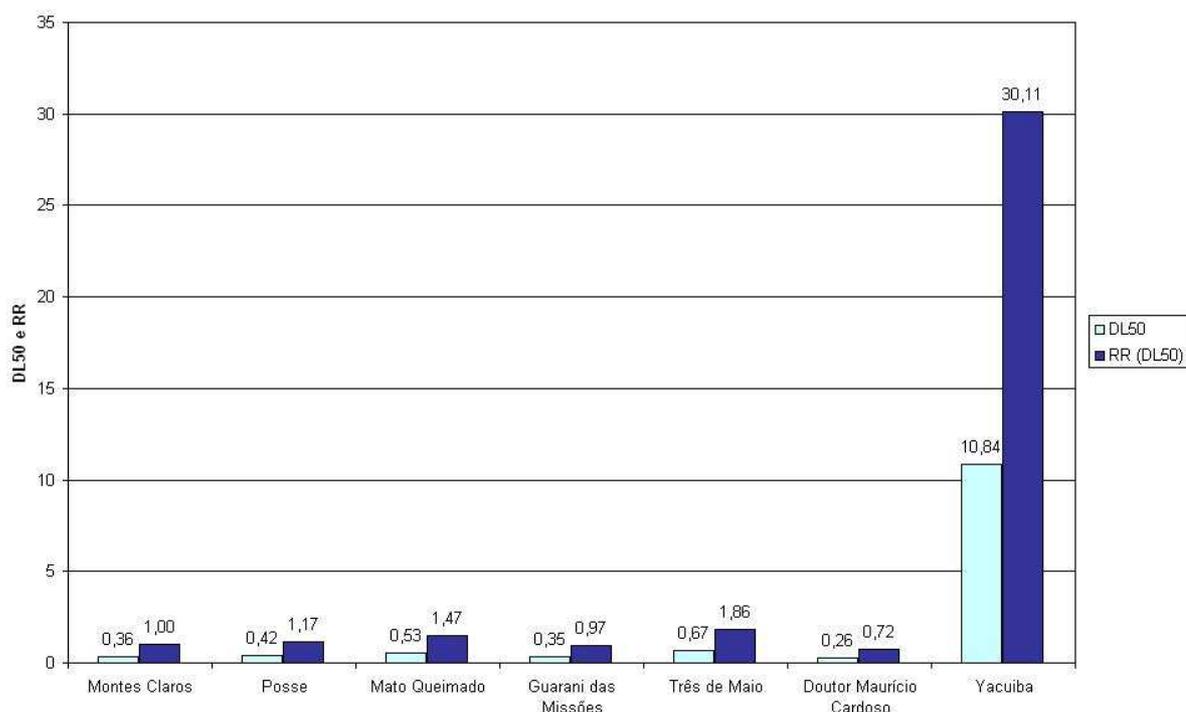


Figura 6: DL50 e RR observadas para as amostras de *Triatoma infestans* estudadas. Os valores também são mostrados na tabela 2.

5.1.2 *Triatoma brasiliensis*

Para *T. brasiliensis* uma única linhagem foi utilizada como suscetível, Crateús (CE), e esta apresentou DL50 de 0,19 (ng/ninfa) e Slope de 2,92 (tabela 3).

Tabela 3: Valores de DL50, Slope e RR para populações de *Triatoma brasiliensis* do Estado do Ceará, Nordeste do Brasil.

Captura	População	DL50	IC 95%		Slope	IC 95%		RR (DL50)
	Crateús	0,19	0,16	0,23	2,92	±0,27		-
I	Cachoeira do Júlio (I)	0,33	0,29	0,38	2,82	±0,38		1,74
	Cachoeira dos Pedrosas (I)	0,22	0,18	0,26	2,83	±0,41		1,16
	Dormideira (I)	0,34	0,27	0,39	3,26	±0,56		1,79
	Mutuca (I)	0,30	0,26	0,39	2,29	±0,34		1,58
II	Cachoeira dos Pedrosas (P)	0,24	0,20	0,30	3,23	±0,63		1,26
	Morada Nova do Thomas (P)	0,33	0,27	0,44	3,58	±0,73		1,74
	Mutuca (P)	0,30	0,24	0,46	2,58	±0,61		1,58
	Cachoeira dos Pedrosas (S)	0,19	0,17	0,22	4,35	±0,68		1,00

Nota: Crateús é a linhagem laboratorial escolhida para se calcular as razões de resistência das demais populações. As DL50 estão representadas como nanograma do inseticida por ninfa tratada (ng/nt). I: intradomicílio, P: peridomicílio e S: silvestre. I – primeira captura; II – segunda captura, realizada um ano após borrifação das residências com piretróides.

As DL50 das amostras provenientes do município de Tauá variaram de 0,19, Cachoeira dos Pedrosas (S) a 0,34 Dormideira (I). Estes valores geraram RR que

variaram de 1,00 a 1,79 (tabela 3 e figura 7). Os valores de *Slope* para estas amostras variaram de 2,29, Mutuca (I) a 4,35 Cachoeira dos Pedrosas (S). Na figura 7 são observadas as RR para as amostras de *T. brasiliensis* de Tauá estudadas neste trabalho.

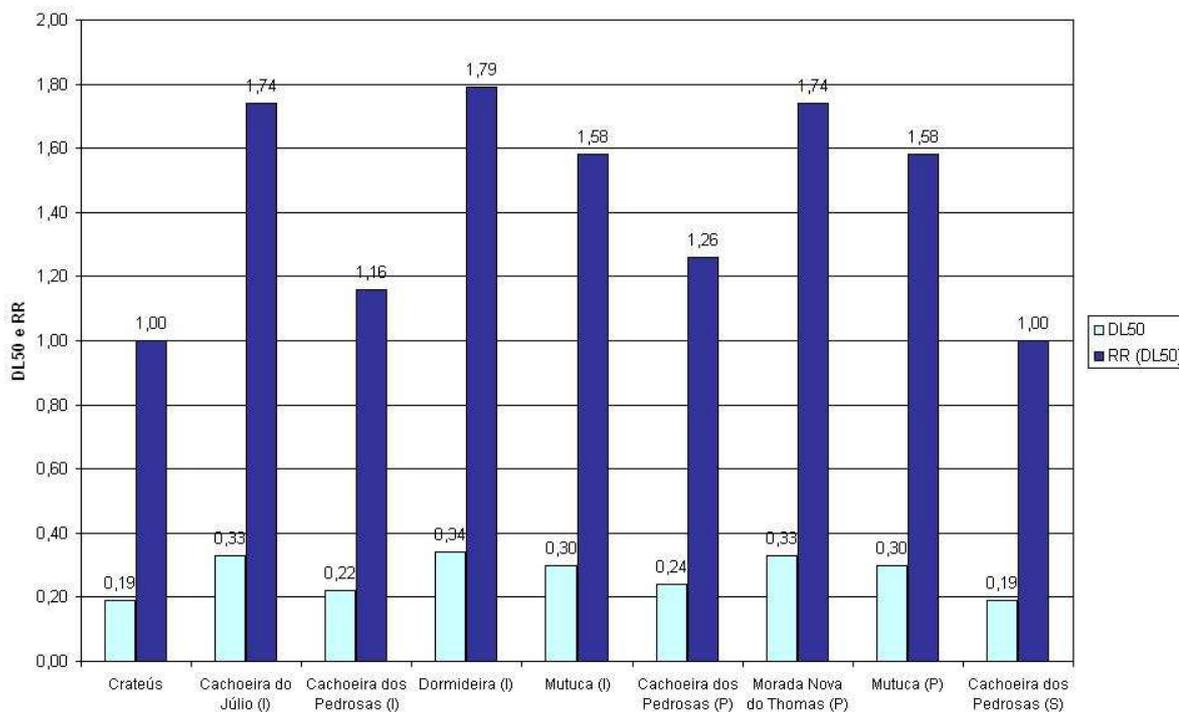


Figura 7: DL50 e RR observadas para as amostras de *Triatoma brasiliensis* estudadas. Os valores também são mostrados na tabela 3.

5.2 Variabilidade genética de *Triatoma infestans*

O estudo da variabilidade genética das amostras de *T. infestans* foi realizado utilizando-se dois marcadores moleculares: um “alvo” mitocondrial, o gene do citocromo B (*cytB*) que foi sequenciado e as sequências obtidas utilizadas nas análises, e um “alvo” nuclear, 10 loci de microssatélites que foram amplificados com iniciadores descritos por Garcia *et al.* (2004) (tabela 1).

5.2.1 Variabilidade genética do gene *cytB*

Uma vez que tivemos o interesse de avaliar a variabilidade genética das amostras de *T. infestans* aqui estudadas, inicialmente foi verificada a estrutura genética destas amostras através da AMOVA (análise de variância molecular) para definir as populações diferenciadas geneticamente. Nesta etapa do estudo foram avaliadas as amostras do Rio Grande do Sul (municípios Mato Queimado, Guarani das Missões, Três de Maio e Doutor Maurício Cardoso), as de Montes Claros (MC) e

Posse (PO) (linhagens suscetíveis a inseticidas), uma amostra de Salvador Mazza (Província de Salta, Argentina), que apresenta RR para deltametrina de 133,1 (Picollo *et al.*, 2005), e uma amostra de Yacuiba (Departamento de Tarija, Bolívia), que apresentou uma RR de 30,11 (tabela 2).

Tabela 4: AMOVA para as amostras de *Triatoma infestans* estudadas calculadas com base nas seqüências do gene mitocondrial *cytB*.

Região geográfica	Hierarquia	Categoria	% Variação	Índice de endocruzamento
Rio Grande do Sul	Um Grupo	Entre populações	5,58	$F_{ST} = 0,056$
		Dentro da população	94,42	
Brasil	Um Grupo	Entre populações	7,41	$F_{ST} = 0,074$
		Dentro da população	92,59	
	Três Grupos	Entre grupos	5,06	$F_{CT} = 0,051$
		Entre populações dentro dos grupos	4,22	$F_{SC} = 0,044$
		Dentro dos grupos	90,72	$F_{ST} = 0,093$
América do Sul	Um Grupo	Entre populações	8,90	$F_{ST} = 0,089$
		Dentro da população	91,10	
	Três Grupos	Entre grupos	2,71	$F_{CT} = 0,027$
		Entre populações dentro dos grupos	7,51	$F_{SC} = 0,077$
		Dentro dos grupos	89,78	$F_{ST} = 0,102$

Nota: Foram avaliadas três regiões geográficas (Rio Grande do Sul, Brasil e América do Sul). As hierarquias foram avaliadas em um e três grupos, e as porcentagens de variação definidas para cada categoria, como também os índices de endocruzamento.

Na tabela 4 é encontrada a AMOVA para todas as amostras de *T. infestans* aqui estudadas. No Rio Grande do Sul foi observada 5,58% de variação entre as populações, e o valor de F_{ST} para esta análise foi de 0,056. Este valor indica pouca diferenciação genética entre as amostras do Rio Grande do Sul, e, portanto, estes *T. infestans* fazem parte de apenas uma única população genética. Assim, a partir de então, estas amostras serão consideradas, para as demais análises, como uma única população denominada Rio Grande do Sul (RS).

Considerando o Brasil como um grupo foi observado 7,41% de variação entre as populações, com um F_{ST} para esta análise de 0,074. Nas análises para o Brasil separado em três grupos foi observado 5,06% de variação entre os grupos, e 4,22% de variação entre as populações dentro dos grupos. Nesta análise é observada pouca diferenciação genética entre amostras de mesmo grupo ($F_{SC} = 0,044$) e uma diferenciação um pouco maior entre os grupos ($F_{CT} = 0,051$), o que contribuiu para a diferenciação entre todas as populações ($F_{ST} = 0,093$) (tabela 4).

Considerando a América do Sul como um grupo foi observado 8,90% de variação entre as populações, o que gerou um F_{ST} de 0,089. Nas análises para a América do Sul separada em três grupos foi observado 2,71% de variação entre os grupos e 7,51% de variação entre as populações dentro dos grupos. Nesta análise foi observada pouca diferenciação genética entre os grupos ($F_{CT} = 0,027$) e moderada diferenciação genética entre as populações de mesmo grupo ($F_{SC} = 0,077$). Aqui observamos que as diferenças entre populações de mesmo grupo são mais importantes que as variações entre os grupos para a diferenciação genética de todas as amostras ($F_{ST} = 0,102$) (tabela 4).

Com a análise AMOVA foram definidas cinco populações geneticamente distintas para *T. infestans*: Montes Claros (MC), Posse (PO), Rio Grande do Sul (RS), Salvador Mazza (SM) e Yacuiba (YC). Além destas amostras, também foram acrescentadas amostras de Chuquisaca (Bolívia), para a análise filogenética, na construção do *network*. A variabilidade genética foi definida apenas para as populações de *T. infestans* obtidas neste trabalho.

Entre os 80 *T. infestans* analisados foram detectados 42 haplótipos (seqüências ainda não depositadas no GenBank), o que correspondeu a uma diversidade genética (\hat{H}) de 0,848 (tabela 5). A análise dos haplótipos demonstrou que 72 (16,07%) dos 448 sítios eram polimórficos, sendo 34 parsimônio-informativos. Foram observados 38 *singletons* nestes 72 sítios. As substituições do tipo transição ocorreram em 43 das mutações, enquanto que as transversões foram as mais freqüentes, ocorrendo em 45 substituições. Na análise das seqüências de aminoácidos preditas, correspondentes aos haplótipos, foram observadas 32 substituições (21,48%) nos 149 aminoácidos.

Para as populações separadas, os maiores números de sítios polimórficos ($S = 33$) e *singletons* ($\mathbb{S} = 21$) foram observados em RS (tabela 5). Apesar disso, os maiores valores para número médio de diferenças pareadas, \mathbb{D} (5,636), e diversidade de nucleotídeos, \mathbb{D}_{π} (0,013), foram observados em YC. O maior número de haplótipos foi observado em RS ($H = 17$) e o menor número ocorreu em SM ($H = 4$). A diversidade genética variou de 0,533 (SM) a 0,978 (MC). Os valores obtidos através dos três testes de neutralidade (teste D de Tajima, teste D^* de Fu e Li, e teste F^* de Fu e Li) demonstram que a variabilidade genética das populações MC, PO e YC se mostram estatisticamente dentro da neutralidade (tabela 6). Já para as populações RS e SM, inclusive a população total, estes testes de neutralidade apresentaram valores estatisticamente fora da neutralidade, sendo estes valores

negativos. Estes resultados indicam a ocorrência de expansão populacional nestas populações.

Tabela 5: Variabilidade genética de sequências do gene mitocondrial *cytB* em populações de *Triatoma infestans* do Brasil, Argentina e Bolívia.

Localidades	Código	n	$\frac{P}{B}$	$\frac{P}{B}$	S	$\frac{S}{B}$	H	Ĥ
Montes Claros	MC	10	4,800	0,011	17	11	9	0,978
Posse	PO	10	4,313	0,010	19	16	7	0,867
Rio Grande do Sul	RS	40	2,549	0,006	33	21	17	0,767
Salvador Mazza	SM	10	2,220	0,005	11	11	4	0,533
Yacuiba	YC	10	5,636	0,013	17	5	8	0,933
Total		80	4,161	0,009	72	38	42	0,848

Nota: n: número amostral; $\frac{P}{B}$ número médio de diferenças pareadas; $\frac{P}{B}$ diversidade de nucleotídeos; S: número de sítios polimórficos; $\frac{S}{B}$ número de singletons; H: número de haplótipos; e Ĥ: diversidade genética.

Tabela 6: Testes de neutralidade calculados para as populações de *Triatoma infestans* do Brasil, Argentina e Bolívia, através de sequências do gene mitocondrial *cytB*.

Localidade	Código	Teste D de Tajima	Teste D* de Fu e Li	Teste F* de Fu e Li
Montes Claros	MC	-0,97010	-1,22552	-1,30945
Posse	PO	-1,70890	-1,77423	-1,98161
Rio Grande do Sul	RS	-2,3428*	-4,57623*	-4,51535*
Salvados Mazza	SM	-1,94429*	-2,27595*	-2,46830*
Yacuiba	YC	-0,35107	0,38608	0,22867
Total	-	-2,57555*	-4,44933*	-4,42579*

Nota: * Valores estatisticamente significantes (P<0,05).

Na tabela 7 é mostrada a freqüência dos haplótipos de acordo com as populações/localidades estudadas. O haplótipo mais freqüente e encontrado em mais de uma população é o número 1, o qual já está depositado no site do GenBank sob o número de acesso AY062165. Devido à elevada freqüência deste haplótipo podemos concluir que ele é o mais antigo dentre os demais haplótipos encontrados no Brasil, Argentina e Bolívia. Interessantemente, este haplótipo não foi observado em Montes Claros (MC), nem em Chuquisaca (Bolívia).

Tabela 7: Frequência dos haplótipos do gene mitocondrial *cytB* observados nas populações de *Triatoma infestans* estudadas.

MC 10	PO 10	RS 40		ST 10	YC 10	CHU 7
-	1 (0,4)	1 (0,38)		1 (0,7)	1 (0,1)	-
4 (0,2)	14 (0,1)	2 (0,1)	26 (0,02)	34 (0,1)	3 (0,3)	A (0,68)
6 (0,1)	15 (0,1)	5 (0,04)	27 (0,02)	35 (0,1)	37 (0,1)	B (0,18)
7 (0,1)	16 (0,1)	20 (0,02)	28 (0,02)	36 (0,1)	38 (0,1)	C (0,08)
8 (0,1)	17 (0,1)	21 (0,02)	29 (0,02)	-	39 (0,1)	D (0,02)
9 (0,1)	18 (0,1)	22 (0,02)	30 (0,02)	-	40 (0,1)	E (0,02)
10 (0,1)	19 (0,1)	23 (0,02)	31 (0,02)	-	41 (0,1)	F (0,02)
11 (0,1)	-	24 (0,02)	32 (0,02)	-	42 (0,1)	G (0,02)
12 (0,1)	-	25 (0,02)	33 (0,02)	-	-	-
13 (0,1)	-	-	-	-	-	-

Nota: Os haplótipos da Bolívia (Chuquisaca) estão disponíveis no site do GenBank sob os números de acesso: AY702018 a AY702024. O haplótipo 1 está depositado no GenBank sob número de acesso AY062165.

Interessantemente Yacuiba e Chuquisaca, que estão no mesmo país (Bolívia), não apresentaram haplótipos em comum. Em Yacuiba o haplótipo mais freqüente foi o 3, enquanto que em Chuquisaca foi o A (já descrito por Giordano *et al.*, 2005). Nenhum dos haplótipos encontrados em Chuquisaca foi identificado no Brasil ou Argentina. No *network* da figura 8 podemos notar a existência de alguns *loops* entre os haplótipos encontrados em RS, o que representa homoplasia e ocorrência de mutações reversas/paralelas (Posada & Crandall, 2001). Em todo *network* são observados poucos haplótipos perdidos/não amostrados e, como descrito acima, Chuquisaca e Montes Claros se encontram isoladas por não apresentarem nenhum haplótipo em comum com as demais amostras.

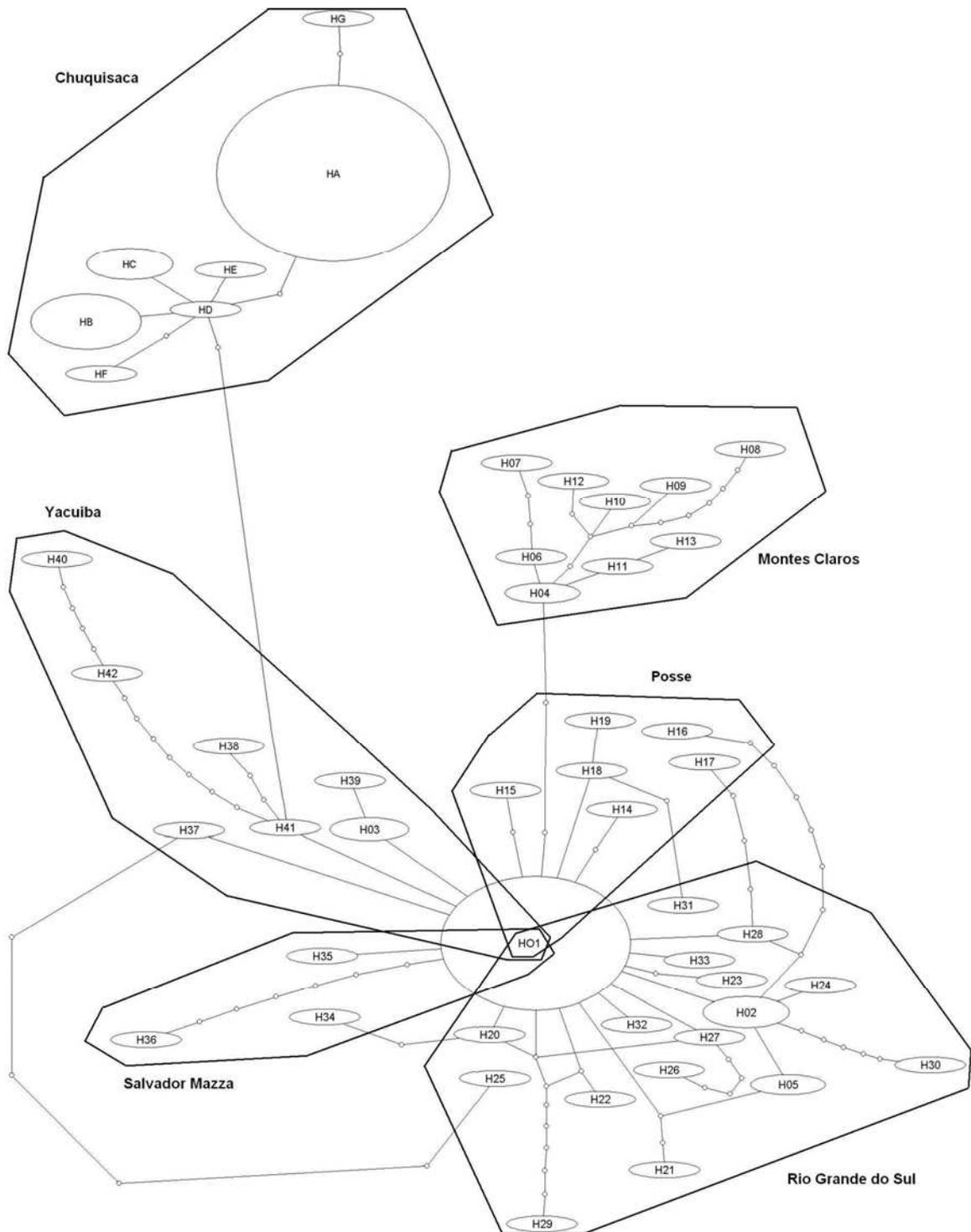


Figura 8: Network dos haplótipos do gene mitocondrial *cytB* observados nos *Triatoma infestans* do Brasil, Argentina e Bolívia. As elipses representam os haplótipos, e a área delas a freqüência dos haplótipos. Os círculos menores representam haplótipos perdidos ou não amostrados, necessários para a correta conexão dos haplótipos estudados.

De acordo com Wright (1978), os valores de F_{ST} podem ser interpretados da seguinte forma: 0 a 0,05 indica pouca diferenciação genética; de 0,05 a 0,15 indica moderada diferenciação genética; de 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação genética e acima de 0,25, diferenciação genética muito grande. Baseado nesta

forma de interpretação pode-se observar moderada diferenciação genética entre MC e PO, entre MC e SM, entre PO e YC, e entre RS e YC. Grande diferenciação genética foi observada entre MC e SM e entre SM e YC (tabela 8).

Tabela 8: F_{ST} pareado entre as amostras de *Triatoma infestans* estudadas, calculados através das sequências do gene mitocondrial *cytB*.

	MC	PO	RS	SM	YC
MC	-				
PO	0,078*	-			
RS	0,144*	-0,004	-		
SM	0,244*	0,028	0,012	-	
YC	0,044	0,063	0,120*	0,211*	-

Nota: * Valores estatisticamente significantes ($P = 0,05$; 3.024 permutações).

5.2.2 Variabilidade genética dos loci de microssatélites

As análises da variabilidade dos 10 loci de microssatélite nas amostras de *T. infestans* do Brasil, Argentina e Bolívia foram realizadas considerando as cinco populações definidas anteriormente: Montes Claros, Posse, Rio Grande do Sul, Salvador Mazza e Yacuiba.

Na análise dos 130 exemplares de *T. infestans* foram identificados 227 haplótipos, com todos os 10 loci polimórficos. Isto gerou uma diversidade genética de 0,998 (tabela 9). Nesta análise foi observado um valor para número médio de diferenças pareadas ($\frac{FD}{n}$) de 6,197, o que correspondeu a uma diversidade genética média por loci ($\frac{FD}{n}$) de 0,620.

Tabela 9: Variabilidade genética de 10 loci de microssatélites em populações de *Triatoma infestans* do Brasil, Argentina e Bolívia.

Localidades	Código	n	$\frac{FD}{n}$	$\frac{FD}{n}$	S	H	\hat{H}
Montes Claros	MC	30	3,656	0,366	9	51	0,993
Posse	PO	30	3,064	0,306	10	43	0,980
Rio Grande do Sul	RS	30	4,391	0,439	10	56	0,997
Salvador Mazza	SM	10	4,047	0,405	8	19	0,995
Yacuiba	YC	30	5,319	0,532	10	58	0,999
Total	-	130	6,197	0,620	10	227	0,998

Nota: n: número amostral; $\frac{FD}{n}$ número médio de diferenças pareadas; $\frac{FD}{n}$ diversidade genética média por loci; S: número de loci polimórficos; H: número de haplótipos; e \hat{H} : diversidade genética.

A análise das populações separadamente demonstrou que o número de haplótipos variou de 19 (SM) a 58 (YC). Todas as populações apresentaram elevada

diversidade genética, sendo a maior observada em YC ($\hat{H} = 0,999$). As populações PO, RS e YC apresentaram todos os loci polimórficos, mas em MC foi observado um locus monomórfico e SM dois monomórficos (tabela 9). Número médio de diferenças pareadas ($\frac{P(P)}{n}$) variou de 3,064 (PO) a 5,319 (YC), o que resultou em diversidade genética média por loci ($\frac{P(A)}{n}$) variando de 0,306 (PO) a 0,532 (YC).

O número médio de alelos por locus detectado por população variou de 2,7 (MC) a 4,8 (YC) (tabela 10). Os menores valores de heterozigosidade média observada e esperada foram observados em PO ($H_O = 0,187$; $H_E = 0,329$), enquanto os maiores valores foram observados em YC ($H_O = 0,350$; $H_E = 0,548$). A população MC apresentou o locus TiC09 monomórfico, e a população SM os locus TiC08 e TiD09 monomórficos (tabela 10).

Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados em pelo menos um dos 10 loci analisados em todas as populações (tabela 13), devido à ocorrência de excesso de homozigotos nas amostras.

Tabela 10: Variação genética apresentada pelos 10 loci de microsatélite nas populações de *Triatoma infestans* estudadas.

Localidade		Locus										Média
		TiA02	TiC02	TiC08	TiC09	TiD09	TiE02	TiE12	TiF03	TiF11	TiG03	
MC	N_A	3	5	2	1	3	3	2	3	2	3	2,7
	H_O	0,367*	0,367*	0,167*	0	0,133*	0,267*	0,300	0,167*	0,100*	0,200*	0,207
	H_E	0,428	0,699	0,345	0	0,273	0,568	0,463	0,375	0,210	0,434	0,380
PO	N_A	4	2	2	5	3	8	4	3	4	6	4,1
	H_O	0,233*	0,133	0,167	0,133	0,067	0,300*	0,200*	0,400	0,067*	0,167	0,187
	H_E	0,668	0,126	0,186	0,130	0,098	0,459	0,729	0,460	0,247	0,191	0,329
RS	N_A	5	7	2	5	6	5	6	2	2	6	4,6
	H_O	0,433	0,233*	0,067*	0,067*	0,600*	0,533*	0,367	0,133	0,067*	0,300*	0,280
	H_E	0,394	0,519	0,216	0,668	0,689	0,643	0,535	0,213	0,213	0,555	0,465
SM	N_A	2	2	1	3	1	3	2	4	3	3	2,4
	H_O	0,200	0,200	0	0,500	0	0,400	0,400	0,200*	0,300	0,400	0,260
	H_E	0,574	0,510	0	0,558	0	0,416	0,537	0,784	0,632	0,558	0,457
YC	N_A	5	5	4	5	5	5	3	8	3	5	4,8
	H_O	0,333*	0,700*	0,200*	0,133*	0,633	0,467	0,400	0,267*	0,167*	0,200*	0,350
	H_E	0,399	0,634	0,462	0,385	0,605	0,604	0,485	0,794	0,473	0,634	0,548

Nota: N_A : número de alelos, H_O : heterozigosidade observada, H_E : heterozigosidade esperada. * Desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$).

Tabela 11: Relação dos alelos observados nos 10 loci de microssatélite nas populações de *Triatoma infestans* estudadas.

Locus	Alelo	MC	PO	RS	YC	SM	Locus	Alelo	MC	PO	RS	YC	SM
TiA02	169		X				TiE02	121		X			
	173	X	X					145		X			
	183			X	X			149	X			X	
	185					X		151		X			X
	189					X		153		X			
	191			X				155		X	X	X	
	193			X				157		X			X
	197	X				X		159		X			X
	199	X	X	X	X			161		X	X	X	
	213		X		X			171				X	
	225			X				185	X				
	245				X			189	X				
TiC02	147			X			269			X			
	153			X			271			X			
	155			X			273			X			
	161		X		X		303		X		X	X	
	163			X			309		X				
	165	X					315	X	X	X	X	X	
	167	X					321	X	X	X			
	169	X	X	X	X		325				X		
	175			X	X		345			X			
	177	X					162					X	
	191			X			168					X	
	199				X		170		X	X		X	
201				X		172		X		X			
203	X					174				X			
205					X	176	X			X	X		
217					X	178				X			
TiC08	199				X		180				X		
	201		X				182		X				
	203				X		186				X		
	205		X	X	X	X	192				X		
	207	X					196	X					
	211				X		204	X					
	217	X					230			X			
	245			X			197		X	X	X	X	
TiC09	133					X	215		X				
	135		X				223		X				
	137		X				229		X	X	X	X	
	139		X	X			233					X	
	141	X		X	X	X	249				X		
	151					X	283	X					
	157				X		190					X	
	163		X				194			X			
	177		X				202				X		
	211				X		214		X				
	217				X		224			X			
	233			X			228			X			
235			X			232		X		X			
241				X		234					X		
255			X			240	X	X	X	X	X		
TiD09	190	X					242	X		X			
	192				X		250	X					
	202		X				254		X				
	208		X		X		258		X				
	210	X	X	X	X		262			X	X		
	214				X		266					X	
	224	X					270		X				
	234				X								
	244			X									
	270			X									
	272			X									
	274			X									
278			X										

Nas análises dos 10 loci de microssatélite em *T. infestans* foram identificados 64 alelos exclusivos do Brasil, onde todas as amostras avaliadas foram caracterizadas como suscetíveis a deltametrina; 34 alelos exclusivos de Salvador

Mazza e/ou Yacuiba, cujos insetos são resistentes a deltametrina; e 26 alelos pertencentes às populações dos três países (tabela 11).

Os 34 alelos exclusivos das populações resistentes (SM e/ou YC) foram: TiA02-185, TiA02-189, TiA02-245, TiC02-199, TiC02-201, TiC02-205, TiC02-217, TiC08-199, TiC08-203, TiC08-211, TiC09-133, TiC09-151, TiC09-157, TiC09-211, TiC09-217, TiC09-241, TiD09-192, TiD09-214, TiD09-234, TiE02 – 171, TiE12-325, TiF03-162, TiF03-168, TiF03-174, TiF03-178, TiF03-180, TiF03-186, TiF03-192, TiF11-233, TiF11-249, TiG03-190, TiG03-202, TiG03-234, e TiG03-266 (tabela 14).

Na tabela 12 é apresentada a AMOVA realizada para os 10 loci de microssatélites dos *T. infestans* estudados. O Brasil apresentou 0,98% de variação entre populações, o que gerou um $F_{ST} = 0,010$, que indica pouca diferenciação genética segundo as definições de Wright (1978).

Considerando a América do Sul como um único grupo foi observada 0,74% de variação entre populações, gerando um F_{ST} de 0,007. Já quando são considerados três grupos, é observado um valor negativo para a proporção de variação (-0,40) entre os grupos, o que pode ser interpretado como um valor nulo. Nesta análise foi observada pouca diferenciação genética entre as populações de mesmo grupo ($F_{SC} = 0,010$) e também pouca diferenciação genética entre os grupos ($F_{CT} = -0,004$) (tabela 15). O valor de F_{ST} para esta análise também demonstra a existência de pouca diferenciação entre todas as populações ($F_{ST} = 0,006$).

Tabela 12: AMOVA para as amostras de *Triatoma infestans* estudadas através dos 10 loci de microssatélite.

Região Geográfica	Hierarquia	Categoria	% Variação	Índice de Fixação
Brasil	Um Grupo	Entre populações	0,98	$F_{ST} = 0,010$
		Dentro das populações	99,02	
América do Sul	Um Grupo	Entre populações	0,74	$F_{ST} = 0,007$
		Dentro das populações	99,26	
	Três Grupos	Entre Grupos	-0,40	$F_{CT} = -0,004$
		Entre populações dentro dos grupos	0,98	$F_{SC} = 0,010$
		Dentro dos grupos	99,42	$F_{ST} = 0,006$

Nota: Foram avaliadas duas regiões geográficas (Brasil e América do Sul). As hierarquias foram avaliadas em um e três grupos, e as porcentagens de variação definidas para cada categoria, como também os índices de endocruzamento.

Também foram calculados os F_{ST} pareados entre as populações estudadas, e todos os valores se mostraram baixos, corroborando com os resultados da AMOVA e demonstrando pouca diferenciação genética entre as populações de *T.*

infestans estudadas com estes loci de microssatélites (tabela 13), segundo o critério de Wright (1978).

Tabela 13: F_{ST} pareado entre as amostras de *Triatoma infestans* estudadas, calculados através dos 10 loci de microssatélite.

	MC	PO	RS	SM	YC
MC	-				
PO	0,013*	-			
RS	0,005*	0,011*	-		
SM	0,006*	0,013*	0,004*	-	
YC	0,004*	0,010*	0,002*	0,003*	-

Nota: * Valores estatisticamente significantes ($P = 0,05$; 3.024 permutações)

5.3 Variabilidade genética de *Triatoma brasiliensis*

Uma vez que tivemos o interesse de avaliar a variabilidade genética das amostras de *T. brasiliensis* aqui estudadas, inicialmente foi verificada a estrutura genética destas amostras através da AMOVA para definir as populações geneticamente diferentes. Uma vez que ainda não se encontra na literatura descrição de microssatélites para esta espécie de triatomíneo, a variabilidade genética foi avaliada apenas com uso de sequências do gene *cytB*.

Na tabela 14 é encontrada a AMOVA para todas as amostras de *T. brasiliensis* aqui estudadas. Para todas as hierarquias estabelecidas, as proporções de variação observadas entre as populações dentro dos grupos não passaram de 2.04% (Seis grupos), gerando valores de F_{ST} variando entre 0,013 e 0,014. Estes valores são característicos de uma única população, composta por todas as localidades estudadas. Estes resultados não evidenciam a formação de subpopulações.

Entre os 52 exemplares de *T. brasiliensis* analisados foram detectados 50 haplótipos (seqüências não depositadas no GenBank), o que correspondeu a uma diversidade genética (\hat{H}) de 0,998 (tabela 15). A análise dos haplótipos demonstrou que 91 (25,85%) dos 352 sítios eram polimórficos, sendo 86 parsimônio-informativos. Foram observados 5 singletons nestes 91 sítios. As substituições do tipo transição foram as mais freqüentes, ocorrendo em 50 das mutações. Já as transversões foram observadas em 38 substituições. Também ocorreram 3 substituições mistas, aquelas onde eram encontradas substituições dos dois tipos. Na análise das seqüências de aminoácidos preditas, correspondentes aos haplótipos, foram observadas 34 substituições (29,31%) nos 116 aminoácidos.

Tabela 14: AMOVA para as amostras de *Triatoma brasiliensis* do município de Tauá, Estado do Ceará, calculada através das sequências do gene mitocondrial *cytB*.

Hierarquia	Categoria	% Variação	Índice de Fixação
Um Grupo	Entre Populações	1,44	$F_{ST} = 0,014$
	Dentro das Populações	98,56	
Dois Grupos	Entre Grupos	-0,32	$F_{SC} = 0,016$
	Entre Populações dentro dos Grupos	1,57	$F_{ST} = 0,013$
	Dentro das Populações	98,75	$F_{CT} = -0,003$
	Entre Grupos	-0,10	$F_{SC} = 0,015$
Três Grupos	Entre Populações dentro dos Grupos	1,56	$F_{ST} = 0,014$
	Dentro das Populações	98,59	$F_{CT} = -0,001$
	Entre Grupos	-0,70	$F_{SC} = 0,020$
	Entre Populações dentro dos Grupos	2,04	$F_{ST} = 0,013$
Seis Grupos	Dentro das Populações	98,66	$F_{CT} = -0,007$

Nota: Foram consideradas quatro hierarquias: um grupo (todas as amostras), dois grupos (I. intradomicílio + peridomicílio; II. ambiente silvestre), três grupos (I. intradomicílio; II. peridomicílio; III. ambiente silvestre), e seis grupos (I. Cachoeira do Júlio; II. Cachoeira dos Pedrosas; III. Dormideira; IV. Milagres; V. Morada Nova do Thomas; VI. Mutuca). $P = 0,05$ (1.023 permutações).

Tabela 15: Variabilidade genética do gene mitocondrial *cytB* em *Triatoma brasiliensis* do município de Tauá, Estado do Ceará.

Amostras	Código	n	$\overline{d_p}$	$\overline{d_{p q}}$	S	\overline{S}	H	\hat{H}
Cachoeira do Júlio (I)	CJI	4	13,00	0,037	26	26	4	1,000
Cachoeira dos Pedrosas (I)	CPI	9	7,19	0,020	21	11	8	0,972
Dormideira (I)	DMI	5	18,40	0,052	33	7	5	1,000
Mutuca (I)	MUI	6	8,93	0,025	21	13	6	1,000
Cachoeira dos Pedrosas (P)	CPP	5	5,20	0,015	10	4	5	1,000
Morada Nova do Thomas (P)	MNP	6	7,87	0,022	20	16	6	1,000
Mutuca (P)	MUP	5	1,40	0,004	3	2	4	0,900
Cachoeira dos Pedrosas (S)	CPS	7	13,05	0,037	25	2	7	1,000
Milagres (S)	MLS	5	11,60	0,033	25	17	5	1,000
Todas as amostras	Total	52	21,52	0,061	91	5	50	0,998

Nota: n: número amostral; $\overline{d_p}$: número médio de diferenças pareadas; $\overline{d_{p|q}}$: diversidade de nucleotídeos; S: número de sítios polimórficos; \overline{S} : número de singletons; H: número de haplotipos e \hat{H} : diversidade genética.

As análises das amostras separadamente demonstraram que os maiores números de sítios polimórficos ($S = 33$) foram observados em DMI (tabela 15), onde também foi observado o maior valor para diversidade de nucleotídeos ($\overline{d_p} = 0,052$). O maior número de singletons ($\overline{S} = 26$) foi observado em CJI e o maior número de haplotipos foi observado em CPI ($H = 8$), gerando uma diversidade genética (\hat{H}) de 0,972.

Os valores obtidos através dos três testes de neutralidade, teste D de Tajima (Tajima, 1989), teste D^* de Fu e Li (Fu & Li, 1993) e teste F^* de Fu e Li (Fu & Li,

1993), demonstram que a variabilidade genética de todas as amostras estudadas se encontra estatisticamente dentro da neutralidade (tabela 16), exceto o resultado do teste D* de Fu e Li que evidenciou a população total fora da neutralidade, com valor positivo, o que representa a ocorrência de seleção balanceadora.

Tabela 16: Testes de neutralidade calculados para as populações de *Triatoma brasiliensis* do Município de Tauá, através de sequências do gene mitocondrial *cytB*.

Amostras	Código	Teste D de Tajima	Teste D* de Fu e Li	Teste F* de Fu e Li
Cachoeira do Júlio (I)	CJI	-0,859	-0,859	-0,859
Cachoeira dos Pedrosas (I)	CPI	-0,340	-0,598	-0,600
Dormideira (I)	DMI	1,211	1,211	1,306
Mutuca (I)	MUI	-0,180	-0,302	-0,301
Cachoeira dos Pedrosas (P)	CPP	0,596	0,596	0,629
Morada Nova do Thomas (P)	MNP	0,637	-0,886	-0,907
Mutuca (P)	MUP	-0,175	-0,175	-0,175
Cachoeira dos Pedrosas (S)	CPS	1,580	1,365	1,560
Milagres (S)	ML	-0,248	-0,248	-0,267
Todas as amostras	Total	0,242	1,600*	1,304

Nota: * Valor estatisticamente significativo ($P < 0,05$).

No network da figura 9 podemos notar a existência de alguns loops entre os haplótipos do gene *cytB* encontrados nos *T. brasiliensis*, o que representa homoplasia e ocorrência de mutações reversas/paralelas (Posada & Crandall, 2001). Em todo *network* são observados diversos haplótipos perdidos/não amostrados e não existe a formação de nenhum grupo isolado. Apesar disso, quando os haplótipos são identificados de acordo com o ambiente de obtenção dos exemplares, verifica-se que os *T. brasiliensis* do ambiente silvestre estão mais próximos dos encontrados no peridomicílio.

No dendrograma da figura 10 podemos observar as relações entre os haplótipos de *T. brasiliensis* estudados neste trabalho e aqueles previamente avaliados (Monteiro *et al.*, 2004). Podemos notar que os haplótipos descritos aqui formaram um clado com os demais haplótipos descritos para o fenótipo *brasiliensis*, embora não tenha ocorrido a formação de clados diferenciados para as localidades estudadas.

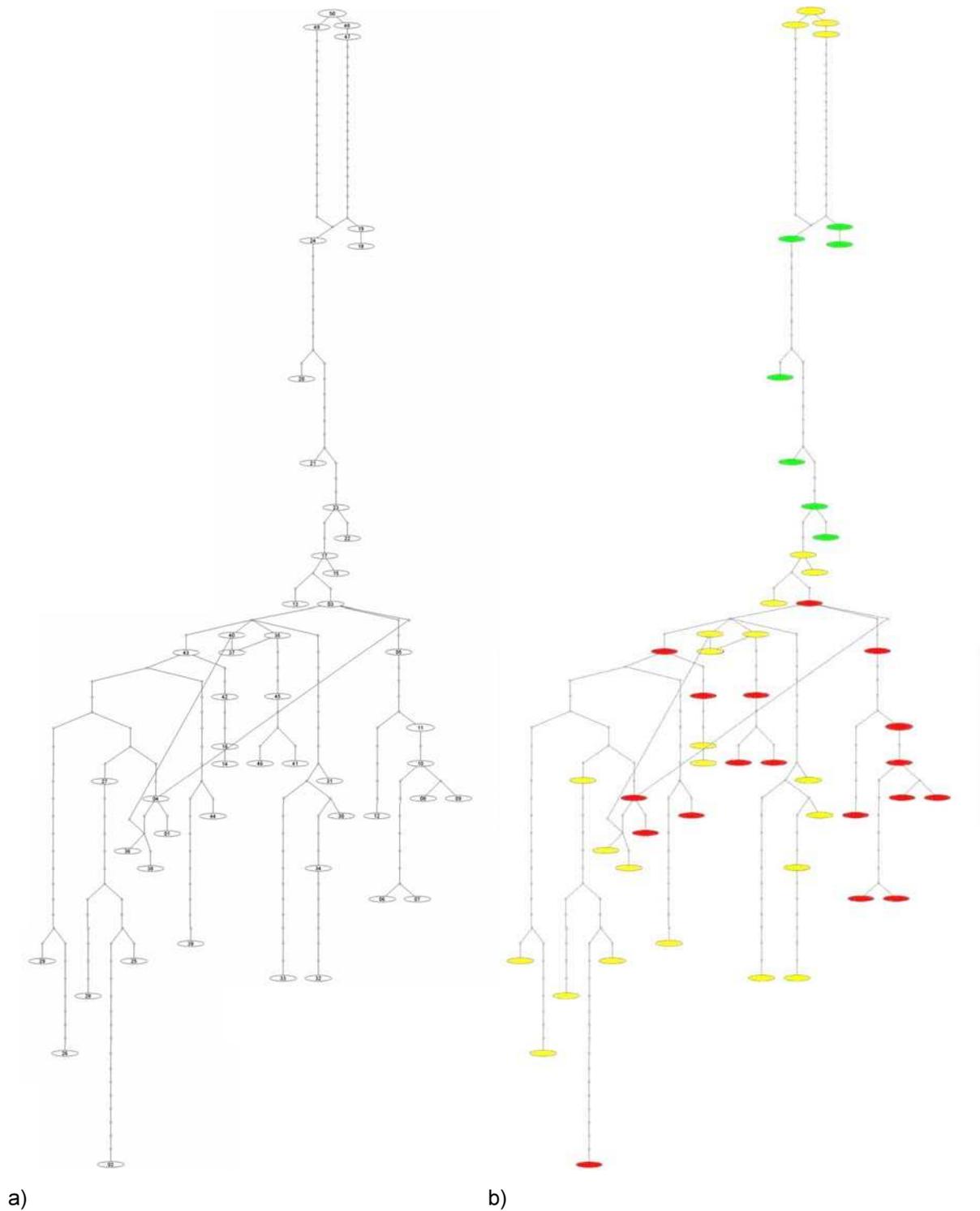


Figura 9: Network dos haplótipos do gene mitocondrial *cytb* observados nos *Triatoma brasiliensis* do município de Tauá, Estado do Ceará. As elipses representam os haplótipos e os pontos representam haplótipos perdidos ou não amostrados, necessários para a correta conexão dos haplótipos estudados. a) Network representando os números de cada haplótipo. b) Representação dos ambientes de obtenção dos exemplares. Verde: ambiente silvestre; Amarelo: ambiente peridomiciliar e; Vermelho: ambiente intradomiciliar.

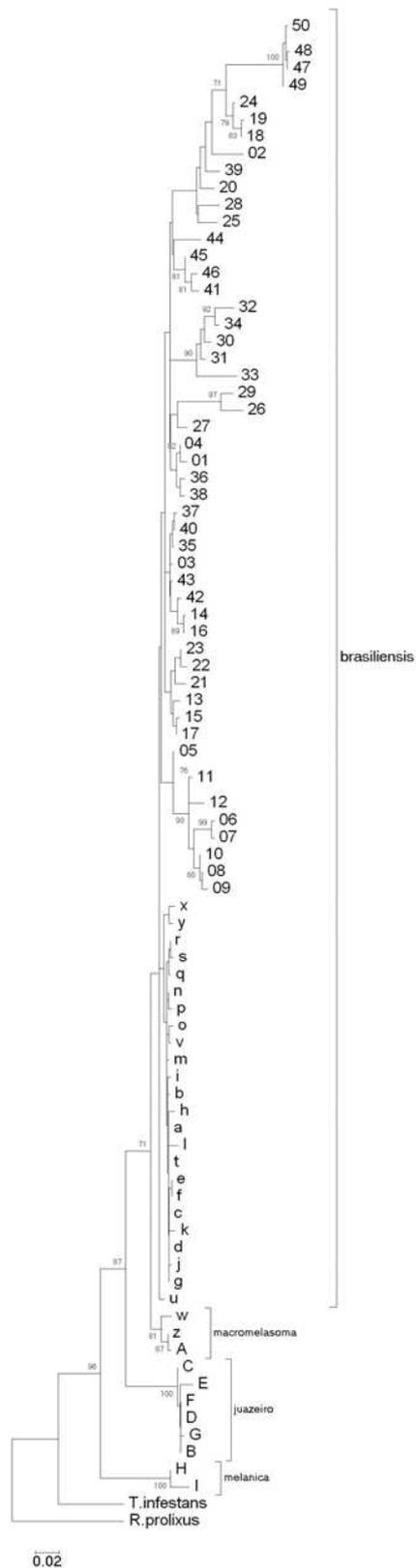


Figura 10: Dendrograma neighbor-joining dos haplótipos do gene mitocondrial *cytB* de *Triatoma brasiliensis* do município de Tauá comparados com haplótipos previamente descritos para os quatro fenótipos de *T. brasiliensis* (*brasiliensis*, *macromelasoma*, *juazeiro* e *melanica*). *Triatoma infestans* foi utilizado como grupo irmão e *Rhodnius prolixus* como grupo externo. Os números representam os 50 haplótipos descritos neste trabalho. As letras são os haplótipos previamente descritos (Monteiro *et al.*, 2004).

6 DISCUSSÃO

6.1 Resistência de triatomíneos a deltametrina

Os conhecimentos atuais sobre a resistência de *T. infestans* a piretróides, permitiram a descrição de uma área crítica de resistência, com elevados valores de RR, que abrange o norte da Argentina e o Sul da Bolívia (Vassena *et al.*, 2007; Zerba e Picollo, 2007). Nos estudos envolvendo populações de *T. infestans* do norte da Argentina foram observados valores de RR que variam de 99 (El Chorro) a 133,1 (Salvador Mazza) (Zerba e Picollo, 2007). Já na Bolívia, a localidade que foi submetida a ensaios biológicos para definição de razão de resistência, Yacuiba, apresentou RR de 154,4 (Vassena *et al.*, 2007; Orihuela *et al.*, 2008). Além destes valores de RR que definem estas populações como possuindo grande resistência a piretróides, diversas amostras desta espécie de triatomíneo, em outras localidades dentro desta área de resistência, apresentaram baixa mortalidade quando submetidos à dose discriminante. Com estes conhecimentos aumentou a preocupação acerca da ocorrência de *T. infestans* e/ou outros triatomíneos resistentes a piretróides em outros países, dentre eles o Brasil.

Devido à persistência de *T. infestans* em focos peridomiciliares do Rio Grande do Sul e a ocorrência natural de *T. brasiliensis* no Ceará (Dias *et al.*, 2000; Silveira e Vinhaes, 1999), com a rápida recolonização das unidades domiciliares por esta espécie neste Estado (Diotaiuti *et al.*, 2000), surgiu o interesse em avaliar estas espécies quanto à resistência a piretróides, através de ensaios biológicos. Os resultados se mostraram animadores, definindo as amostras testadas como suscetíveis ao piretróide deltametrina. Segundo a OPAS (2005), valores de RR iguais ou superiores a 5 indicam alterações na suscetibilidade da amostra testada ao inseticida utilizado. Dessa forma, como todas as amostras de *T. infestans* e *T. brasiliensis* do Brasil avaliadas neste trabalho apresentaram valores de RR inferiores a 2, estas podem ser classificadas como altamente suscetíveis a deltametrina, ao contrário da expectativa.

Yacuiba (Departamento de Tarija, Bolívia) tem sido alvo de muitos estudos pela importância dos valores de resistência relatados para esta região. Utilizando uma amostra por nós coletada, encontramos uma RR igual a 30,11 (tabela 2), valor cinco vezes menor que o relatado por Orihuela *et al.* (2008) e Toloza *et al.* (2008). Não acreditamos que haja discordância entre estes resultados, mas sim que a resistência de *T. infestans* a deltametrina nesta região não seja homogênea e,

contrário a isso, possa variar. Este achado pode ter grande importância epidemiológica para o controle de triatomíneos, e merece ser futuramente melhor investigado.

As amostras de *T. infestans* obtidas no Rio Grande do Sul também apresentaram valores de resistência menores do que já havia sido descrito para este Estado. Em 2000, Vassena *et al.* observaram RR igual a 7,0 para *T. infestans* do Rio Grande do Sul, o que classificou a amostra como possuindo resistência inicial a deltametrina. Os valores de RR observados por nós para todas as amostras de *T. infestans* deste Estado foram inferiores a 2 (tabela 2), o que demonstra que estes exemplares são suscetíveis a deltametrina. Uma explicação plausível para estes valores discrepantes seria a eliminação destes *T. infestans* resistentes no Rio Grande do Sul durante o período que separa os dois trabalhos. Esta eliminação pode ter ocorrido devido a possíveis mudanças no controle de triatomíneos no Rio Grande do Sul, com um cuidado maior no ambiente peridomiciliar, realizando a remoção de entulhos que servem de abrigo aos triatomíneos. Também pode-se imaginar na eliminação natural destes exemplares, devido a redução da capacidade de sobrevivência dos indivíduos resistentes. Baker *et al.* (2007) observaram mudanças em parâmetros de desenvolvimento (fecundidade, sucesso nas mudas, tempo de desenvolvimento de ovos, velocidade de deslocamento) em populações de besouros de batata do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) resistentes a imidaclopride (neonicotinoide) ao longo de 6 anos de estudos. Os autores sugeriram a ocorrência de mudanças dos genes que causam resistência ao longo do período de estudo.

Redução de *fitness* em artrópodos resistentes a inseticidas tem sido descrita. Davey *et al.* (2006) descreveram uma linhagem de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistente a organofosfatos que apresentava uma redução na produção de ovos quando comparada com uma linhagem suscetível. Li *et al.* (2007) determinaram a redução do *fitness* em uma linhagem homogênea de *Plutella xylostella* resistente a spinosad (classe de inseticidas derivados de *Saccharopolyspora spinosa*, um actinomiceto). Neste trabalho os autores descrevem redução de *fitness* da linhagem resistente em regimes de temperaturas naturais extremas. Recentemente, Gassman *et al.* (2009) publicaram uma revisão sobre a redução de *fitness* para insetos resistentes à toxina botulínica (*Bti*), e diversos outros estudos demonstram que o caráter resistência pode influenciar na capacidade de sobrevivência e reprodução dos artrópodos que a possuem.

Infelizmente não tivemos acesso aos dados sobre este controle de *T. infestans* no Rio Grande do Sul, e apenas podemos supor alguns fatos que poderiam contribuir com a eliminação dos exemplares resistentes. Outro fato muito importante para ser considerado é que este trabalho que define *T. infestans* com resistência inicial a deltametrina (Vassena *et al.*, 2000) não define a localidade ou região de obtenção destes exemplares. Com isso as nossas amostras podem ser completamente diferentes das utilizadas neste trabalho.

Embora os nossos achados sobre a suscetibilidade de *T. infestans* e *T. brasiliensis* sejam muito importantes do ponto de vista do controle do vetor, não se pode esquecer que eles são válidos apenas para as amostras estudadas e não podem ser extrapolados para outras localidades ou populações destas espécies. Neste raciocínio, e levando em consideração a proximidade do Rio Grande do Sul às populações resistentes de *T. infestans* da Argentina e Bolívia, o monitoramento destas populações é fundamental, como proposto por Rocha e Silva (1979), como uma medida estratégica de controle e que jamais foi implementada no Brasil. Atualmente existe uma perspectiva de implementação pela Coordenação Geral de Laboratório de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS) de um grupo para monitoramento da resistência/suscetibilidade de triatomíneos a inseticidas no Brasil (Marcos Obara, SVS-MS, comunicação pessoal), o que permitirá: a) ampliar este estudo para outras áreas de ocorrência de triatomíneos, bem como para outras espécies de importância na epidemiologia da doença de Chagas, e b) estabelecer um mapa, com as áreas de risco de resistência de triatomíneos brasileiros a inseticidas. Como foi observado por Pessoa *et al.* (2007), *T. sordida* em Minas Gerais já apresenta resistência inicial a deltametrina em cinco localidades do Estado. Neste trabalho os autores avaliaram 14 amostras desta espécie e observaram valores de RR em cinco das amostras variando de 5,4 a 6,8, o que segundo a OPAS (2005) significa ocorrência de resistência inicial. Este trabalho pode representar apenas uma parte da área de ocorrência desta resistência em *Triatoma sordida*, e outras localidades deveriam ser investigadas.

Para o programa de controle da doença de Chagas do Rio Grande do Sul, a persistência do *T. infestans* é possivelmente devido às condições ambientais, com a complexidade do ambiente peridoméstico onde é comum o encontro de grandes anexos construídos principalmente de madeira, o que faz da borrifação de inseticidas uma tarefa árdua e difícil. Tudo isso indica a necessidade de maior atenção à atividade de borrifação e da implementação de ferramentas

complementares, tais como a reorganização do peridomicílio, com a limpeza e higienização deste ambiente, e consequente eliminação dos possíveis refúgios aos triatomíneos.

No Ceará, a ocorrência natural de *T. brasiliensis* e a constante invasão do ambiente domiciliar já foi relatada por Diotaiuti *et al.* (2000) e os nossos dados só vem contribuir com o melhor entendimento dessa dinâmica. A ausência de resistência deste triatomíneo a piretróides não é um fator limitante para a ocorrência constante no ambiente domiciliar. Diotaiuti *et al.* (2000) descreveram que o peridomicílio é reinfestado três meses após aplicação de piretróides, apesar de que o intradomicílio se mantém seguro por longo período (mais de 6 meses). Outra característica que dificulta o controle de *T. brasiliensis* é que o peridomicílio das moradias nas zonas rurais deste Estado se confunde com o ambiente da caatinga: fica difícil determinar, em muitos casos, onde acaba o ambiente doméstico e onde começa o ambiente silvestre. Isso estreita ainda mais as proximidades das colônias desta espécie ao ambiente doméstico e facilita assim as sucessivas reinvasões das casas. Acreditamos que o controle de triatomíneos do Nordeste do Brasil deve ser uma associação entre a aplicação de inseticidas de ação residual com melhorias do ambiente peridomiciliar. As melhorias indicadas são: eliminação de entulhos, afastamento dos criadouros de animais domésticos, como galinhas e bodes, das paredes das unidades domiciliares, limpeza, eliminação de frestas nas paredes, o que propicia criadouros para triatomíneos, e manutenção da vigilância epidemiológica nas áreas onde ocorre a espécie (Diotaiuti, 2007).

6.2 Variabilidade genética de *Triatoma infestans*

Os estudos mais recentes sobre a variabilidade genética de populações de *T. infestans* ao longo de sua distribuição geográfica, definem que esta espécie apresenta de baixos a moderados índices de variabilidade intra-populacional e moderada a grande diferenciação inter-populacional (Garcia *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 1999; Pérez de Rosas *et al.*, 2007; Pérez de Rosas *et al.*, 2008; Schachter-Broide *et al.*, 2004). Os nossos resultados também indicam um perfil parecido, contudo os valores de variabilidade genética se mostraram diferentes, de acordo com o marcador utilizado. Os 10 loci de microssatélites se mostraram muito mais variáveis que as sequências do gene mitocondrial *cytB* (tabelas 5 e 9), principalmente quando comparados os valores de diversidade de nucleotídeos e diversidade genética média por loci (H_A): enquanto o valor observado para este

parâmetro na população total foi de apenas 0,009 para o gene *cytB*, os loci de microssatélites apresentaram um valor 69 vezes maior, 0,620. Apesar deste valor elevado, nas análises dos loci separadamente foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, ocasionados por excesso de homozigotos, indicando que as populações analisadas apresentam uma variabilidade genética intra-populacional baixa. Estes resultados reforçam o conceito de que os microssatélites são extremamente sensíveis para revelar variações intraespecíficas. Por outro lado, os valores para o gene *cytB* se mostraram mais adequados para revelar diferenças genéticas entre as populações. Comparando os resultados das AMOVAs e F_{ST} pareados, utilizando o gene *cytB* pode-se distinguir cinco populações geneticamente distintas, com valores de F_{ST} indicando de moderada a grande diferenciação inter-populacional, de acordo com as interpretações de Wright (1978) já definidas anteriormente, enquanto que nesta análise para os 10 loci de microssatélite os valores se mostraram muito menores, com F_{ST} indicando de baixa a moderada diferenciação inter-populacional.

Estas diferenças de valores, e conseqüentemente interpretações distintas, são importantes para mostrar a necessidade da utilização de mais de um marcador molecular em estudos desta natureza, de maneira a possibilitar uma avaliação mais ampla das amostras. Assim sendo o uso das sequências do gene *cytB* se mostrou mais adequado na avaliação da diferenciação genética interpopulacional, enquanto que os loci de microssatélites foram mais adequados para a avaliação da variabilidade genética intrapopulacional.

Analisando as populações de *T. infestans* separadamente, observamos que a amostra de Yacuiba (Bolívia) apresentou os maiores valores de variabilidade genética (tabela 5 e 9), corroborando com os conhecimentos anteriores sobre a maior variabilidade nos *T. infestans* da Bolívia (Dujardin *et al.*, 1998; Panzera *et al.*, 2004; Giordano *et al.*, 2005). Apesar disso não foi possível estabelecer uma relação direta entre variabilidade genética, dos marcadores empregados neste estudo, com a resistência a deltametrina, pois os valores de resistência observados nas amostras de Salvador Mazza e Yacuiba são muito elevados, comparados com os valores das amostras de *T. infestans* do Brasil, e a variabilidade de todas as amostras estudadas não é tão discrepante, com valores bem próximos uns dos outros. Acreditamos que apenas o estudo sobre a variabilidade genética dos genes envolvidos diretamente com o fenômeno da resistência (ex. canal de sódio, acetilcolinesterase,...) poderá

ser capaz de estabelecer tal relação, e poderá ser empregado como método de diagnóstico ao nível molecular da resistência a inseticidas neste grupo de insetos.

A caracterização do gene do canal de sódio foi um dos nossos objetivos iniciais nesse trabalho. Para isso utilizamos de iniciadores degenerados, criados com base em alinhamentos do gene canal de sódio já descritos para outros grupos de insetos, incluindo hemípteros pragas agrícolas (Martinez-Torres *et al.*, 1999; Morin *et al.*, 2002). No início deste trabalho ainda não existia qualquer descrição de sequências deste gene para os triatomíneos e não foi possível utilizar iniciadores mais específicos. Com o uso destes iniciadores degenerados tentamos, por meio de RT-PCR, identificar e caracterizar o gene do canal de sódio em *T. infestans*. Após sucessivas tentativas, utilizando as mais diversas ferramentas de biologia molecular, tais como sequenciamento direto dos produtos de PCR, sequenciamento dos produtos clonados, avaliação de diversas concentrações de RNAm, DNA, plasmídeo, não conseguimos êxito neste objetivo.

Com a caracterização do gene do canal de sódio poderíamos investigar a ocorrência de mutações pontuais que determinam a resistência a piretróides. Estas mutações já foram descritas para diversas ordens de insetos e estão amplamente revistas (Soderlund & Knipple, 2003; Hemingway *et al.*, 2004). Os piretróides, bem como DDT, agem nos canais de sódio, proteínas transmembrana, com peso aproximado de 260 kDa, presente no sistema nervoso dos animais. Estas proteínas possuem quatro domínios (I-IV), cada um consistindo de seis hélices transmembrana (S1-S6) (figura 11) (Jamroz *et al.*, 1998). Estes canais se encontram fechados quando a célula está em repouso. Quando a célula está excitada, o canal de sódio se abre permitindo a passagem deste elemento. Após aproximadamente um milissegundo ocorre uma mudança conformacional no canal de sódio que bloqueia a passagem de íons pela membrana. Quando o potencial da membrana retorna ao nível de repouso, o canal se fecha. Os piretróides agem nos canais de sódio modificando a cinética de entrada, promovendo assim um colapso do sistema nervoso do inseto (Hemingway *et al.*, 2004). Quando um inseto é intoxicado por piretróide ele apresenta inicialmente uma intensa agitação, seguida por uma paralisia geral. Em seguida os insetos retornam os movimentos após cerca de 10 min ou morrem. Estes efeitos são conhecidos como *knockdown* e letal, respectivamente (Hervé, 1982). O intenso uso de DDT e piretróides tem levado ao desenvolvimento de resistência conhecido como "*knockdown resistance*" (*kdr*) em muitos grupos de insetos. Como esta resistência limita a efetividade dos piretróides,

sua ocorrência no campo compromete severamente o uso continuado deste inseticida em controle de insetos (Soderlund & Knipple, 2003).

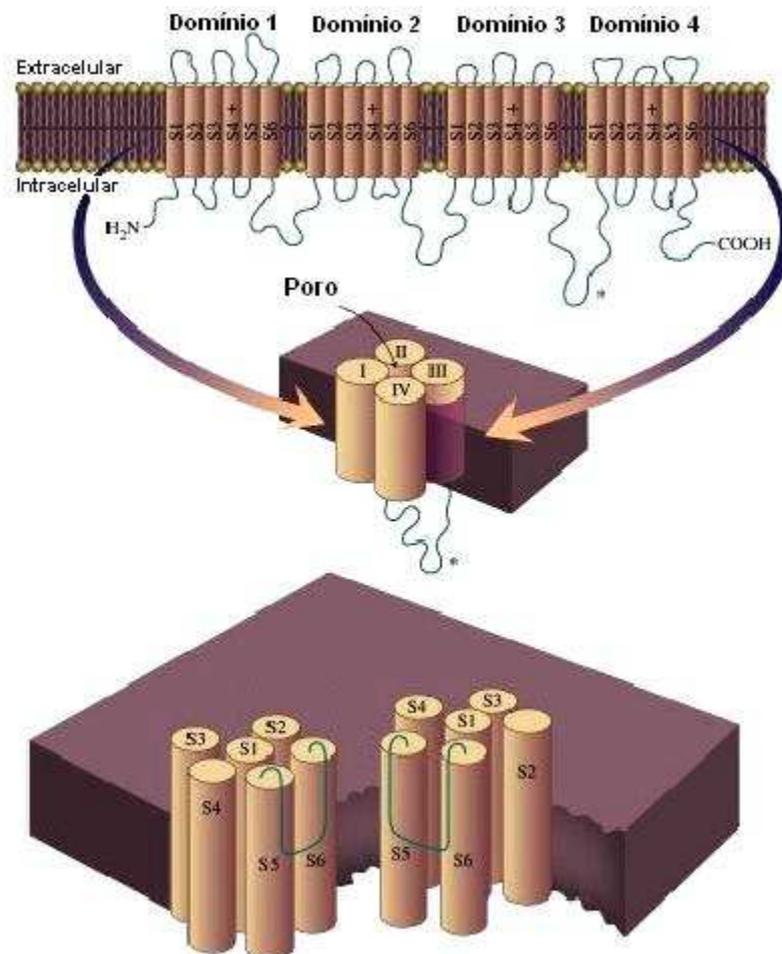


Figura 11: Esquema da proteína Canal de Sódio evidenciando os quatro domínios constituídos cada um por seis hélices transmembrana. Os domínios se dobram para formar um poro na membrana celular. Fonte: Soderlund e Knipple (2003).

A resistência *kdr* pode estar associada ou à super expressão das enzimas de detoxificação, esterases e monooxigenases, que estão envolvidas no metabolismo dos piretróides, ou à existência de mutações no gene do canal de sódio. A atividade aumentada de esterases ou monooxigenases, como fator na resistência a piretróides, foi observada em várias espécies de insetos, tais como *Anopheles gambiae*, *A. stephensi*, *A. subpictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Helicoverpa armigera*, *Pediculus capitis* entre outras (Hemingway *et al.*, 1991; Vulule *et al.*, 1994; Brogdon *et al.*, 1997; Kasai *et al.*, 1998; Vulule *et al.*, 1999, Picollo *et al.*, 2000 e Kranthi *et al.*, 2001). Quanto a resistência por sítio alvo, as mutações no gene do

canal de sódio mais frequentes resultam na substituição de leucina por fenilalanina no segmento 6 (S6) do domínio II, na posição 1014 da seqüência de aminoácidos. Esta mutação já foi observada em *A. gambiae*, *Blattella germanica*, *C. pipiens*, *Hematobia irritans*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Musca domestica*, *Myzus persica* e *Plutella xylostella* (Ingles *et al.*, 1996; Dong, 1997; Guerrero *et al.*, 1997; Martinez-Torres *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Martinez-Torres *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000). Duas outras substituições nesta mesma posição também conferem resistência ao DDT e aos piretróides: uma substituição de leucina por histidina em *Heliothis virescens* (Park & Taylor, 1997) e outra substituição de leucina por serina em *C. pipiens* (Martinez-Torres *et al.*, 1999).

No segmento 5 (S5) do domínio II também ocorrem mutações que promovem resistência *kdr*. Em *M. domestica*, uma segunda mutação que resulta na substituição de metionina por treonina na posição 918, associada com a mutação na posição 1014, desenvolve uma resistência conhecida como *super-kdr*, que confere uma resistência bem maior que a *kdr* (Ingles *et al.*, 1996; Miyazaki *et al.*, 1996). Uma segunda substituição nesta mesma posição, metionina por valina, também foi observada conferindo resistência *kdr* em *Bemisia tabaci* (Morim *et al.*, 2002). Outras mutações que conferem resistência *kdr* foram observadas em insetos, mas geralmente restritas ao domínio II do canal de sódio (revisado por Soderlund e Knipple, 2003).

Recentemente, fragmentos do gene canal de sódio foram identificados em bibliotecas de cDNA de *R. prolixus* pelo grupo que está caracterizando o genoma expresso desta espécie de triatomíneo (Glória Braz, UFRJ, comunicação pessoal), e a utilização destas sequencias para o desenvolvimento de iniciadores mais específicos para serem utilizados na caracterização deste gene em *T. infestans*, poderá ser o ponto chave no sucesso deste trabalho.

Com a quase total eliminação do *T. infestans* do Brasil, é objeto do PCDCCh a vigilância para que esta espécie não seja reintroduzida, a partir dos focos que persistem nos países vizinhos, ou que as populações demanescentes não voltem a aumentar. Na perspectiva de determinação da origem de algum foco da espécie que eventualmente seja encontrado no Brasil, a marcação genética de diferentes populações de *T. infestans* poderá representar importante ferramenta da vigilância epidemiológica. Por isso este trabalho também se ocupou em caracterizar as últimas populações de *T. infestans* do Brasil, e também de populações da Bolívia e da Argentina. Foram definidas as frequências e ocorrência de haplótipos do gene *cytB* e

alelos dos 10 loci de microssatélites nas amostras, o que indicou a existência de marcadores em comum entre os três países e, o que torna essa análise mais interessante, a existência de marcadores exclusivos para cada um deles (tabelas 7 e 11). Na análise do gene *cytB* foram observados diversos haplótipos deste gene exclusivos das populações resistentes (Salvador Mazza e/ou Yacuiba), porém as análises dos loci de microssatélite se mostraram mais promissoras uma vez que este tipo de marcador apresenta variação no tamanho do produto amplificado por PCR, sendo facilmente reproduzido para fins de diagnóstico. Em nossas análises foram identificados 34 alelos de microssatélites exclusivos para as amostras resistentes de *T. infestans* (tabela 11), oriundas de Salvador Mazza e Yacuiba. Entretanto, a utilização destes como ferramenta de diagnóstico de insetos resistentes a piretróides ainda não é possível, pois existe a necessidade da ampliação deste tipo de estudo para outras populações resistentes e suscetíveis desta espécie. Com a ampliação deste tipo de estudo, acreditamos que muitos destes alelos que nos nossos resultados são exclusivos de um ou outro país, será encontrado em ambos os países, e que também, com a redução deste número de alelos ocorrerá conseqüentemente que os alelos exclusivos de cada país apresentará maior confiabilidade quanto à especificidade.

Este é o primeiro estudo que tenta identificar e caracterizar ao nível molecular amostras de *T. infestans* suscetíveis e resistentes a piretróides. Os nossos resultados se apresentaram muito animadores e serão ampliados para a real definição de um método de diagnóstico molecular capaz de identificar resistência em *T. infestans* a partir de um único exemplar. Uma outra e grande utilização desta ferramenta será a identificação e definição de possíveis futuras novas invasões/entradas de *T. infestans* no Brasil a partir de populações dos países vizinhos, ou presença de focos residuais desta espécie em nosso país. Esta diferenciação tem grandes implicações na forma de controle, pois se é caracterizada a entrada de *T. infestans* de países vizinhos deverão ser investigadas as formas de invasão (ex. migrações humanas), e se for definido que os exemplares são de focos residuais, deverão ser avaliadas as ferramentas atuais de controle (tipos de inseticidas, formas de aplicação, cobertura das áreas,...). Tudo isso poderá auxiliar grandemente as autoridades responsáveis pelo controle da doença de Chagas a definir as melhores formas de eliminação destas populações.

6.3 Variabilidade genética de *Triatoma brasiliensis*

Quase todos os trabalhos abordando variabilidade genética de *T. brasiliensis* estudaram a diferenciação genética existente entre as quatro formas cromáticas da espécie (*brasiliensis*, *macromelasoma*, *juazeiro* e *melanica*), e pouco se conhece sobre a variabilidade genética associada à suscetibilidade a inseticidas nesta espécie.

Os resultados da AMOVA, interpretados segundo Wright (1978), demonstram que as amostras de *T. brasiliensis*, aqui estudadas, compõem uma única população genética (tabela 14) e este resultado vem corroborar com aqueles sobre a suscetibilidade a deltametrina destas mesmas amostras (tabela 3) também aqui demonstradas. Uma vez que esta espécie apresenta diversos focos silvestres, que são fontes de novas invasões do ambiente doméstico, tal resultado já era esperado, pois esta dinâmica de reinvasões contribui grandemente para a distribuição dos caracteres destes indivíduos, reduzindo, assim, as diferenças genéticas entre as localidades.

Apesar da pouca diferenciação genética entre as amostras de *T. brasiliensis* estudadas, observamos a ocorrência de grande variabilidade genética em todas as amostras (tabela 15), estando esta variação dentro da faixa de neutralidade (tabela 16). Neste ponto, se compararmos a variabilidade genética observada nas amostras de *T. infestans* deste trabalho, com esta observada para *T. brasiliensis*, através da análise da diversidade de nucleotídeos ($\frac{F_{ST}}{D_A}$) podemos verificar uma diferença enorme, com as amostras de *T. brasiliensis* apresentando um valor, para este parâmetro, 6,77 vezes maior que o observado para todas as amostras de *T. infestans* (tabelas 5 e 15). Importante ressaltar que a amplitude geográfica das amostras de *T. brasiliensis*, comparadas com as amostras de *T. infestans*, é mínima, pois as localidades de obtenção dos exemplares estudados são vizinhas, e pertencem todas elas pertencem a um mesmo município. Esta comparação é importante para auxiliar o entendimento das variações genéticas entre populações de uma espécie de triatomíneo nativa, como o *T. brasiliensis*, que apresenta seu centro de endemismo no Nordeste brasileiro (Forattini, 1980). Estas características ecológicas e genéticas contribuem grandemente para as dificuldades no controle desta espécie de triatomíneo, até mesmo quando as populações não apresentam resistência aos inseticidas rotineiramente utilizados.

Com a observação de vários haplótipos perdidos ao longo do *network* (figura 6) acreditamos que a variabilidade genética nas amostras do campo seja muito

maior que a observada aqui, uma vez que toda amostra colonizada sofre redução da variabilidade genética.

A maior parte dos estudos de variabilidade genética envolvendo *T. brasiliensis* teve o objetivo apenas de identificar a diferenciação entre as formas cromáticas. Entre os poucos estudos que demonstraram variabilidade genética em *T. brasiliensis*, Monteiro *et al.* (2004) observaram que a forma cromática *brasiliensis* apresentava a maior variabilidade, e a forma *melanica* a menor. Entretanto, estes resultados apresentam a limitação do uso de reduzidos números amostrais de insetos para várias localidades, que variaram de dois a 24, com a maioria das localidades estudadas não apresentando mais que cinco insetos. Com a determinação das áreas de ocorrência das quatro formas cromáticas de *T. brasiliensis* (Costa *et al.*, 2002), podemos levantar a hipótese de que esta espécie apresenta o seu centro de origem e dispersão no Estado de Pernambuco e proximidades, uma vez que foram observadas, neste estado, três das formas cromáticas de *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004). Isto também poderia explicar a menor variabilidade genética observada na forma *melanica*, encontrada no norte de Minas Gerais, que é a forma cromática mais distante deste possível centro de dispersão. A redução da variabilidade genética em populações distantes do centro de dispersão é bem definida para o *T. infestans*, que apresenta seu centro de dispersão na Bolívia (Schofield, 1988 *apud* Giordano *et al.*, 2005; Bermudez *et al.*, 1993; Dujardin *et al.*, 1998). Diversos estudos, envolvendo vários marcadores, determinaram redução da variabilidade genética das populações não-andinas da espécie (Dujardin *et al.*, 1998; Schofield *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2003; Bargues *et al.*, 2006), com conseqüente perda de DNA e material heterocromático (Panzer *et al.*, 2004). Apesar da menor área de distribuição do *T. brasiliensis*, quando comparado com o *T. infestans*, a maior distância do centro de endemismo também poderia ser o responsável por esta redução de variabilidade genética da forma *melanica* desta espécie, a qual não é encontrada colonizando casas. A menor capacidade de domiciliação, observada em populações desta espécie, já foi relacionada com a distância do centro de endemismo por Borges *et al.* (1999) e corrobora com a hipótese de que *T. brasiliensis* apresenta seu centro de endemismo no estado de Pernambuco. Para chegar a uma conclusão sobre o centro de endemismo do *T. brasiliensis* seria necessária a realização de um estudo utilizando amostras de todos os Estados do Nordeste do Brasil, e norte de Minas Gerais, através de análises dos marcadores rotineiramente usados para este fim. Estudos

abordando também os genes responsáveis por estas variações cromáticas (ex. genes de melanina) nesta espécie precisam ser realizados, para determinar a real existência de espécies crípticas que comporiam o então complexo *T. brasiliensis*. A avaliação da resistência a inseticidas em outras populações desta espécie também é imprescindível, o que poderá permitir uma melhor programação das ações de controle deste triatomíneo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Através dos ensaios biológicos com o piretróide deltametrina as amostras remanescentes de *T. infestans* do Rio Grande do Sul e as amostras de *T. brasiliensis* do Ceará foram caracterizadas como suscetíveis a este inseticida;

A comparação dos valores de RR das amostras de *T. infestans* do Rio Grande do Sul e Yacuiba (Departamento de Tarija) com os dados previamente descritos na literatura, indica que o fenômeno da resistência pode variar grandemente, se mostrando complexo;

O estudo da diferenciação genética de *T. infestans* demonstrou que as amostras estudadas do Rio Grande do Sul compõem uma única população genética;

A análise das sequências do gene mitocondrial *cytB* e dos loci de microssatélites demonstrou que as populações de *T. infestans* apresentam baixa variabilidade genética intrapopulacional e de moderada a grande diferenciação genética interpopulacional;

O uso de dois marcadores moleculares distintos, um “alvo” nuclear e um “alvo” mitocondrial, nas análises de populações de *T. infestans* permitiu avaliar a eficácia de cada um. Dessa forma, o gene mitocondrial *citB* se mostrou adequado para avaliar a diferenciação genética interpopulacional, e os loci de microssatélites de mostraram ideais para avaliar variabilidade genética intrapopulacional;

Os testes de neutralidade empregados nas análises de *T. infestans* indicaram que as populações do Rio Grande do Sul e Salvador Mazza sofreram expansão populacional recente;

Nas análises dos haplótipos do gene *cytB* foi observado um único haplótipo compartilhado entre populações de *T. infestans* do Brasil, Argentina e Bolívia. Devido a sua elevada frequência e distribuição, ele é o mais antigo dentre todos os haplótipos observados;

As amostras de *T. infestans* de Yacuiba e Chuquisaca, ambas pertencentes à Bolívia, não mostraram nenhum haplótipo do gene *cytB* em comum, e nenhum dos haplótipos desse gene definidos para Chuquisaca foi encontrado no Brasil ou Argentina;

Na análise dos loci de microssatélites foi observado elevado número de loci polimórficos em todas as populações de *T. infestans*;

Todas as populações de *T. infestans* apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em pelo menos um dos 10 loci de microssatélites analisados, os quais foram promovidos por excesso de homozigotos;

Nas análises dos loci de microssatélite em *T. infestans* foram identificados alelos exclusivos do Brasil (amostras suscetíveis a deltametrina) e alelos exclusivos de Salvador Mazza e/ou Yacuiba (amostras resistentes a deltametrina). A ampliação deste tipo de estudo permitirá definir um método de diagnóstico molecular para avaliar resistência a piretróides por meio de PCR, além de determinar a origem dos possíveis novos focos desta espécie no Brasil;

O estudo da diferenciação genética das amostras de *T. brasiliensis* do Ceará demonstrou que estas amostras compõem uma única população genética;

Os valores de variabilidade genética de *T. brasiliensis* se mostraram altos, e, quando comparados com os obtidos para as populações de *T. infestans*, foi possível observar que populações nativas de triatomíneos apresentam variabilidade genética muito maior que a observada para uma espécie domiciliada. Com esta observação seria importante realizar estudos que comparem a variabilidade genética entre exemplares de *T. brasiliensis* silvestres e domésticos;

As características ecológicas, genéticas e comportamentais do *T. brasiliensis* contribuem grandemente para as dificuldades no seu controle, mesmo quando as populações não apresentam resistência aos inseticidas utilizados.

8 ANEXO

Susceptibility of *Triatoma infestans* to deltamethrin in Rio Grande do Sul, Brazil
(Artigo aceito para publicação nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)

Running title: *T. infestans* susceptible to deltamethrin

Title: Susceptibility of *Triatoma infestans* to deltamethrin in Rio Grande do Sul, Brazil

Author's Names: Ivan Vieira Sonoda¹, Grasielle Caldas D'Ávila Pessoa¹, Mirko Rojas Cortez², João Carlos Pinto Dias¹, Alvaro José Romanha¹, Liléia Diotaiuti¹

Institutional affiliations: ¹. Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ. Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, Belo Horizonte – MG, Brazil. ZIP: 30190-002. ². Programa Nacional de Chagas – Ministerio de Salud y Deportes - Bolivia.

Summary: The strategies to control Chagas disease are based on the spraying infested houses with pyrethroid insecticides. However the intense use of these insecticides has promoted resistance of *Triatoma infestans* in Argentine, Bolivia and in the South Brazil the species were reported with low levels of resistance. Due to the persistence of *T. infestans* in the state of Rio Grande do Sul (RS), we evaluated the occurrence of deltamethrin resistance on four different municipalities, in comparison with two Brazilian susceptible strains and one resistant from Bolivia. The results indicated the absence of resistance on *T. infestans* from RS.

Key Words: *Triatoma infestans*, Pyrethroid Resistance, Chagas Disease.

Sponsorships: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Bayer CropScience.

Strategies to control Chagas disease are based principally on the interruption of the vectorial transmission. In Brazil, the control program reached their operational peak in the 1980s (Vinhaes & Dias 2000). From 1986 onwards the activities suffered a reduction due to the rise in epidemics of dengue, although it continued to spray infested residences throughout the country. In 1991, taking part in the Southern Cone Initiative, an effort of the Ministries of Health of Argentine, Brazil, Bolivia, Chile, Paraguay and Uruguay, the Chagas Disease Control Program (PCDCH) began to prioritize areas where *Triatoma infestans* occurred, implanting epidemiological vigilance in those where vectorial transmission was already being controlled (Dias et al. 2002).

The efficacy of residual insecticides to combat triatomines was demonstrated for the first time in the late 1940s (Dias & Pellegrino 1948), based on applications of hexachlorobenzene (HCB). Once this compound became readily available it was possible to elaborate large-scale control programs. These were highly successful, interruption of vectorial transmission of Chagas disease being obtained over wide geographical areas. Agricultural use of HCB was however prohibited in the mid-1980s due to its high environmental toxicity, precluding further commercial production. Fortunately, by this time, the efficacy of several pyrethroids against triatomines had been proved and these insecticides began to be used routinely by the PCDC (Diotaiuti et al. 1994; Dias 2002).

Few studies have been carried out on insecticide resistance in triatomines. The first report came from Venezuela in the 1970s, in areas where *Rhodnius prolixus* was regularly treated with HCB (Rocha & Silva 1979). The first evidence of resistance to synthetic pyrethroids was obtained by the *Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas* (CIPEIN) in Buenos Aires in the 1990s (Vassena et al. 2000). In this pioneer study *R. prolixus* from Venezuela and *T. infestans* from the Brazilian state of Rio Grande do Sul (RS) were studied and the authors found resistance ratio (RR) values characteristic of populations already possessing initial resistance. *R. prolixus* presented the highest values (RR = 12.4 for cypermethrin and 11.4 for deltamethrin) and *T. infestans* the lowest (RR = 7.0 for deltamethrin), although the precise origin of the latter specimens was not specified.

In this study we investigated deltamethrin resistance in specimens of *T. infestans* from different municipalities of the northeastern RS (Figure 1): Doutor Maurício Cardoso (27°30'21"S; 54°21'39"W), Guarani das Missões (28°08'27"S; 54°33'29"W), Mato Queimado (28°15'21"S; 54°36'57"W) and Três de Maio (27°46'24"S; 54°14'24"W). These municipalities lie within an area including many residual foci remaining after successive sprayings with pyrethroids (Dias 2002). The difficulty of eliminating *T. infestans* from this state was not defined, if due to the operational difficulties of achieving insecticide coverage in the areas being treated (comprising ranches with very large, complex constructions) or to the fact that triatomines are truly resistant to insecticides. The following numbers of *T. infestans* specimens were obtained from each municipality: Doutor Maurício Cardoso (five adults and seven NV), Guarani das Missões (12 adults and eight NV); Mato Queimado (11 adults and 17 NV) and Três de Maio (nine adults and five NV). All

these samples were reared in the laboratory and the bioassays realized with the second generation from these colonies.

We selected two populations of *T. infestans* from the Brazilian states of Minas Gerais (Montes Claros) and Goiás, maintained in the laboratory for more than 10 generations, as susceptibility reference strains. Insects from the municipality of Yacuiba, Bolivia, were used as a resistant reference strain, pyrethroid resistance already having been described for this region (Tolosa et al. 2008)

Bioassays consisted of the application of 0.5 μL deltamethrin solution to the dorsal regions of fasted first-instar nymphs aged five days old using a Hamilton microsyringe provided with a 50-repetition dispenser. WHO protocol (WHO, 1994) suggests the use of 0.2 μL of the solutions, but the present protocol was adapted to apply a biggest volume to avoid alterations of concentrations promoted by evaporation. Deltamethrin (99.7% purity; Bayer) was diluted into serial concentrations (from 0.02 ng/ μL to 4.0 ng/ μL , when used for RS and susceptible samples, and from 2.0 ng/ μL to 640.0 ng/ μL when used for resistant sample) which were used to produce mortality curves for each sample. A control group was set up for each sample, treated with acetone only. Thirty nymphs were used for bioassays of each insecticide concentration.

After application of the insecticide, treated nymphs were maintained under controlled conditions of temperature ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) and relative humidity (75% \pm 5%). Mortality of the nymphs was evaluated 72 h after application of the insecticide. Nymphs were characterized according to locomotory capacity as *normal* (without alterations), *intoxicated* (with slight alterations) or *knocked down* (with marked alterations or immobile).

Mortality data from the bioassays were subjected to probit analysis to calculate the 50% and 99% lethal doses (LD_{50} and LD_{99}) and slope of the straight line in the graph (which indicates homogeneity of the population) for triatomine samples from each locality or strain evaluated. All normal nymphs were grouped as alive, while intoxicated and knocked-down specimens were classed as dead. The *Probit Analysis* program (Raymond 1985) was used at this stage of the study. The LD_{50} and LD_{99} values were subsequently arranged in tables and the RR for both lethal doses calculated from the ratios of these parameters in samples of field/laboratory strains ($\text{RR} = \text{LD}_{\text{field}}/\text{LD}_{\text{laboratory}}$).

Laboratory strains from Minas Gerais and Goiás were selected as being susceptible to deltamethrin since they had already passed through more than 10

generations free of contact with any insecticide, the criterion defined by WHO (1994). The LD₅₀ of the Minas Gerais strain was lower at 0.36 ng/nymph and it was thus selected to calculate the RR values of the other samples. The LD₉₉ of this strain was 2.68 ng/nymph and the slope 2.09 (Table 1). The Goiás strain presented an LD₅₀ value of 0.42 ng/nymph, LD₉₉ of 3.33 ng/nymph and slope of 2.68. The RRs of this strain for LD₅₀ and LD₉₉ were 1.17 and 1.24 respectively. No locomotory alterations were noted in the control groups.

The LD₅₀ of the RS samples varied from 0.26-0.67 ng/nymph, the LD₉₉ from 3.42-4.90 ng/nymph and the slopes from 1.35-1.99 (Table 1). Based on the LD values it was possible to calculate the RR for these samples; those for the LD₅₀ varied from 0.72-1.86 and for the LD₉₉ from 1.28-1.83 (Table 2).

According to WHO (1994) RR values < 5 indicate susceptibility. Thus the RS samples of *T. infestans* studied here can be classified as highly susceptible to deltamethrin, contrary to expectations. Although these findings are very important from the point of view of vector control, it should not be forgotten that they are only valid for the samples studied and cannot be extrapolated to other localities or populations of this species.

As shown in Table 2, the RR values for Yacuiba confirm that this Bolivian sample is resistant to deltamethrin, like described elsewhere (Orihuela et al. 2008; Toloza et al. 2008). This resistance has a large variation in Bolivia, where values for the RR of the LD₅₀ in *T. infestans* vary from 17.38 (Mataral) to 154.4 (Yacuiba). The difference among the present results and the previously published should be due to methodological differences (use of 0.5 μ l of insecticide solution, and not 0.2 μ l). Nevertheless, as RR is a ratio between two values, the proportions were maintained. Thus the values encountered in the present study for Yacuiba are in accordance with the idea that the phenomenon of insecticide resistance does not extend homogeneously over wide areas and may assume localized characteristics.

The RS populations studied here probably originated from different localities to those investigated by Vassena et al. (2000), which would explain the discrepancies between the results of the two studies. On the other hand, the "resistance" character of these populations could also have been eliminated over the years that separate the two sampling periods. In this way, and taking into account the proximity of RS to the resistant populations in Argentina and Bolivia, monitoring of these residual populations is fundamental, as proposed by Rocha & Silva (1979) as a strategic control measure without ever having been implemented. For RS control program, the

T. infestans persistence possible is due to environment conditions, like observed in La Rioja, Argentine (Porcasi et al. 2007), indicating the implementation of complementary tools, like the reorganization of the peridomicile and elimination of its refuges.

Acknowledgements

The authors thank Celia Lammerhirt, Secretary of Health – RS, for providing *T. infestans* captured in that state and Bayer CropScience for providing the deltamethrin insecticide used in the bioassays.

References

- Dias E, Pellegrino J 1948. Alguns ensaios com o gammexane no combate aos transmissores da doença de Chagas. *Brasil Med* 62: 185-191.
- Dias JC 2002. O control da doença de Chagas no Brasil. In Silveira AC, *O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América: uma iniciativa internacional. 1991/2001*. Organização Pan-Americana da Saúde / Faculdade de Medicina do Triangulo Mineiro, Uberaba, p. 145-237.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- Diotaiuti L, Ribeiro de Paula O, Falcão PL, Dias JC 1994. Evaluation of the Chagas disease vector control program in Minas Gerais, Brazil, with special reference to *Triatoma sordida*. *Bull Pan Am Health Organ* 28: 211-219.
- Orihuela PLS, Vassena CV, Zerba EN, Picollo MI 2008. Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol* 45: 298-306.
- Porcasi X, Hrellac H, Catalá S, Moreno M, Abrahan L, Hernandez L, Gorla DE 2007. Infestation of rural houses by *Triatoma infestans* in the regions of Los Llanos (La Rioja, Argentina). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 63-68.
- Raymond M 1985. Présentation d'un programme d'analyse Log-Probit pour micro-ordinateur. *Ser Ent Met et Parasitol* 22: 117-121.
- Rocha e Silva EO 1979. Profilaxia. In Brener Z, Andrade Z, *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 425-449.
- Tolozá AC, Germano M, Mougabure Cueto G, Vassena CV, Zerba E, Picollo MI 2008. Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first Instars of

Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *J Med Entomol* 45: 421-426.

Vassena CV, Picollo MI, Zerba EN 2000. Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *Med Vet Entomol* 14: 51-55.

Vinhaes MC, Dias JCP 2000. Chagas disease in Brazil. *Cad Saude Publica* 16 (Suppl 2): 7-12.

WHO 1994. Protocolo de evaluación de efecto insecticida sobre triatomíneos. *Acta Toxicol Argentina* 2: 29-32.

Tables

Table I: LD₅₀, LD₉₉ and slope of *Triatoma infestans* samples and strains.

<i>Triatoma infestans</i>	LD50	CL 95%		LD99	CL 95%		Slope	CL 95%
Montes Claros	0.36	0.241	0.410	2.68	2.050	3.699	2.09	± 0.33
Goiás	0.42	0.321	0.515	3.33	2.872	4.263	2.68	± 0.47
Mato Queimado	0.53	0.354	0.710	3.42	2.766	5.778	1.80	± 0.38
Guarani das Missões	0.35	0.240	0.548	4.00	3.511	4.982	1.35	± 0.22
Três de Maio	0.67	0.520	0.925	4.90	4.201	6.025	1.99	± 0.31
Doutor Maurício Cardoso	0.26	0.199	0.356	4.21	3.877	4.866	1.93	± 0.28
Yacuiba	10.84	7.706	14.635	366.62	182.645	1.128.377	1.52	± 0.19

Lethal doses (LD) correspond to amounts of deltamethrin/treated nymph (ng/tn).

Table II: Resistance ratios (RR) of the LD₅₀ and LD₉₉ of *Triatoma infestans* samples and strains

<i>Triatoma infestans</i>	RR (LD50)	RR (LD99)
Goiás	1.17	1.24
Mato Queimado	1.47	1.28
Guarani das Missões	0.97	1.49
Três de Maio	1.86	1.83
Doutor Maurício Cardoso	0.72	1.57
Yacuiba	30.11	136.80

Figure legend

Figure 1: Map of the Brazilian state of Rio Grande do Sul showing localities from which *Triatoma infestans* specimens were obtained: 1 - Doutor Maurício Cardoso (27°30'21"S; 54°21'39"W), 2 - Três de Maio (27°46'24"S; 54°14'24"W), 3 - Guarani das Missões (28°08'27"S; 54°33'29"W) and 4 - Mato Queimado (28°15'21"S; 54°36'57"W). Source: IBGE (www.ibge.gov.br/mapas_ibge/pol.php).

9 REFERÊNCIAS

- Baker MB, Alyokhin A, Porter AH, Ferro DN, Dastur SR e Galal N (2007) Persistence and inheritance of costs of resistance to imidacloprid in Colorado potato beetle. *J Econ Entomol* 100 (6): 1871-1879;
- Balbino VQ, Coutinho-Abreu IV, Sonoda IV, Melo MA, Andrade PP, de Castro JAF, Rebêlo JM, Carvalho SMS e Ramalho-Ortigão M (2006) Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. *Acta Tropica* 98: 15-24;
- Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez-Candelas F, Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Dujardin JP e Mas-Coma S (2006) Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect Genet Evol* 6(1): 46-62;
- Bermúdez H, Valderrama F e Torrico F (1993) Identification and characterization of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Central Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 49: 371;
- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ e Diotaiuti L (2000) Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *J Med Entomol* 37(6): 872-877;
- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ e Diotaiuti L (2005) Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceará State, Northeastern Brazil. *Acta Tropica* 93 (2005) 119–126;
- Borges EC, Pires HH, Barbosa SE, Nunes CM, Pereira MH, Romanha AJ e Diotaiuti L (1999) Genetic variability in brazilian triatomines and the risk of domiciliation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Supl 1): 371-373;
- Borges EC, Romanha AJ e Diotaiuti L (2000) Uso do *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) no estudo populacional do *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911. *Cad Saúde Pública* 16 (Sup. 2): 97-100;

Brogdon WG e McAllister JC (1998) Insecticide resistance and vector control. *Emerg Infect Dis* 4 (4): 605-613;

Brogdon WG, McAllister JC e Vulule J (1997) Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing the elevated oxidase mechanism for insecticide resistance. *J Am Mosq Control Assoc* 13: 233-237;

Burleigh BA e Andrew NW (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Ann Rev Microbiol* 49: 175-200;

Catalá S e Dujardin JP (2001) Antennal sensilla patterns indicate geographic and ecotopic variability among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *J Med Entomol* 38 (3): 423-428;

Catalá S, Gorla D, Juárez P, Picollo MI, Panzera F, Noireau F, Rojas Cortes M, Dujardin JP, Zerba E, Vassena C, Pérez R, Calderón G, Abraham L, Hernandez ML, Cardozo R, López E, Porcasi X, Moreno M, Schater Broide J, Gurtler R, Lucero C, Ferrandis I, Calleros L, Ferreiro MJ, Cardozo L, Girotti J, Mijailovski S, Richer W, Kengne P, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D, Herrera B, Gentile A, Gemio A, Alderete P, Diosque P, Acosta N, Alcaraz P, Llanos A e Uncos A (2007) Causas biológicas y ambientales de la estructuración espacial em *Triatoma infestans* y sus implicâncias em el control vectorial. In: Rojas de Arias A e Maldonado M. Taller del Cono Sur, actualización de la tripanosomiasis americana. Paraguay, 233 pp;

Chagas C (1909) Nova tripanozomiasis humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n.s.p., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218;

Clement M, Posada D e Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* 9: 1657-1660;

Cortez MR, Pinho AP, Cuervo P, Alfaro F, Solano M, Xavier SC, D'Andrea PS, Fernandes O, Torrico F, Noireau F e Jansen AM (2006) *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild

environment of the andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Exp Parasitol* 114 (4): 305-313;

Costa J (1999) The synanthropic process of Chagas disease vectors in Brazil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population, genetical, ecological, and epidemiological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 239-241;

Costa J (2000) Distribuição e caracterização de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Cad Saúde Pública* 16 (Suppl 2): 93-95;

Costa J e Felix M (2007) *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (1): 87-90;

Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC e Beard CB (2003) The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(4): 443-449;

Costa J, Freitas-Sibajev MG, Marchon-Silva V, Pires MQ e Pacheco RS (1997) Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (4): 459-464;

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

Davey RB, George JE e Miller RJ (2006) Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 139 (1-3): 211-220;

Dias E e Pellegrino J (1948) Alguns ensaios com o gammexane no combate aos transmissores da doença de Chagas. *Brasil Med* 62: 185-191;

Dias JC (2002) O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Silveira AC. O controle da doença de Chagas nos países do cone sul da América: uma iniciativa internacional. 1991/2001. Organização Pan-Americana da Saúde / Faculdade de Medicina do Triangulo Mineiro. 316 pp;

Dias JC (2007) Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl 1):11-18;

Dias JC, Machado EM, Fernandes AL e Vinhaes MC (2000) Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no nordeste do Brasil. *Cad Saude Publica* 16 (Suppl 2): 13-34;

Dias JC, Silveira AC e Schofield CJ (2002) The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (5): 603-612;

Diotaiuti LG (2007) Triatomíneos. In: Teixeira A. Doença de Chagas e evolução. Editora Universidade de Brasília, Brasília. 309 pp;

Diotaiuti L, Faria Filho OF, Carneiro FCF, Dias JC, Pires HHR e Schofield CJ (2000) Aspecto operacionais do controle do *Triatoma brasiliensis*. *Cad Saúde Pública* 16 (sup. 2): 61-67;

Diotaiuti L, Ribeiro de Paula O, Falcão PL e Dias JC (1994) Evaluation of the Chagas disease vector control program in Minas Gerais, Brazil, with special reference to *Triatoma sordida*. *Bull Pan Am Health Organ* 28 (3): 211-219;

Dong K (1997) A single amino acid change in the para sodium channel protein is associated with knockdown-resistance (kdr) to pyrethroid insecticides in German cockroach. *Insect Biochem Mol Biol* 27 (2): 93-100;

Dujardin JP, Schofield CJ e Tibayrenc M (1998) Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Med Vet Entomol* 12 (1): 20-29;

Ewing B, Hillier L, Wendl MC e Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred: I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175-185;

Excoffier L, Smouse PE e Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2): 479-491;

Feyereisen R (1995) Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett* 82-83: 83-90;

Forattini OP (1980) Biogeography, origin, and distribution of triatominae domiciliaryity in Brazil. *Rev Saúde Publica* 14 (3): 265-299;

Forattini OP, Barata JM, Santos JL e Silveira AC (1981) Feeding habits, natural infection and distribution of domiciliary Triatomidae in the northeast region of Brazil. *Rev Saude Publica* 15 (2): 113-164;

Fu YX e Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133 (3): 693-709;

Galvão C (2007) Estado actual de la sistemática de Triatominae (Heteroptera: Reduviidae), vectores de La enfermedad de Chagas. In: Rojas de Arias A e Maldonado M. Taller del Cono Sur, actualización de la tripanosomiasis americana. Paraguay. 233 pp.

García BA, Manfredi C, Fichera L e Segura EL (2003) Short report: variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg* 68 (6): 692-694;

García BA, Zheng L, Pérez de Rosas AR e Segura EL (2004) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Mol Ecol Notes* 4: 568-571;

Gassmann AJ, Carrière Y e Tabashnik BE (2009) Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* 54: 147-163;

Giordano R, Cortez JC, Paulk S e Stevens L (2005) Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(7):753-760;

Gonzalez Audino P, Vassena C, Barrios S, Zerba E e Picollo MI (2004) Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (3): 335-339;

Guerrero FD, Jamroz RC, Kammlah D e Kunz SE (1997) Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and super-kdr point mutations. *Insect Biochem Mol Biol* 27 (8-9): 745-755;

Hartl DL e Clark AG (1997) Principles of population genetics - third edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland. 542 pp;

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L e Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34 (7): 653-665;

Hemingway J, Myiamoto J e Herath PRJ (1991) A possible novel link between organo phosphorus and DDT insecticide resistance genes in *Anopheles*: supporting evidence from fenitrothion metabolism studies. *Pestic Biochem Physiol* 39: 49-56;

Hervé JJ (1982) Mode of action of pyrethroids and resistance of these compounds. In. Nominé G. Deltametrin: monograph. Russel Uclaf. 412pp;

Ingles PJ, Adams PM, Knipple DC e Soderlund DM (1996) Characterization of voltage-sensitive sodium channel gene coding sequences from insecticide-

susceptible and knockdown-resistant house fly strains. *Insect Biochem Mol Biol* 26 (4): 319-326;

Jamroz RC, Guerrero FD, Kammlah DM e Kunz SE (1998) Role of the kdr and super-kdr sodium channel in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). *Insect Biochem Mol Biol* 28: 1031-1037;

Kasai S, Weerasinghe IS e Shono T (1998) P450 Monooxygenases are important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* say larvae. *Arch Insect Biochem Physiol* 37: 47-56;

Kimura M (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217 (5129): 624-626;

Kranthi KR, Jadhav D, Wanjari R, Krahthi S e Russell D (2001) Pyrethroid resistance and mechanisms of resistance in field strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 94 (1): 253-263;

Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 5: 150-163;

Lee SH, Smith TJ, Knipple DC e Soderlund DM (1999) Mutations in the house fly *Vssc1* sodium channel gene associated with super-kdr resistance abolish the pyrethroid sensitivity of *Vssc1*/tipE sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Biochem Mol Biol* 29 (2): 185-194;

Lent H e Wygodzinsky P (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Museum Nat History* 163: 123-520;

Li ZM, Liu SS, Liu YQ, Ye GY (2007) Temperature-related fitness costs of resistance to spinosad in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Bull Entomol Res* 97 (6): 627-635;

Liu Z, Valles SM e Dong K (2000) Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 30 (10): 991-997;

Lyman DF, Monteiro FA, Escarlate AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP e Beard CB (1999) Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 60 (3): 377-386;

Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berfe JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N e Pauron D (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* 7 (2): 179-184;

Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL e Williamson MS (1999) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol Biol* 8 (3): 339-346;

Massad E (2008) The elimination of Chagas' disease from Brazil. *Epidemiol Infect* 136: 1153–1164;

Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY e Matsumura F (1996) Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and kdr-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* 252 (1-2): 61-68;

Moncayo A (1999) Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 401-404;

Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB e Costa J (2004) Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 32 (1): 46-56;

Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield C e Beard CB (1999) Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans*

populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1:229-238;

Morin S, Williamson MS, Goodson SJ, Brown JK, Tabashnik BE e Dennehy TJ (2002) Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. Insect Biochem Mol Biol 32 (12): 1781-1791;

Noireau F, Bastrenta B, Catalá S, Dujardin JP, Panzera F, Torres M, Perez R, Galvão C e Jurberg J (2000) Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from field collection to characterization. Mem Inst Oswaldo Cruz 95 (Suppl 1): 119-122;

Noireau F, Cortez MG, Monteiro FA, Jansen AM e Torrico F (2005) Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? Trends Parasitol 21(1): 7-10;

Noireau F, Flores R, Gutierrez T e Dujardin JP (1997) Detection of sylvatic dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. Mem Inst Oswaldo Cruz 92 (5): 583-584;

Oliveira Filho AM, Melo MT, Santos CE, Faria Filho OF, Carneiro FC, Oliveira-Lima JW, Vieira JB, Gadelha FV e Ishihata J (2000) Focal and total residual insecticide spraying to control *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeast Brazil. Cad Saude Publica 16 (Suppl 2): 105-111;

Organización Panamericana de la Salud (2005) II Reunion técnica latinoamericana de monitoreo de resistência a insecticidas em triatomíneos vectores de Chagas. Panamá, 13pp;

Orihuela PL, Vassena CV, Zerba EN e Picollo MI (2008) Relative contribution of monooxygenase and esterase to pyrethroid resistance in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. J Med Entomol 45 (2): 298-306;

Panzer F, Dujardin JP, Nicolini P, Caraccio MN, Rose V, Tellez T, Bermúdez H, Bargues MD, Mas-Coma S, O'Connor JE e Pérez R (2004) Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerg Infect Dis* 10 (3): 438-446;

Panzer F, Ferrandis I, Calleros L, Lucero C, Ferreiro MJ, Panzer Y e Pérez R (2007a) Aports recientes de la citogenetica al estudio de los vectores de la enfermedad de Chagas. In: Arias AR e Maldonado M. Taller Del Cono Sur, actualizacion de la tripanosomiasis americana. Paraguay, 233 pp;

Panzer F, Pérez R, Lucero C, Ferrandis I, Ferreiro MJ, Calleros L e Romero V (2007b) Cambios genómicos en la subfamilia Triatominae, com énfasis en *Triatoma infestans*. In: Rojas Cortez M. Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud y Deportes, Programa Nacional de Chagas, Bolivia. 352 pp;

Panzer F, Pérez R, Nicolini P, Hornos S, Costa J, Borges E, Diotaiuti L e Schofield CJ (2000) Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera - Reduviidae - Triatominae). *Cad Saude Publica* 16 (Suppl 2): 83-88;

Park Y e Taylor MFJ (1997) A novel mutation L1029H in sodium channel gene hscp associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem Mol Biol* 27 (1): 9-13

Patterson JS, Barbosa SE e Feliciangeli MD (2008) On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta Trop* 110 (2-3): 187-199;

Pérez de Rosas AR, Segura EL e García BA (2007) Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Mol Ecol* 16 (7): 1401-1412;

Pérez de Rosas AR, Segura EL, Fichera L, García BA (2008) Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. *Genetica* 133 (3): 247-260;

Pessoa GCD, Sonoda IV, Rezende M, Oliveira-Filho AM e Diotaiuti L (2007) Monitoramento da suscetibilidade ao piretróide deltametrina em linhagens de *Triatoma sordida* (Stal, 1859). XXIII Reunião de pesquisa aplicada em doença de Chagas e leishmanioses. Uberaba.

Picollo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M e Zerba E (2005) High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. J Med Entomol 42(4): 637-642;

Picollo MI, Vassena CV, Mougabure Cueto GA, Verneti M e Zerba EN (2000) Resistance to insecticides and effect of synergists on permethrin toxicity in *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires. J Med Entomol 37 (5): 721-725;

Pires HH, Barbosa SE, Margonari C, Jurberg J e Diotaiuti L (1998) Variations of the external male genitalia in three populations of *Triatoma infestans* Klug, 1834. Mem Inst Oswaldo Cruz 93 (4): 479-483;

Posada D e Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends Ecol Evol 16 (1): 37-45;

Punukollu G, Gowda RM e Khan IA (2004) Early twentieth century descriptions of the Chagas heart disease. Int J Cardiol 95 (2-3): 347-349;

Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS e Vasavada BC (2007) Clinical aspects of the Chagas' heart disease. Int J Cardiol 115 (3): 279-283;

Raymond M (1985) Présentation d'un programme d'analyse Log-Probit pour micro-ordinateur. CAH. ORSTOM, Ser Ent Met et Parasitol 22: 117-121;

Rocha e Silva EO (1979) Profilaxia. In Brener Z e Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan. 463 pp;

Rojas Cortez M, Jansen AM, Gürtler R e Noireau F (2007) Ecología de *Triatoma infestans* y *Trypanosoma cruzi*, y la implicación de los reservorios silvestres, en los valles andinos de Bolivia. In: Arias AR e Maldonado M. Taller Del Cono Sur, actualización de la tripanosomiasis americana. Paraguay, 233 pp;

Rozas J, Sánchez-DelBarrio, Messeguer X e Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497;

Saitou N e Nei M (1987) The neighbor-joining method a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425;

Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U e Gürtler RE (2004) Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J Med Entomol* 41 (4): 643-649;

Schneider S, Roessli D e Excoffier L (2000) Arlequin ver 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland;

Schofield CJ (1994) *Triatominae: biología y control*. Eurocommunica Publications. United Kingdom. 77 pp;

Schofield CJ e Dias JC (1999) The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* 42: 1-27;

Schofield CJ, Diotaiuti L e Dujardin JP (1999) The process of domestication in *Triatominae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 375-378;

Schofield CJ, Jannin J e Salvatella R (2006) The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22(12): 583-588;

Silveira A (2000) Current situation with chagas disease vector control in the Americas. *Cad Saude Publica* 16 (Suppl 2): 35-42;

Silveira A (2000) O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América: História de uma iniciativa internacional. 1991/2001. Uberaba, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. 316p;

Silveira A e Vinhaes M (1999) Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 Suppl 1:405-411;

Soderlund DM e Knipple DC (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. Insect Biochem Mol Biol 33 (6): 563-577;

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595;

Teixeira A (2007) Apresentações clínicas da doença de Chagas. In: Teixeira A. Doença de Chagas e evolução. Editora Universidade de Brasília, Brasília. 309 pp;

Teixeira A e Hecht MM (2007) O agente infeccioso e o hospedeiro. In: Teixeira A. Doença de Chagas e evolução. Editora Universidade de Brasília, Brasília. 309 pp;

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F e Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 24: 4876-4882;

Tolosa AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E e Picollo MI (2008) Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. J Med Entomol 45 (3): 421-426;

Tyler KM e Engman DM (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol 31 (5-6): 472-481;

Vassena CV, Picollo MI e Zerba EN (2000) Insecticide resistance in Brazilian *Triatoma infestans* and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. Med Vet Entomol 14 (1): 51-55;

Vassena CV, Picollo MI, Orihuela OS e Zerba E (2007) Desarrollo y manejo de la resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans*: situación en Bolivia. In: Rojas Cortez M. Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud y Deportes, Programa Nacional de Chagas, Bolivia. 352 pp;

Vinhaes MC e Dias JC (2000) Chagas disease in Brazil. Cad Saude Publica 16 (Suppl 2): 7-12;

Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, McAllister JC, Brogdon WG, Roberts JM, Mwangi RW e Hawley WA (1999) Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *Anopheles gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. Med Vet Entomol 13 (3): 239-244;

Vulule JM, Beach RF, Atieli FK, Roberts JM, Mount DL e Mwangi RW (1994) Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. Med Vet Entomol 8: 71-75;

World Health Organization (2002) Insect vectors and human health. Report of the Scientific Working Group meetin. Geneva 80 pp.

Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations, Vol. 4: Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago;

Zerba E e Picollo MI (2007) Resistencia a insecticidas piretroides en *Triatoma infestans*. In: Rojas de Arias A e Maldonado M. Taller del Cono Sur, actualización de la tripanosomiasis americana. Paraguay. 233 pp.