

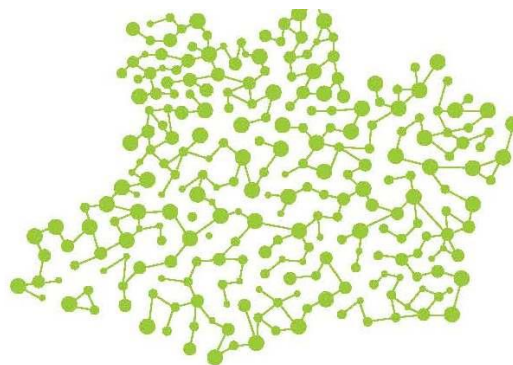


UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECIOSAS



**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE *Rhodnius robustus* Larrouse, 1927
E *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE, TRIATOMINAE)
IMAGENS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E PERFIL
LIPÍDICO POR MEIO DA TÉCNICA DE MALDI-TOF**

IZABELE DE SOUZA GUIMARÃES



**MANAUS
2023**

IZABELE DE SOUZA GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 E
Rhodnius prolixus Stål, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIIDAE, TRIATOMINAE)
IMAGENS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E PERFIL
LIPÍDICO POR MEIO DA TÉCNICA DE MALDI-TOF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção de grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Coorientador: Prof. Dr. Éder dos Santos Souza

**MANAUS
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

G963cc

Guimarães, Izabele de Souza

Caracterização taxonômica de *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 e *Rhodnius prolixus* stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) imagens por microscopia eletrônica de varredura e perfil lipídico por meio da técnica de MALDI-TOF / Izabele de Souza Guimarães
Guimarães, Izabele de Souza. Manaus: [s.n], 2023.
63 f.: color.; 7cm.

Dissertação – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical –
Mestrado em Doenças Tropicais e Infecciosas – Universidade do Estado
do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientadora: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra

Coorientador: Éder dos Santos Souza

1. Triatominae. 2. Vetor. 3. Doença de Chagas. 4. MALDI-TOF. 5. MEV

I. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra (Orient.).

II. Éder dos Santos Souza (Coorient.).

III. Universidade do Estado do Amazonas.

IV. Caracterização taxonômica de *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 e *Rhodnius prolixus* stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), imagens por microscopia eletrônica de varredura e perfil lipídico por meio da técnica de MALDI-TOF

FOLHA DE JULGAMENTO

**CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA DE *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 E *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 (HEMIPTERA, REDUVIDAE, TRIATOMINAE)
IMAGENS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E PERFIL
LIPÍDICO POR MEIO DA TÉCNICA DE MALDI-TOF**

IZABELE DE SOUZA GUIMARÃES

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

**Prof^a. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra. Dr^a
Presidente**

**Prof^a. Silvia Cassia Brandão Justiniano. Dr^a
Membro**

**Prof^a. Itanna Oliveira Fernandes. Dr^a
Membro**

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Maria Rosângela Andrade de Souza e Francisco Lira Guimarães, por serem meu porto seguro, me dando apoio nos estudos desde sempre, por confiarem em mim e nunca me deixarem desistir dos meus sonhos.

E á memória de Nelson Ferreira Fé, por ser meu mestre e compartilhar comigo o amor pela entomologia médica e me mostrar que nada dispensa um bom estudo de taxonomia.

AGRADECIMENTOS

À Deus

Aos meus pais que viveram esses dois anos de mestrado junto comigo, sem as palavras de incentivo e confiança em mim nada disso seria possível.

À minha orientadora Dr.^a Maria das graças Vale Barbosa Guerra, que me recebeu no grupo de pesquisa e me aceitou como aluna, agradeço por toda orientação, conselhos e puxões de orelha.

Ao meu coorientador Dr. Éder dos Santos Souza, agradeço por não medir esforços para me ajudar a realizar os procedimentos do mestrado, por disponibilizar seu tempo, me ensinar tanto e por além de me orientar, ser um amigo.

Ao Sr. Nelson Ferreira Fé, *In Memoriam*, por me acompanhar desde a minha iniciação científica, graduação na faculdade e todos os meus passos até chegar ao mestrado, obrigada por me ensinar tanto sobre morfologia e taxonomia de diversos vetores de importância médica, por estar sempre disponível para tirar dúvidas e oferecer sugestões, por ser meu grande mestre e amigo.

Ao técnico de laboratório Flavio Augusto Fé, pela paciência em me ensinar e disposição em me ajudar com os triatomíneos durante todo o mestrado.

Aos meus amigos da graduação Lucian Veras Canto e Layne Even Borges de Souza, obrigada por me apoiarem e estarem sempre presentes me dando força em todos os momentos.

Ao meu grupo de pesquisa em doença de Chagas Dr. João Macias Frade.

À Universidade do Estado do Amazonas – UEA, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - PPGMT e aos professores.

Ao Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos – CMABio da UEA, seus técnicos e colaboradores, pela realização da microscopia eletrônica de varredura.

À Superintendência da Zona Franca de Manaus – SUFRAMA, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq por me possibilitarem a execução deste estudo.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Amazonas – FAPEAM, pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento da pesquisa.

Ao instituto de Química da Universidade Estadual Paulista – UNESP e Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, pela realização da Espectrometria de Massa.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD por disponibilizar toda a sua estrutura para as pesquisas científicas.

Ào Centro de entomologia, técnicos, colaboradores, paics e estagiários que estiveram em meu convívio, em especial ao MSc. Rubens Celso que me tirou várias dúvidas, e minha colega de turma Emilly de Sousa Moura, pude aprender com vocês em vários momentos, obrigada!

Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.

Stephen Hawking

RESUMO

Os triatomíneos são insetos hematófagos popularmente conhecidos como “barbeiros”, de grande importância médica, por serem vetores do *Trypanosoma cruzi* o agente etiológico da doença de Chagas. São descritas mais de 150 espécies, distribuídas em 18 gêneros. *Rhodnius prolixus* coloniza domicílios em ambientes urbanos em países vizinhos ao Brasil, e *Rhodnius robustus*, é uma espécie silvestre, encontrada frequentemente invadindo moradias na Amazônia especialmente em Manaus. Ambas são muito próximas morfológicamente e de difícil identificação taxonômica por método convencional, consideradas espécies crípticas. São criadas no laboratório da Unidade de entomologia Nelson Ferreira Fé, na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), utilizadas no diagnóstico complementar da doença de Chagas e em estudos sobre a interação parasito-vetor. O objetivo desse estudo foi investigar a veracidade taxonômica das espécies *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* da colônia de triatomíneos da FMT-HVD. A diferenciação das duas espécies, foi realizada através de observações sobre os aspectos morfológicos usando a microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), e perfil lipídico, por proteômica usando a técnica de MALDI-TOF. Os procedimentos foram realizados na FMT-HVD para identificação taxonômica inicial por microscopia óptica, as imagens de MEV foram feitas no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABIO/UEA) e a técnica de MALDI-TOF no Instituto de química da UNESP. A aplicação da técnica lipídica combinada com ferramentas quimiométricas e a taxonomia integrativa como a microscopia eletrônica de varredura demonstraram com precisão, duas espécies crípticas do gênero *Rhodnius*, de forma rápida e eficiente quando comparada com outras técnicas consideradas também, de alta precisão para identificação e diferenciação de espécies de triatomíneos, apresentando boa reprodutibilidade.

Palavras-chave: Triatominae; Vetor; Doença de Chagas; MALDI-TOF; MEV

ABSTRACT

Triatomines are blood-sucking insects popularly known as “kissing bugs”. More than 150 species are described, and among them, *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius robustus*, considered vectors of *Trypanosoma cruzi* or etiological agent of Chagas disease. *Rhodnius prolixus* colonizes homes in urban environments in countries neighboring Brazil, and *Rhodnius robustus* is a wild species, often found invading homes in the Amazon, especially in Manaus. Both are very similar morphologically and difficult to identify taxonomically by conventional method, considered cryptic species. These species are created in the entomology laboratory of the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMTHVD), for use in the complementary diagnosis of Chagas disease, the “xenodiagnóstico” and in studies on the parasite-vector interaction. The objective of this study is to investigate the taxonomic veracity of the species *Rhodnius robustus* and *Rhodnius prolixus* from the triatomine colony of FMT-HVD. The differentiation of the two species will be made through observations on the morphological aspects by conventional methodology, using optical microscopy, by images of eggs, head and abdomen using scanning electron microscopy (SEM), and lipid profile, by proteomics using the technique from MALDI-TOF. The procedures will be performed at the FMTHVD for conventional taxonomic identification, the images will be taken at the Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABIO/UEA) and the MALDITOF technique at the Instituto de química da UNESP. The application of the lipid technique combined with chemometric tools and integrative taxonomy such as scanning electron microscopy were able to accurately two cryptic species of the genus *Rhodnius*. The methodology described in this article is a fast and efficient way when compared to other high precision techniques for identification and differentiation of triatomine species, presenting good reproducibility.

Key words: Triatominae; Vector; Chagas Disease; MALDI-TOF; MEV

RESUMO LEIGO

Os insetos popularmente conhecidos como “barbeiros”, se alimentam de sangue, podendo se infectar e transmitir o parasita causador da Doença de Chagas, nominado de *Trypanosoma cruzi*. Na Amazônia, as pessoas adoecem ao tomar o açaí contaminado, no entanto, não se sabe a forma de contaminação desse alimento, acreditando-se que pode acontecer pela trituração de barbeiros infectados como por exemplo o *Rhodnius robustus* uma espécie que invade as casas próximo as áreas de floresta. Essa espécie é semelhante à *Rhodnius prolixus* que vive dentro das casas em países como a Venezuela e Colômbia, e ambas são criadas no laboratório da UENFF na FMT-HVD, para uso no diagnóstico de Chagas, bem como para diversos estudos como transmissores. Considerando que a diferenciação das duas espécies é complicada, esse estudo mostrou utilizando metodologia mais avançada, que são espécies diferentes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do Ciclo biológico de <i>Rhodnius</i> sp. Fonte: Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores, 2020 (Adaptado) (19).	3
Figura 2. Morfologia dos ovos de triatominae. fonte: Barata, 1981 (Modificado) (20)	4
Figura 3. Estádios ninfais de <i>R. robustus</i> . Fonte: Galvão, 2014 (Modificado) (9).....	5
Figura 4. Morfologia dos adultos de triatominae. Fonte: Jurberg et al, 2014; Galvão, 2014 (Modificado) (9,26)	6
Figura 5. Distribuição global de casos da doença de Chagas. Fonte: WHO, 2018. ...	7
Figura 6. Distribuição de casos da doença de Chagas aguda no Amazonas. Fonte: E-book Doença de <i>Chagas</i> : aspectos gerais, emergência na Amazônia e orientações sobre o atendimento de pacientes no estado do Amazonas, Brasil, 2021 (60).....	10
Figura 7. Ovos da espécie <i>R. bretesi</i> fixados em piaçava. Fonte: Gersonval Monte.	11

Artigo

Figura 1. (A) Fêmea de <i>R. robustus</i> ; (B) Fêmea de <i>R. prolixus</i>	19
Figura 2. (A) Gráfico de escores que corresponde às amostras; (B) gráfico de cargas que corresponde às variáveis de massa em relação à carga (m/z). Erro! Indicador não definido.	
Figura 3. Visão geral do ovo por Microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) <i>R. prolixus</i> ; (B) <i>R. robustus</i> . ex: exocório; bc: borda corial; cl: colo.	26
Figura 4. Exocório por MEV. (A) <i>R. prolixus</i> ; (B) <i>R. robustus</i> . ll: linhas limitantes; ec: células hexagonais; ft: tubo folicular.....	26
Figura 5. Visão geral da cabeça por MEV. (A) <i>R. prolixus</i> (B) <i>R. robustus</i> . ac: anteclípeo; c: clipeo; v: vértice; ol: olhos; oc: ocelos.....	28
Figura 6. Tórax por MEV. A: <i>R. prolixus</i> ; B: <i>R. robustus</i> . pr: pronoto; sc: escutelo; sb: base de semicircular; sg: espaço glabro; cd: depressão central; le: borda lateral; ap: ápice do escutelo; pu: processo do urotergito I; tg: sulco transversal; fr: franja.	28

LISTA DE QUADROS

Artigo

Quadro 1. Protocolos utilizados para testar a eficiência da extração lipídica.	20
Quadro 2. Comparação morfológica dos ovos de <i>R. prolixus</i> e <i>R. robustus</i>	25
Quadro 3. Comparação morfológica entre adultos de <i>R. prolixus</i> e <i>R. robustus</i>	29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

DC	Doença de Chagas
DCA	Doença de Chagas Aguda
DCC	Doença de Chagas Crônica
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
FVS	Fundação de Vigilância em Saúde
MALDI	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
OPAS	Organização Pan-americana da Saúde
TOF	<i>Time of Flight</i>
PLS	<i>Partial Least Squares</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Distribuição geográfica	1
1.2 Hábitos	2
1.3 Ciclo de vida e desenvolvimento dos triatomíneos.....	3
1.4 Características morfológicas	4
1.4.1 Estágio de ovo.....	4
1.4.2 Estágio de ninfas.....	4
1.4.3 Estágio adulto.....	5
1.5 Triatomíneos e a doença de Chagas	6
1.5.1 Doença de Chagas na Amazônia.....	8
1.5.2 Doença de Chagas e Triatomíneos no Amazonas	9
1.6 Gênero <i>Rhodnius</i> Stål, 1859	10
1.6.1 <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>Rhodnius robustus</i>	12
1.6.2 <i>Rhodnius prolixus</i> e <i>Rhodnius robustus</i> criados no laboratório - FMT-HVD....	13
1.7 Relevância do Estudo	14
2. OBJETIVOS	15
3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO	16
4. CONCLUSÃO	32
5. REFERÊNCIAS	33
6. ANEXOS	43
6.1 Dados morfométricos detalhados de ovos e adultos de <i>R. robustus</i> e <i>R. prolixus</i>	43
6.2 Procedimento operacional padrão para a criação de triatomíneos em laboratório	44
6.3 Procedimento operacional padrão para a o MALDI-TOF de triatomíneos.....	46
6.4 Procedimento operacional padrão para a microscopia eletrônica de varredura de triatomíneos.....	48

1.INTRODUÇÃO

Os triatomíneos são insetos hematófagos, conhecidos popularmente como “Barbeiros”, pertencentes à Ordem Hemiptera, Família Reduviidae. A maioria dos insetos da ordem Hemiptera (percevejos) se alimentam de seiva de plantas, no entanto, algumas espécies são predadoras e podem se alimentar de fluidos corporais de outros vertebrados, enquanto outros, em menor número, se alimentam do sangue de vertebrados (1,2).

Na família Reduviidae, está a subfamília Triatominae, cinco tribos, 18 gêneros, 154 espécies e 3 fósseis. As tribos Rhodiniini e Triatomini incluem espécies epidemiologicamente relevantes, distribuídas em três gêneros de importância médica: *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* (3–8). Em função de seus hábitos hamatofágicos obrigatórios, várias espécies são inseridas no ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, o causador da doença de Chagas (DC) (9–12).

1.1. Distribuição geográfica

As 154 espécies de triatomíneos são encontrados nas Américas, nas regiões Neotropicais e Neárticas (desde o sul dos Estados Unidos até a Patagônia, na Argentina). A espécie *Triatoma rubrofasciata* é encontrada em várias áreas do globo, geralmente em zonas portuárias, e sempre associada a presença de ratos. Outras seis espécies do gênero *Triatoma* ocorrem no sul da Ásia e norte da Austrália, e as seis espécies do gênero *Linshcostheus* estão restritas a Índia (13–15).

Na América do Sul e América Central, as espécies *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* e *Triatoma dimidiata*, são os principais vetores da DC (6,16–18). No Brasil há registros de aproximadamente 68 espécies de triatomíneos, distribuídos em 10 gêneros: *Alberprosenia*, *Belminus*, *Cavernicola*, *Eratyrus*, *Microtriatoma*, *Panstrongylus*, *Parabelminus*, *Psamolestes*, *Rhodnius* e *Triatoma* (6,8,19–24).

As cinco espécies: *R. robustus*, *R. pictipes*, *R. prolixus*, *E. mucronatus* e *P. geniculatus*, tiveram ou continuam tendo participação relevante na transmissão domiciliar da doença de chagas (DC) (6,9,18,25,26).

1.2 Hábitos

A hematofagia obrigatória distingue os triatomíneos das demais subfamílias de reduvidos, por possuírem uma membrana entre o segundo e o terceiro segmento do aparelho bucal picador-sugador, que permite a flexão do terceiro segmento do lábio no ato de sugar. Hemípteros das famílias Cimicidae (percevejos de cama) e Polictenidae (ectoparasitos de morcegos) são também hematófagos obrigatórios, porém, não estão diretamente envolvidos na transmissão de doenças ao homem (12,27).

A adaptação de alguns reduvidos ancestrais ao hábito hematofágicos é o marco do surgimento dos triatominae. Apesar de se aceitar a origem da hematofagia surgindo de um comportamento predador anterior, se desconhece, até o momento, qual grupo predador teria dado origem aos triatominae, pela ausência de uma reconstrução filogenética sólida (28,29).

São insetos fotofóbicos, de hábitos noturnos, estritamente hematófagos, que eventualmente realizam o canibalismo e coprofagia (podendo desta forma, excepcionalmente haver transmissão do *T. cruzi*, de vetor para vetor) (19,30,31). Vivem, em média, entre um à dois anos, formando colônias em ambientes próximos à sua fonte de alimentar (19).

A grande maioria vive em ambientes silvestres colonizando ninhos de aves, tocas de animais, sob cascas ou ocos de árvore, em bromélias, palmeiras e outros ecótopos, associados a mamíferos, aves, batráquios e répteis dos quais se alimentam. No decurso da evolução, algumas espécies adquiriram a capacidade de colonizar as estruturas artificiais construídas pelo homem nas proximidades de suas casas, como galinheiros, pocilgas e estábulos e são denominados peridomiciliar. Outras são capazes de colonizar o interior das habitações humanas, principalmente daquelas

construídas de maneira a propiciar condições de abrigar uma colônia de triatomíneos, construções feitas de barro e bambu com folhas de palmeira, que acabam tornando o ambiente propício também para animais silvestres, que viviam no local antes das alterações feitas pelo homem, o triatomíneo acaba tendo uma fonte alimentar próxima e se torna domiciliado, facilitando a transmissão da DC ao homem (31).

1.3 Ciclo de vida e desenvolvimento dos triatomíneos

Considerados insetos de desenvolvimento hemimetábolo, durante seu ciclo de vida passam pelas fases (ou estágios) de ovo, cinco estádios ninfais (estágio imaturo) e adulto (Figura 1) (12,19,25). Dependendo da disponibilidade de fonte alimentar há variação na duração do ciclo de vida. As ninfas do 1° ao 5° estágio, e adultos, tanto macho quanto fêmeas, necessitam de ao menos um repasto sanguíneo para se desenvolver, e o tempo de duração de cada ciclo biológico varia para cada espécie e de acordo com a quantidade de sangue ingerida, temperatura e umidade (32,33).

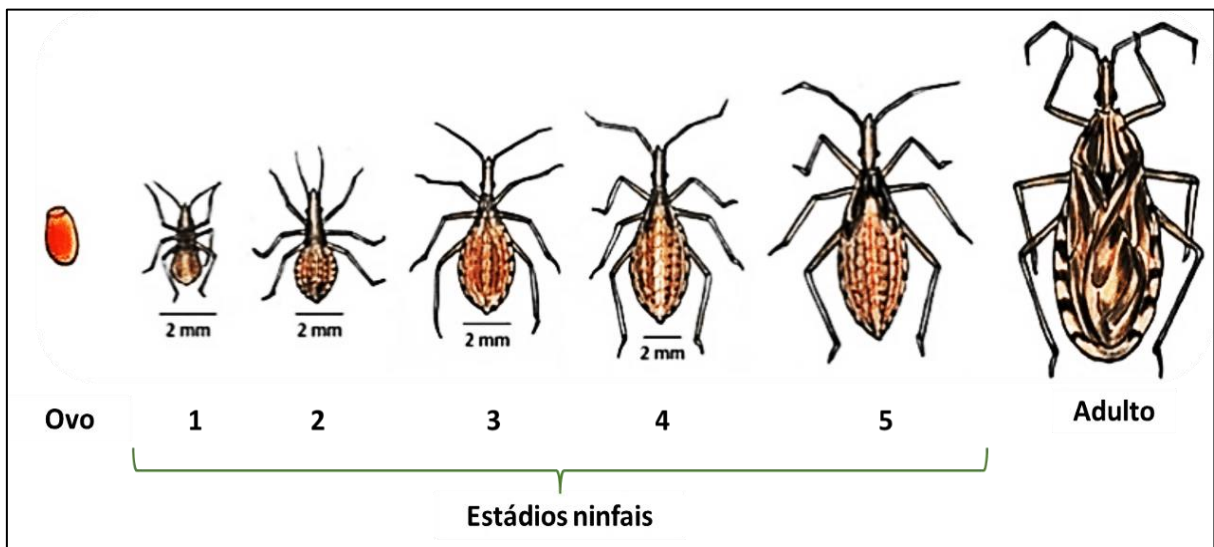


Figura 1. Ilustração do Ciclo biológico de *Rhodnius sp.*

Fonte: Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores, 2020 (Adaptado) (34).

1.4 Características morfológicas

1.4.1. Estágio de ovo

Os ovos dos triatomíneos são formados por opérculo e corpo do ovo, com tamanhos, estruturas, ornamentações e formas diferentes. Podem medir menos 1mm, como os ovos da espécie *Alberprosenia malheroi*, e mais de 4mm de comprimento como os ovos de *Dipetalogaster maxima* (21,35). O formato do ovo pode ser esférico, cilíndrico ou elipsoide, e as estruturas como o colo, colarinho e chanfradura lateral podem estar presentes ou ausentes (Figura 2); a superfície da casca apresenta ornamentações características para cada espécie, como linhas limitantes ou células hexagonais. Algumas fêmeas fixam seus ovos no substrato, como é o caso do gênero *Rhodnius* e outras fazem a postura dos ovos livres no substrato, como na maioria das espécies dos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma* (19,36–39).

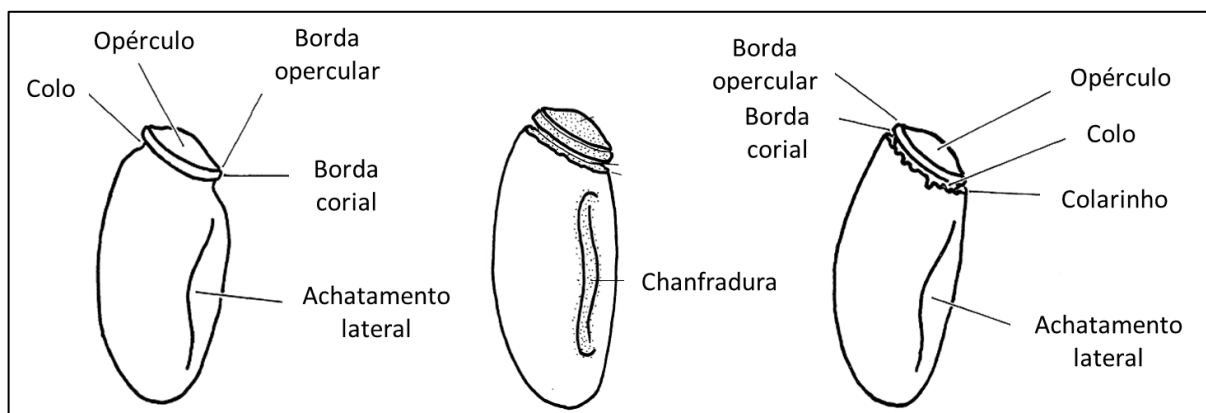


Figura 2. Morfologia dos ovos de triatomíneos. Fonte: Barata, 1981 (Modificado) (36).

1.4.2 Estágio de ninfas

As ninfas se diferenciam dos adultos por apresentarem olhos menores, ausência de ocelos, asas, fossetas esponjosas e pela imaturidade sexual. No 1º estágio, as ninfas têm uma coloração mais tênue, tamanho pequeno e não apresentam manchas conexas, mas, a medida que vão mudando de um estágio para o outro, além de aumentarem de tamanho, surgem as manchas do conexo e a

quitinização se forma mais forte, acentuada a coloração (40). As ninfas de 4° e 5° estádios apresentam tecas alares rudimentares, pronoto em forma de escudo, tarso bi-segmentados e esclerotização do abdômen incompleto, podendo apresentar já no 5° estádio diferenciação sexual externa e interna (12,41).

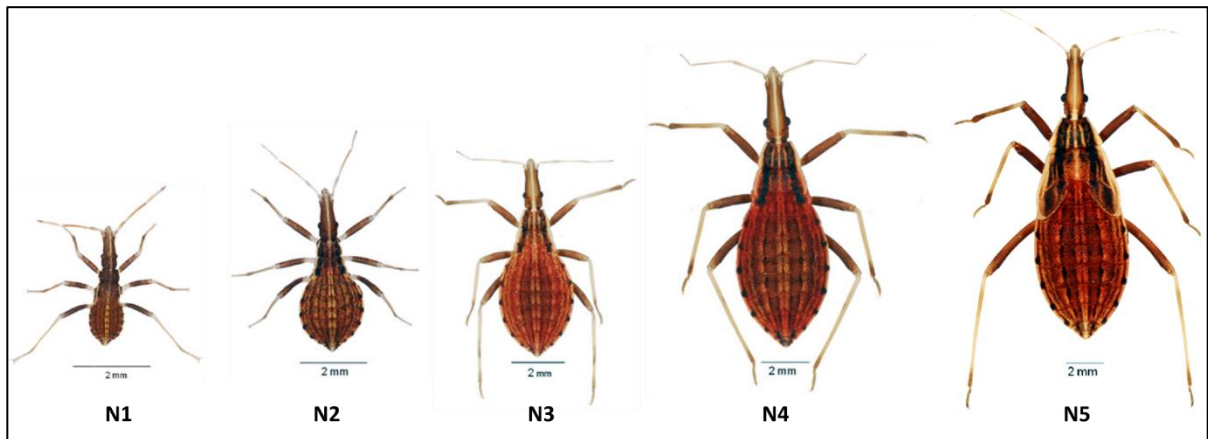


Figura 3. Estádios ninfais de *R. robustus*. Fonte: Galvão, 2014 (Modificado) (19).

1.4.3 Estágio adulto

Os barbeiros adultos em geral apresentam asas desenvolvidas, ocelos e dimorfismo sexual, medem de 20 a 30 mm de comprimento, com exceção das espécies *Alberprosenia goyovargasi* (5 mm) e *Dipetalogaster maxima* (44 mm), (19,21,38,39). Sua coloração varia de acordo com a espécie, podendo ser negra ou marrom com manchas amareladas, alaranjadas, amarronzadas ou avermelhadas em várias regiões do corpo, com intensidade e distribuição variada. O abdome dos barbeiros é achatado dorso-ventralmente e, quando as asas estão em repouso, pode-se ver uma borda, chamada de conexivo (Figura 4). São insetos lentos, pouco agressivos e de pouca mobilidade espacial, com voos de até 200 metros (19,38,39,42,43).

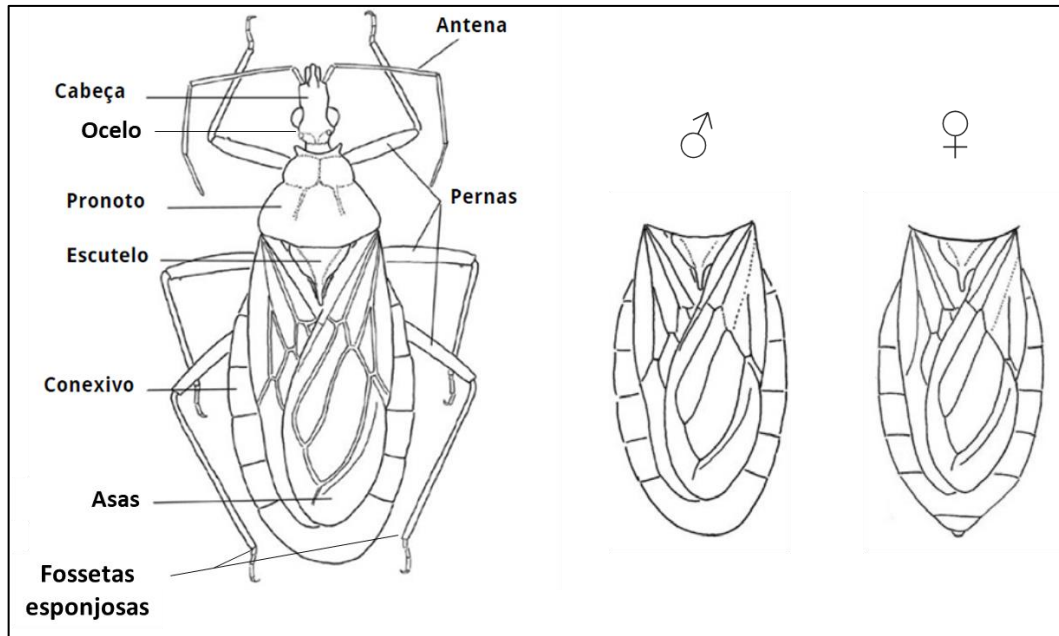


Figura 4. Morfologia dos adultos de triatominae. Fonte: Jurberg et al, 2014; Galvão, 2014 (Modificado) (19,42)

1.5 Triatomíneos e a doença de Chagas

Cerca de 20 espécies de triatomíneos são envolvidas no ciclo de transmissão do *T. cruzi* por terem hábitos domiciliados vivendo no intra ou peridomicílio, tornando necessária a vigilância da doença de Chagas, uma enfermidade das Américas, descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas que além da nova patologia tropical, descreveu simultaneamente seu agente etiológico o protozoário *T. cruzi*, os seus reservatórios naturais, e o inseto hematófago responsável pela transmissão vetorial, o triatomíneo (33,44–46).

Segundo a OMS, no mundo, há cerca de 6 a 7 milhões de pessoas portadoras do *T. cruzi*, geralmente vivendo em condições precárias de habitação, principalmente em áreas endêmicas de 21 países, como Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (47–49). Devido as migrações descontroladas de indivíduos portadores da DC, países não endêmicos, como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e alguns

países europeus, passaram a registrar casos transmitidos por transplante de órgãos, transfusão de sangue e materno-fetal (50,51) (Figura 5).

Em 2006, o Brasil obteve o certificado de controle do principal vetor da DC no país, o triatomíneo da espécie *Triatoma infestans*, pela Organização Pan-americana da Saúde (OPAS), que foi possível através de medidas de controle e monitoramento do vetor nas habitações, melhoria nas condições de vida da população e educação em saúde (49,52). Mas, mesmo após mais de 100 anos de sua descoberta, a DC continua sendo um problema de saúde pública, associada a problemas sociais e políticos, afetando principalmente pessoas em situação de pobreza (53).

Nos últimos anos os casos de Doença de Chagas Crônica (DCC) observados no Brasil são referentes a infecções ocorridas antes do controle do *T. infestans*, e através de surtos de Doença de Chagas Aguda (DCA) principalmente na Amazônia, associados na maioria dos casos, à transmissão oral (54).

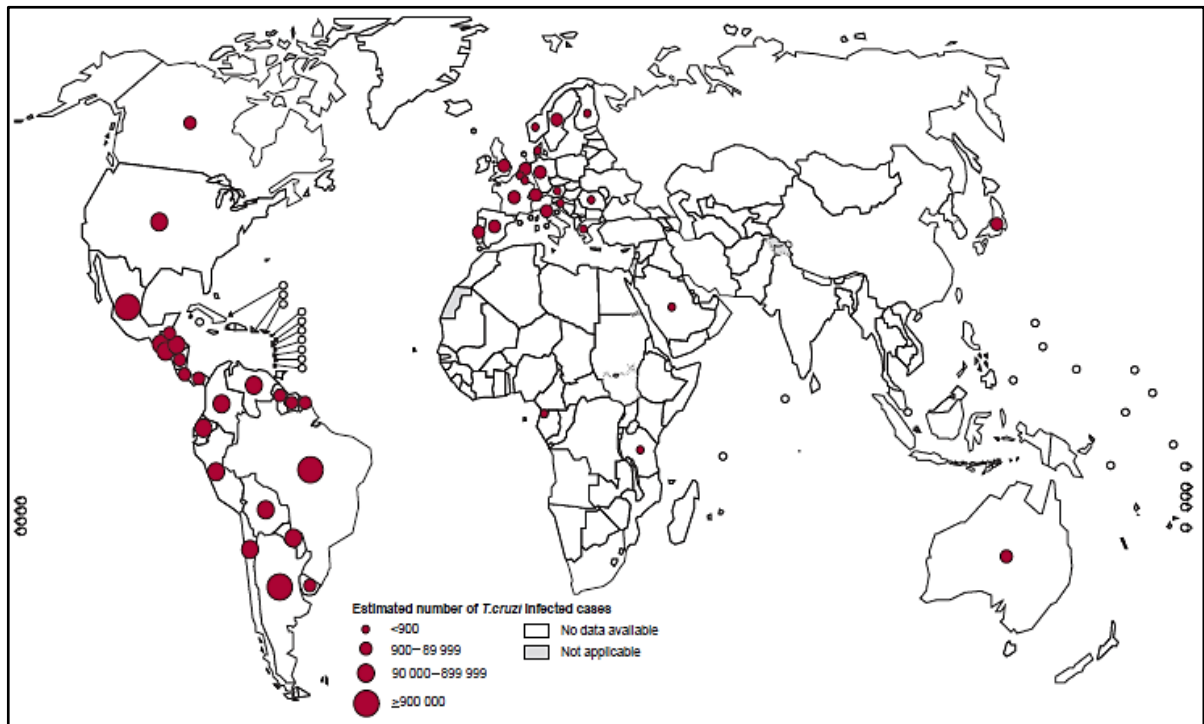


Figura 5. Distribuição global de casos da doença de Chagas. Fonte: WHO, 2018.

1.5.1 Doença de Chagas na Amazônia

Durante muito tempo a Amazônia brasileira foi considerada livre da DC, porém o ciclo silvestre vem sendo registrado na região desde 1924. Os primeiros casos agudos ocorreram em 1969 no Pará, sem registros de triatomíneos, levantando a suspeita de infecção oral. No início da década de 2000, cursos e treinamentos de técnicos para o reconhecimento do *T. cruzi* presentes em lâminas durante as investigações de rotina da malária, permitiram a detecção precoce de casos de DC na Amazônia. Desde então casos da doença tem sido notificados ao longo dos anos principalmente no Pará, Amapá, e Amazonas (55–62).

Nessa região fatores como a intensa migração de pessoas, povoamento desordenado e adaptação de vetores e animais silvestre ao domicílio, aumentam o risco de infecção pelo *T. cruzi*. A floresta Amazônica abrange o Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela e Guiana Francesa, a região tem 36 espécies de triatomíneos e dezenas de espécies de reservatórios descritos na região, na sua maioria infectados (63,64).

Sobre triatomíneos, há registro da ocorrência de 25 espécies, todas de hábitos silvestres, e algumas situações pontuais, como o registro de colônias de *Triatoma maculata* em domicílios em Roraima, *Panstrongylus geniculatus* em chiqueiros de porcos na ilha de Marajó no Pará, e frequentes registros de espécies do gênero *Rhodnius*, principalmente *Rhodnius robustus*, encontrada acidentalmente em peridomicílio e domicílio, em áreas rurais e urbanas onde os fragmentos de mata foram alterados para construção de residências habitacionais, sem registro de colônia nesses ambientes (65). Essa espécie ocorre em toda Amazônia, associada à palmeiras tais como, *Schelea maracaibensis* e *Acrocomia sclerocarpa*, *Attalea phalerata*, *Oenocarpus bacaba*, *Mauritia flexuosa* (34,37–39). Todas são espécies de grande importância médica por sua susceptibilidade à infecção natural pelo *T. cruzi*, e sua capacidade vetorial tendo em vista seu hábito de eliminar as fezes durante o repasto sanguíneo (40).

1.5.2 Doença de Chagas e Triatomíneos no Amazonas

No Amazonas os primeiros relatos da DC foram sobre casos na fase crônica, em 1977 no município de Barcelos, em extrativistas, coletores de piaçava cuja ocupação laboral os expunha, de forma contínua, ao ecótopo natural do vetor *Rhodnius bretesi* (66–68). Em 1980 foi registrado o primeiro caso da DC na fase aguda, no município de São Paulo de Olivença, em uma criança, por transmissão vetorial, possivelmente acidental, sem registro de triatomíneos domiciliados (69,70).

Em 2004 foram realizados cursos e treinamentos de técnicos para o reconhecimento do *T. cruzi* presentes em lâminas durante as investigações de rotina da malária. Desde então casos isolados e surtos têm sido relatados, identificados durante a vigilância da malária (71,72).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e da Fundação de Vigilância em Saúde (FVS), de 1980 a 2022 foram registrados mais de 150 casos de DCA no Amazonas, em 10 surtos e casos isolados de transmissão vetorial (Figura 6). No Amazonas a transmissão oral, é responsável pelo maior número de casos notificados, associados ao consumo de suco de açaí e patauí contaminados (73).

Nos casos de pacientes crônicos da DC a detecção ocorre através da realização de inquéritos sorológicos, processos de triagem para a doação de sangue, e em pacientes que comparecem a unidade de saúde com manifestações clínicas características da doença, como: cardiopatias chagásicas, associada à insuficiência cardíaca, arritmias, morte súbita e tromboembolismo periférico. Em nenhuma das situações, a população acometida pela doença tem conhecimento sobre a transmissão vetorial, considerando que nessa região os triatomíneos não colonizam o domicílio. Entretanto, frequentemente esses insetos são encontrados dentro das residências (71,74,75).

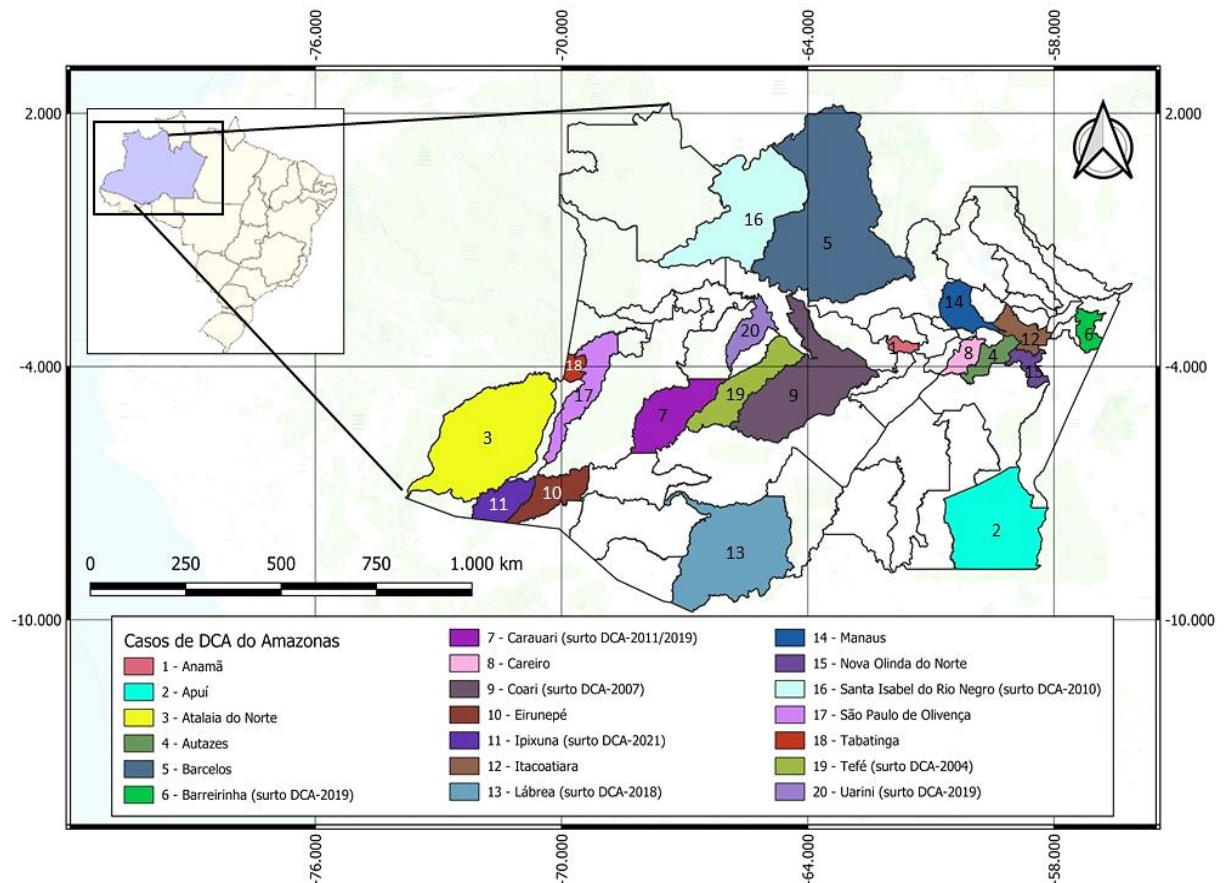


Figura 6. Distribuição de casos da doença de Chagas aguda no Amazonas. Fonte: E-book Doença de Chagas: aspectos gerais, emergência na Amazônia e orientações sobre o atendimento de pacientes no estado do Amazonas, Brasil, 2021 (76).

Em relação aos triatomíneos, no Amazonas são registradas 12 espécies: *Cavenicola lenti*, *C. pilosa*, *Eratyrus mucronatus*, *Panstrongylus geniculatus*, *P. Lignarius*, *P. rufotuberculatus*, *Microtriatoma trinidadensis*, *Rhodnius amazonicus*, *R. brethesi*, *R. paraenses*, *R. pictipes* e *R. robustus* (68,77–83).

1.6 Gênero *Rhodnius* Stål, 1859

O gênero *Rhodnius* possui 21 espécies, foi criado por Stål em 1859, tendo como espécie base *R. prolixus*, sua caracterização e diferenciação dos outros gêneros de triatomíneos é fácil em função de características bem marcantes, como a cabeça alongada, cilíndrica, mais longa que o pronoto, e tubérculos anteníferos inseridos no ápice da cabeça. Em contrapartida, a diferenciação entre as espécies dentro do gênero sempre foi uma tarefa árdua (19). Os insetos são relativamente pequenos (11-

26mm), coloração desde o pardo amarelo até o negro com manchas castanho escuras ou pardo-negras, em certas regiões do corpo (12).

Com o decorrer dos anos, várias metodologias foram criadas para facilitar a classificação e caracterização das espécies do gênero *Rhodnius*, dentre as principais abordagens utilizadas pode-se citar os estudos das estruturas fálicas, análise dos exocórios dos ovo, descrição de ninfas, ciclo biológico, estudos por microscopia eletrônica, microscopia eletrônica de varredura, morfometria, bem como análises isoenzimáticas e citogenética (3,12,36,37,41,84–122).

Nesse gênero a postura dos ovos é feita de forma individual ou agrupada, aderidos ao substrato (Figura 7). Embora cada espécie apresente características próprias, em geral, o formato destes ovos é elipsoide com tamanho mediano, apresentado colo e borda corial bastante evidentes (123).



Figura 7. Ovos da espécie *R. bretesi* fixados em piçava. Fonte: Gersonval Monte.

Com relação a bioecologia, a maioria das espécies desse gênero vivem em habitats silvestres, domicílios atraídos pela luz. São frequentemente associados a palmeiras tendo como fontes alimentares preferenciais aves, roedores, marsupiais, morcegos, lagartos e o homem. Algumas espécies são encontradas naturalmente

infectadas pelo *T. rangeli* (não patogênico ao homem) e *T. cruzi*, consideradas importantes vetores da doença de Chagas nas Américas, do Sul, Central e parte das Américas do Norte (124).

O fato de habitarem palmeiras e colocarem seus ovos fortemente aderidos aos substratos, constitui uma problemática importante que contribui de forma bastante significativa na epidemiologia da doença de Chagas, as populações nas áreas rurais ao utilizarem as folhas das palmeiras para construir suas casas ou como matéria prima para o trabalho, podem levar a infestação para dentro de casa (125).

Na Venezuela, *R. prolixus* é encontrado em quase todo território nacional, estabelecendo colônias em moradias, correspondendo a 90% dos triatomíneos encontrados no intradomicílio considerado o principal vetor da doença de Chagas (12,126).

1.6.1 *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius robustus*

O gênero *Rhodnius*, é um dos mais estudados, tanto pela importância epidemiológica das espécies que o compõem, quanto em função da difícil diferenciação entre suas espécies, como é o caso das espécies *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius robustus*, dois dos quatro membros do complexo *prolixus* que também inclui *R. neglectus* e *R. nasutus* (28,127).

A classificação dos triatomíneos se baseia principalmente em características morfológicas. Algumas espécies do gênero *Rhodnius* apresentam coloração e características morfológicas semelhantes, o que dificulta a identificação dos exemplares(6). Nos últimos anos o número de taxonomista e técnicos especialistas em identificação de triatomíneos tem diminuído e a disponibilidade de descrições detalhadas não tem solucionado o problema de diferenciação das espécies semelhantes. Algumas ferramentas como a morfometria, citogenética e técnicas de biologia molecular têm sido importantes na identificação de espécies, onde percebe-se uma grande dificuldade na diferenciação de grupos mais complexos (128).

As espécies *R. robustus* e *R. prolixus*, apresentam características morfológicas muito parecidas, entretanto, podem apresentar capacidades vetoriais distintas. Devido a similaridades morfológica entre as duas espécies, durante muito tempo houve discussão quanto a sua distribuição, levando a erros na descrição (12,127).

Rhodnius prolixus é vetor da DC na Venezuela, Colômbia e América central, muito bem adaptado as habitações humanas, sendo um importante vetor no ciclo doméstico do *T. cruzi* (12,127). Enquanto *R. robustus* é vetor no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela, exclusivamente silvestre e relacionado a palmeiras (12,19,127).

Uma das formas para caracterização e distinção de espécies muito próximas morfológicamente é a utilização de marcadores moleculares que avaliam a variação de um determinado gene, porém é um método caro e demorado (129). Nos últimos anos a identificação de espécies utilizando a espectrometria de massa (MALDI-TOF) vem evoluindo, e se mostrando uma técnica eficiente na diferenciação de espécies de triatominae através de perfil proteico, de identificação rápida e com custos mais baixos se comparado com a biologia molecular (130).

1.6.2 *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius robustus* criados no laboratório - FMT-HVD

O Centro de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) foi inaugurado em 2008, com o apoio da FAPEAM, com a proposta de apoio nas atividades de pesquisa, treinamentos, capacitações em Entomologia médica, em vários níveis do conhecimento (131).

Além de espaços para o desenvolvimento de estudos sobre a taxonomia de espécies de insetos das ordens Hemiptera e Diptera. Há também o insetário Dr. Agostinho Cruz Marques, onde são estabelecidas colônias de triatomíneos, anofelinos e outros culicídeos para estudos da doença de Chagas, malária e arboviroses (131).

A colônia de triatomíneos da FMTHVD, foi iniciada há mais de 30 anos e várias espécies já foram utilizadas. Na metade da década de 1990 por doação de FIOCRUZ/RJ, iniciou-se a criação de *R. robustus*, e *R. prolixus*. Nos últimos 10 anos foram acrescentados exemplares de *R. robustus* coletados no campo e por doação, e ambas têm sido utilizadas na realização do exame parasitológico complementar da doença de Chagas nas diferentes fases clínicas, bem como em estudos sobre interação parasito vetor. Destaca-se que no Brasil e particularmente na Amazônia *R. robustus* é uma espécie silvestres e *R. prolixus* coloniza domicílios em países vizinhos, como a Colômbia e Venezuela (12,19,127,131).

1.7 Relevância do Estudo

A Amazônia tem sido o único lugar no mundo, onde se registra maior número de casos da DC na fase aguda. No Amazonas, em menos de 20 anos foram notificados 10 surtos por transmissão oral, e ainda não se tem certeza sobre a forma de contaminação do alimento consumido, principalmente o açaí.

A FMTHVD é uma instituição terciária de saúde, referência na assistência a população acometida com doenças infecciosas e entre elas a DC, tendo através da Gerência de Entomologia da FMT-HVD a responsabilidade pela realização do exame parasitológico complementar de portadores, através do Xenodiagnóstico. Para isso foram estabelecidas a criação de espécies de triatomíneos que além do suporte no xenodiagnóstico são utilizadas em estudos envolvendo a interação parasito-vetor. No entanto, tem se questionado se na colônia de *R. robustus* e *R. prolixus* estão realmente sendo criadas espécies distintas.

Considerando que ambas são espécies com morfologias similares de difícil identificação por métodos convencionais, acredita-se ser de grande relevância estudos sobre a caracterização e distinção das espécies, e assim confirmar a validade taxonômica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a veracidade taxonômica das espécies *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* disponíveis na colônia de Triatomíneos da FMT-HVD.

2.2 Específicos

2.2.1 – Padronizar a técnica MALDI-TOF por meio do perfil lipídico para identificação de espécies de triatomíneos;

2.2.2 – Diferenciar as espécies *R. robustus* e *R. prolixus* através do perfil lipídico;

2.2.3 – Demonstrar parâmetros morfométricos de ovos e adultos;

2.2.4 – Descrever aspectos morfológicos de *R. robustus* e *R. prolixus*.

3. PRODUTO DA DISSERTAÇÃO

Método Lipídico MALDI-TOF-MS para identificação de duas espécies de *Rhodnius* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Izabele de Souza Guimarães^{1,2}; Éder dos Santos Souza²; Wesley Nascimento Guedes³; Rubens Celso Andrade da Silva Junior^{1,2}; Flávio Fé²; Nelson Ferreira Fé²; Maria das Graças Vale Barbosa Guerra^{1,2}

¹Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus, AM, Brasil.

²Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado – FMT/HVD, Manaus, AM, Brasil

³Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, Brasil.

Resumo

A importância médica dos triatomíneos se deve ao fato de todas as espécies serem hematófagas, se inserirem no ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* e transmitirem a doença de Chagas. A competência vetorial desses insetos é variável, e a identificação precisa de espécies com morfologia semelhante é essencial para a vigilância epidemiológica da doença de Chagas, podendo determinar possíveis populações em risco. *Rhodnius prolixus* coloniza domicílios em ambientes urbanos em países vizinhos ao Brasil, e *Rhodnius robustus*, é uma espécie silvestre, encontrada frequentemente em moradias, especialmente em Manaus. Ambas são muito próximas morfologicamente e de difícil identificação taxonômica por método convencional, consideradas espécies crípticas. O objetivo desse estudo foi investigar a validade taxonômica das espécies *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* da colônia de triatomíneos da FMT-HVD. A diferenciação das duas espécies, foi realizada através de observações sobre os aspectos morfológicos usando a microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), e perfil lipídico, por proteômica usando a técnica de MALDI-TOF. Os procedimentos foram realizados na FMTHVD para identificação taxonômica inicial por microscopia óptica, as imagens de MEV foram feitas no Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos (CMABIO/UEA) e a técnica de MALDITOF no Instituto de química da UNESP. A aplicação da técnica lipídica combinada com ferramentas quimiométricas e a taxonomia integrativa como a

microscopia eletrônica de varredura distinguiram com precisão de forma rápida e eficiente quando comparada com outras técnicas para identificação a diferenciação das duas espécies crípticas do gênero *Rhodnius*.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Taxonomia, Vetores, Ferramentas quimiométricas.

INTRODUÇÃO

Triatominae, é uma subfamília de insetos hematófagos, de grande importância médica, por agrupar espécies transmissoras do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), o agente etiológico da doença de Chagas (1). Taxonomicamente, está classificada em 18 gêneros, 5 tribos e 157 espécies (2). A tribo Rhodniini é diversa, com 21 espécies descritas dentro do gênero *Rhodnius* e três dentro de gênero *Psammolestes*, embora a taxonomia de *Rhodnius* seja amplamente estudada, ainda existem controvérsias sobre o número de espécies e suas relações filogenéticas (3–7). Espécies do gênero *Rhodnius* são em sua maioria silvestres, frequentemente ocupando copas de palmeiras ou bromélias epífitas, o gênero é amplamente distribuído na América do Sul e Central e muitas espécies são consideradas vetores primários da doença de Chagas em vários países (8,9).

As espécies *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus*, apresentam características morfológicas muito parecidas, entretanto, podem apresentar capacidades vetoriais distintas. Devido a similaridades morfológica entre as duas espécies, durante muito tempo houve discussão quanto a sua distribuição, levando a erros na descrição (2,10)

Nos insetos, como em outros organismos, os lipídios desempenham diversas funções: São constituintes de estruturas celulares; atuam como hormônios; e formam importantes reservas energéticas, fundamentais em algumas situações de grande demanda metabólica, como voo e produção de ovos (11). Sobre o processo metabólico dos lipídios nos triatominae, Oliveira (12) demonstrou que o vôo exaustivo em *R. prolixus* promove aumento da densidade da lipoforina em relação ao repouso,

causando a diminuição da massa molecular. Diferente de como acontece na espécie *Pantronylus megisto*, em que o voo promove uma diminuição da densidade da lipoforina associada a um aumento do teor lipídico da partícula, proporcionando um exercício prolongado (13–15).

Historicamente, taxonomistas realizam a identificação visual ou observam em microscópio os caracteres morfológicos dos triatomíneos para determinação de espécies. Novas abordagens têm sido usadas ao longo dos anos para diferenciar espécies. Na última década, o perfil proteico MALDI-TOF MS se mostra um método inovador para a determinação específica de diversos vetores de doenças (16–18). Recentemente, o perfil proteico MALDI-TOF MS se mostra uma ferramenta relevante para a identificação (19–21).

Com base na dificuldade em distinguir essas duas espécies e no pouco conhecimento sobre o perfil lipídico do gênero *Rhodnius*, pela primeira vez neste trabalho, avaliamos a eficácia do perfil lipídico por MALDI-TOF MS combinado com ferramentas quimiométricas, para diferenciar espécies semelhantes morfológicamente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Triatomíneos

Os ovos e adultos das espécies *Rhodnius robustus* (Figura 1A) e *Rhodnius prolixus* (Figura 1B) utilizados neste estudo, foram obtidos da colônia de Triatomíneos, mantida no insetário Dr. Agostinho Cruz Marques localizado na Gerência de Entomologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

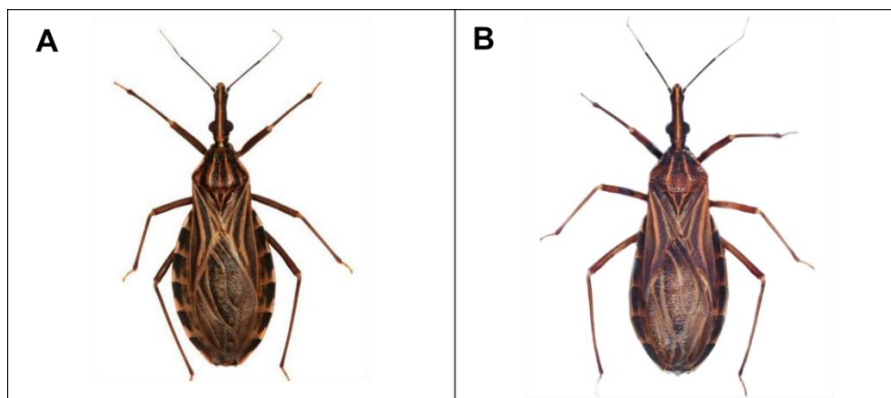


Figura 1. (A) Fêmea de *R. robustus*; (B) Fêmea de *R. prolixus*

Espectrometria de massa MALDI-TOF

Produtos químicos e reagentes MS

Foram utilizados os solventes: acetonitrila (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), metanol (Burdik & Jackson, Muskegon, MI), clorofórmio (Burdik & Jackson, Muskegon, MI) e 2-propanol (Burdik & Jackson, Muskegon, MI); e as soluções: ácido trifluoroacético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e ácido fórmico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

A água ultrapura, utilizada para a preparação dos extratos, foi purificada pelo sistema de água Direct-Q (Millipore, Bedford, MA). Os MALDI-TOF foram: (i) ácido α -ciano-4- hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); (ii) ácido sinapínico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); (iii) 6-aza-2- tiotimina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); (iv) 2,6-dihidroxiacetofenona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); e (v) ácido 2,5-dihidroxibenzóico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Padrões de fosfolipídios; (i) 1 ,2 - dioleoil - sn - glicero - 3 - fosfatidiletanolamina (DOPE); (ii) 1,2 - dimiristoil - sn - glicero - 3 - fosfo - rac - (1 - glicerol) (DMPG); (iii) 1,2 - dipalmitoil - sn - glicero - 3 - sal monossódico de fosfato (DPPA); e (iv) 1,2 - dipalmitoil - sn-glicero - 3 - fosfo - L - sal de sódio da serina (DPPS) foram obtidos da Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Al, EUA).

Preparação de amostras e análise MALDI-TOF

Seis pernas de cada espécime foram removidas com pinças estéreis, adicionadas ao nitrogênio líquido, maceradas manualmente em um cadinho de porcelana e transferidos para microtubo.

Para a extração lipídica foram testadas quatro matrizes MALDI: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA); ácido sinapínico (SA); 6-aza-2-tiotimina (ATT); e 2,6-dihidroxiacetofenona (DHAP). A eficiência da extração lipídica foi testada em quatro protocolos diferentes (Quadro 1) :

Quadro 1. Protocolos utilizados para testar a eficiência da extração lipídica.

Protocolo A: ACN/FA	Suspensão em 100 μ L de FA / ACN a 70% (1:1,v/v); vortexar por 1 min a 1000 RPM; centrifugar a 13.000 x g por 5 min.
Protocolo B: ACN/TFA	Suspensão em 300 μ L de água Milli-Q e 900 μ L de etanol 70%; centrifugar por 2 min a 13.000 RPM; remover excesso de etanol; deixado microtubo aberto em temperatura ambiente por 10 min para evaporar etanol residual; ressuspensão em 100 μ L de 80% de TFA; centrifugar por 30 min a 1000 RPM; adicionar 100 μ L de água Milli-Q e de 150 μ L de ACN; centrifugar a 13.000 RPM por 5 min.
Protocolo C: IPA/FA	Suspensão em 50 μ L de 70% de FA; centrifugar por 30 min a 1000 RPM; adicionar 100 μ L de água Milli-Q e de 50 μ L de IPA; centrifugar a 13.000 x g por 5 min.
Protocolo D: MeOH/FA	suspensão em 50 μ L de 70% de FA; centrifugar por 30 min a 1000 RPM; adicionar 100 mL de água Milli-Q foi e 150 mL de MeOH; centrifugar a 13.000 x g durante 5 min.

Os sobrenadantes de cada um dos protocolos foram adicionados (1 μ L) a placa MALDI-TOF (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha) e secos em temperatura ambiente. Em seguida, 1 μ L de solução de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) foi aplicado sobre a amostra seca e 1 μ L de extrato de proteína DH5-alfa *Escherichia coli* (Bruker-Daltonik GmbH) foi depositado no ponto de calibração da placa para calibração externa. A solução da matriz de CHCA foi preparada na concentração de 50 mg mL⁻¹ em (1:1) ACN/água com 0,1% de TFA, e a matriz de 6-aza-2-tiotimina (ATT) foi preparada em 10 mg mL⁻¹ em (1:1).

Analises de Dados - MALDI-TOF MS

As análises MALDI-TOF MS foram realizadas em um espectrômetro de massa com Bruker Autoflex III, equipado com laser de feixe inteligente de 334 nm alocado no Laboratório de Espectrometria de Massa ThoMSon, do Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Os lipídios/perfis foram adquiridos no modo linear time-of-flight (TOF) e no modo de íons positivos com extração atrasada de 260 ns a 20 kV de tensão de aceleração. Cada espectro foi coletado manualmente como uma média de 5.000 disparos de laser (1.000 disparos de laser em cinco posições diferentes). A energia do laser foi definida logo acima do limite para a produção de íons. Uma faixa de m/z 2.000–20.000 ou m/z 600–1.000 foi usado para a impressão digital lipídica/proteica, respectivamente. Os espectros foram adquiridos em triplicata por meio da ferramenta AutoExecute do software de aquisição Flexcontrol (versão 2.4; Bruker-Daltonik GmbH). A análise dos dados MALDI-TOF MS foi realizada por meio de três etapas distintas: (1) pré-processamento, (2) processamento e (3) análise estatística. Os espectros brutos foram pré-processados no software FlexAnalysis (BrukerDaltonik) após a subtração da linha de base para remoção do fundo, alinhamento da escala do espectro, seleção de íons com relação sinal/ruído (S/N) maior que 3 e normalização das intensidades.

Análise de dados MS usando ferramentas quimiométricas

No pré-processamento dos dados, todos os espectros do MALDI-TOF foram organizados em uma matriz e os dados foram normalizados, corrigidos pela linha de base e centrados na média. Para diferenciar as espécies do gênero *Rhodnius*, o modelo PLS-DA e a Análise de Componentes Principais (PCA) foram calculados usando MATLAB 2014a (The MathWorks Natick, EUA) e PLS Toolbox 8.7.1 da Eigenvector Research, Inc. (Manson, WA, EUA). A seleção das amostras para o conjunto de treinamento (67%) e para o conjunto de validação (33%) foi realizada com o algoritmo de Kennard e Stone (22).

O modelo PLS-DA foi pré-processado usando validação cruzada de blocos contíguos. Os parâmetros sensibilidade e especificidade foram utilizados para

comparar o desempenho da classificação do modelo PLS-DA e o PCA foi utilizado para promover melhor visualização dos dados.

A classificação entre as espécies de *R. prolixus* e *R. robustus* foi realizada por meio do modelo PLS-DA, que é um método de classificação que estabelece uma regressão linear entre uma matriz de variáveis independentes (espectros) e um arranjo de variáveis dependentes. O PLS-DA contém variáveis dummy binárias que indicam a classe à qual cada amostra pertence, onde 1 indica associação e 0 indica nenhuma associação (23). Um limite (entre 0 e 1) é calculado usando estatísticas bayesianas e o valor y é selecionado com base no número mínimo de classificações falsas (24). Assim, valores previstos acima ou abaixo desse limite significam que uma amostra pertence ou não à classe. Neste estudo, o modelo PLS-DA foi calculado relacionando a matriz X de sinais instrumentais do MALDI-TOF com o vetor y de classes amostrais.

Estudo morfológico comparativo de *R. prolixus* e *R. robustus*

Morfometria

Para a mensuração dos espécimes foram utilizados exemplares adultos, machos (15 exemplares) e fêmeas (15 exemplares) e 13 ovos de cada espécie. Para a captura e análise de imagens, foi utilizado microscópio estereoscópio e sistema de análise de imagem Motic Advanced 3.2 plus. Dos adultos foram mensurados: comprimento total do corpo; cabeça; tórax; abdômen; e comprimento dos três segmentos da probóscide. E dos ovos foram mensurados a abertura do opérculo, comprimento e largura. Após o registro das imagens, foram obtidos os pontos de referências (landmarks) seguindo o padrão definido por Jaramillo (8,9).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) utiliza feixe de elétrons que permitem a obtenção de imagens de alta resolução da superfície da amostra. Dos

adultos foram obtidas imagens para análise de aspectos morfológicos da cabeça, tórax e porção final do abdome. Dos ovos foram obtidas imagens do exocório, borda corial e pescoço.

Os triatomíneos foram sacrificados em freezer -4°C , e dissecados em partes da cabeça, sulco estridulatório e ovos. As amostras foram limpas em aparelho de ultrassom, desidratadas em série alcoólica (70%,80%,90%e 100%), secas em estufa a 45° por 20 min e fixados em pequenos cilindros de alumínio (stub). A seguir foram metalizadas por “sputtering” durante dois minutos com potência de 10mA. Após o processo de metalização as amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Topcon JSM IT500-HR, localizado no CMAbio/UEA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração lipídica e Matriz MALDI

Dos quatro protocolos e matrizes testados para avaliar a eficiência da extração lipídica, o protocolo B baseado em Acetonitrila / ácido trifluoroacético (ACN/TFA) (Tabela 1), juntamente com a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) foram os únicos eficientes na extração lipídica.

O modelo PLS-DA foi obtido com 2 variáveis latentes (LVs) que foram escolhidas com base na menor raiz quadrada do erro médio quadrado da validação cruzada (RMSECV), estimada a partir dos resultados obtidos pela validação cruzada leave-one-out. Os 2 LVs obtiveram 94,8% de variância no bloco X, e foram adequados.

Para a validação do modelo PLS-DA, proposto, foram estimados os parâmetros sensibilidade e especificidade dos conjuntos de calibração e validação entre valores de referência e os obtidos com o modelo proposto. Os valores de sensibilidade e especificidade foram adequados, atingindo 100% de classificações corretas para os conjuntos de calibração e validação, indicando que nenhuma amostra foi classificada de forma incorreta.

Para apoiar as informações do modelo PLS-DA e melhorar a visualização dos dados, foi aplicada a ferramenta quimiométrica PCA. A Figura 2A, mostra o gráfico de escores que corresponde às amostras, e o gráfico de cargas (Figura 2B) que corresponde às variáveis de massa em relação à carga (m/z). Os dois primeiros componentes principais (PC) demonstraram 95% da variação total dos dados, onde o PC1 apresentou 84% da variabilidade dos dados e o PC2 11%. A partir da visualização do gráfico de escores (Figura 2A) que corresponde à distribuição das amostras, é possível notar a clara separação entre as amostras de *R. prolixus* (quadrados azuis) e *R. robustus* (quadrados pretos), confirmando a eficiência do Modelo PLS-DA. O gráfico Loading (Figura 2B) mostra que as variáveis responsáveis por separar as amostras de *R. prolixus* e *R. robustus* estão em uma faixa de massa em relação a carga (m/z) de 3600-8600.

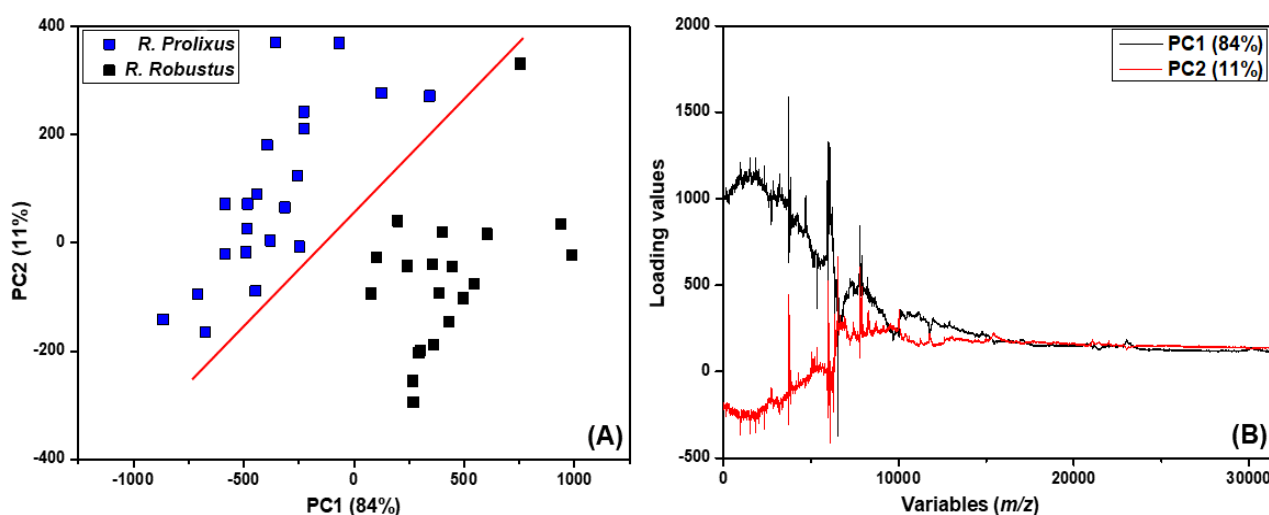


Figura 2. (A) Gráfico de escores que corresponde às amostras; (B) gráfico de cargas que corresponde às variáveis de massa em relação à carga (m/z).

Estudos verificaram que verificaram que através do perfil proteico por MALDI-TOF, as espécies crípticas *R. robustus* e *R. prolixus* resultaram em 100% de identificação correta ao nível de espécie (19–21). Assim como separou e identificou por perfil proteico, espécies pertencentes a quatro gêneros diferentes, e gerou um dendograma onde *R. colombiensis* e *R. pallezensis* se mostraram espécies próximas,

além de confirmar a diferenciação de *R. robustus* e *R. marabaensis* e a similaridade com *R. prolixus* (21).

Os resultados da extração lipídica por MALDI-TOF MS apresentaram excelente capacidade de diferenciação pelo modelo PLS-DA, demonstrando ser uma ferramenta quimiométrica eficiente para diferenciação das espécies de *Rhodnius* estudadas. Assim, corroboram com estudos (19) feitos anteriormente através do perfil proteico utilizando o método MALDI-TOF MS, se mostrando uma metodologia confiável para diferenciar triatomíneos em nível de espécie através do perfil lipídico, feito pela primeira vez neste estudo.

Comparação morfométrica e morfológica das espécies

Quanto ao estudo morfológico dos ovos, no quadro abaixo pode-se observar variações nas comparações entre as duas espécies, sendo que o comprimento é maior em *R. prolixus* ($p < 0,05$), entretanto é mais estreito ($p < 0,05$) e a abertura do opérculo é menor ($p < 0,05$) que de *R. robustus* (Quadro 2, Figuras 3 e 4).

Quadro 2. Comparação morfológica dos ovos de *R. prolixus* e *R. robustus*

Descrição	<i>R. prolixus</i> (Figura 3 e 4A)	<i>R. robustus</i> (Figura 3e 4B)
Comprimento (mm)	Mais longos (1.73 ± 0.02) $p < 0.05$	Pouco mais curto (1.61 ± 0.04)
Largura (mm)	Estreito; formato elipsoide (0.71 ± 0.06)	Mais largo e pouco arredondado (0.93 ± 0.01) $p < 0.05$
Abertura do opérculo (mm)	Menor (0.67 ± 0.01)	Maior (0.73 ± 0.01) $p < 0.05$
Colarinho	Ausente	Ausente
Exocório	Diâmetro dos tubos foliculares grandes; linha limitante circular	Diâmetro dos tubos foliculares pequenos; linha limitante hexagonal

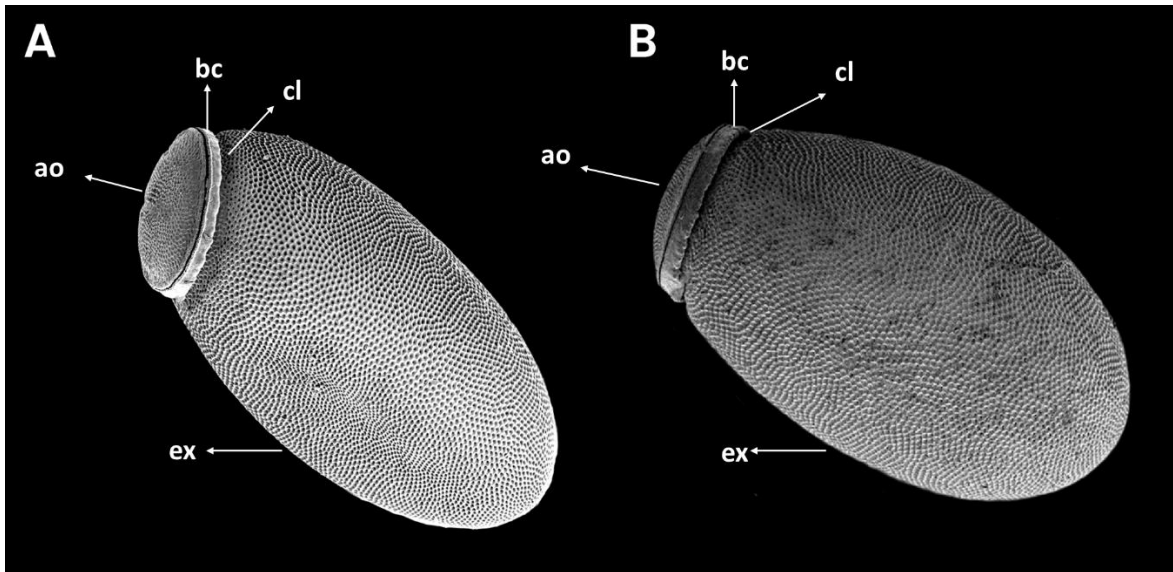


Figura 3. Visão geral do ovo por Microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) *R. prolixus*; (B) *R. robustus*. ex: exocório; bc: borda corial; cl: colo.

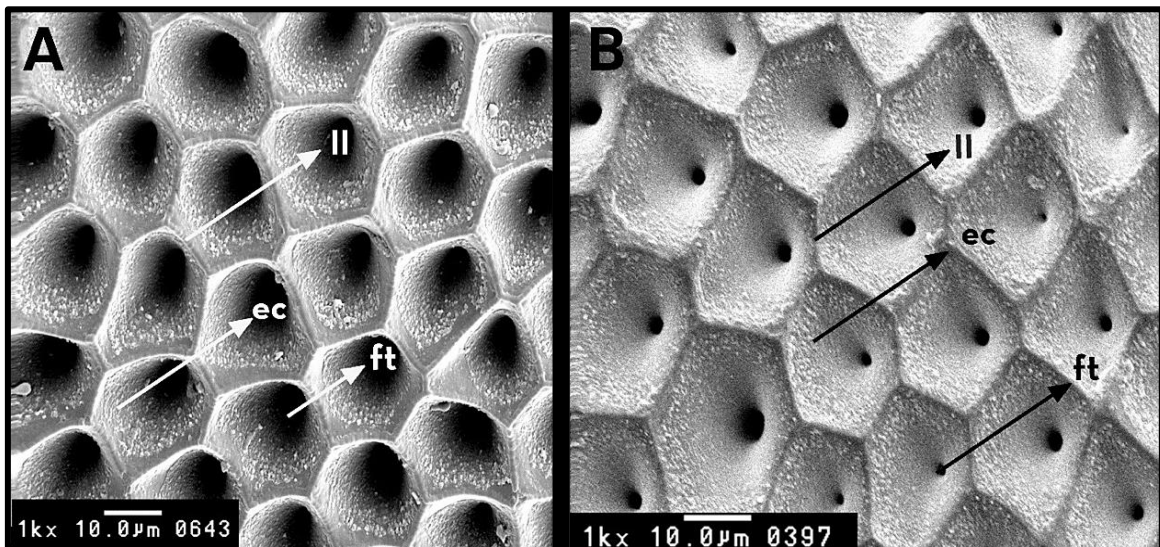


Figura 4. Exocório por MEV. (A) *R. prolixus*; (B) *R. robustus*. ll: linhas limitantes; ec: células hexagonais; ft: tubo folicular.

O estudo da casca dos ovos tem grande importância na diferenciação de espécies, e vários autores tem se preocupado em descrever esses aspectos morfológicos, como Forattini e Barata (25), que descreveram a existência do “colarinho” em ovos da espécie *R. neglectus*, durante estudo comparativo com *R. prolixus*, como podemos observar na figura 3, não há “colarinho”.

As características morfológicas das duas espécies evidenciadas pelo MEV corroboram com a chave dicotômica proposta por Galvão (26), onde mostra que a abertura do opérculo e largura do ovo são maiores em *R. robustus* (Figura 3B), e que o comprimento do ovo (Figura 3A) e o diâmetro do tubo folicular é maior em *R. prolixus* (Figura 4A).

Adultos

Os dados comparativos entre a morfologia dos adultos demonstraram que em vários seguimentos estruturais, a exceção da distância pós-ocular e no diâmetro do olho, a espécie *R. robustus* apresenta medidas maiores que *R. prolixus* (Quadro 2, Figuras 5 e 6).

O estudo de triatomíneos muito próximos morfologicamente é de grande importância por se tratar de espécies vetores da DC, e com hábitos diferentes. A identificação incorreta de *R. robustus* e *R. prolixus* leva a contradições quanto a sua distribuição geográfica e vem sendo discutida ao longo dos anos por vários autores como Jurberg (27), que não considera a presença de *R. prolixus* no Brasil, enquanto que Dias (28), considera a presença do vetor no Amazonas.

Os dados obtidos demonstram que o uso da microscopia eletrônica de varredura (MEV) juntamente com a morfometria, servem como base para a descrição das espécies de *Rhodnius*. Embora devam ser utilizadas abordagens complementares da taxonomia integrativa, assim como sugere o estudo de Schlick-Steiner (29).

A aplicação da técnica lipídica MALDI-TOF MS combinada com ferramentas quimiométricas e a taxonomia integrativa como a microscopia eletrônica de varredura foram capazes de distinguir com precisão duas espécies crípticas do gênero *Rhodnius* que é vetor da doença de Chagas, e que apresentam dificuldades de identificação por características morfológicas. Assim, a metodologia descrita neste artigo pode ser aplicada de forma rápida e eficiente em um grande número de amostras quando comparada com outras técnicas de alta precisão para identificação e diferenciação de

espécies de triatomíneos, apresentando boa reprodutibilidade e robustez, mesmo sem ensaio molecular concomitante.

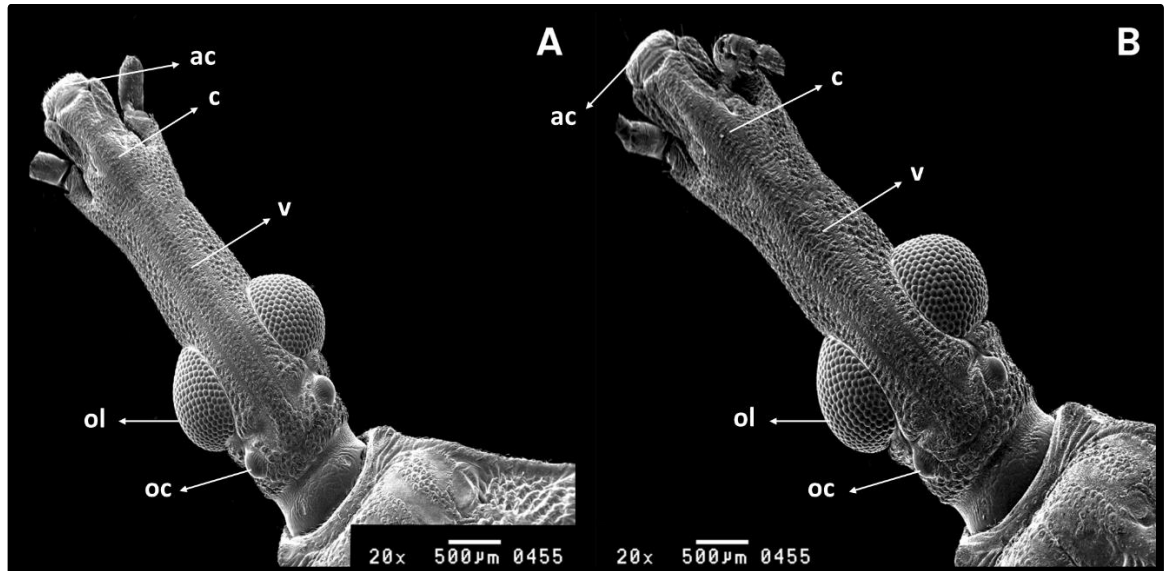


Figura 5. Visão geral da cabeça por MEV. (A) *R. prolixus* (B) *R. robustus*. ac: anteclypeo; c: clípeo; v: vértice; ol: olhos; oc: ocelos.

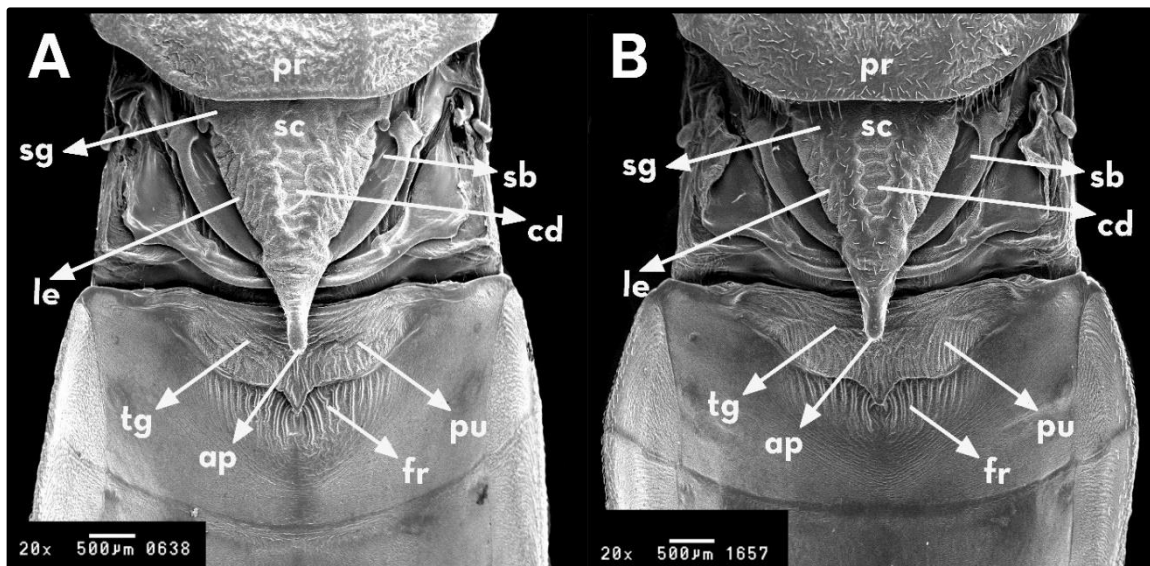


Figura 6. Tórax por MEV. A: *R. prolixus*; B: *R. robustus*. pr: pronoto; sc: escutelo; sb: base de semicircular; sg: espaço glabro; cd: depressão central; le: borda lateral; ap: ápice do escutelo; pu: processo do urotergito I; tg: sulco transversal; fr: franja.

Quadro 3. Comparação morfológica entre adultos de *R. prolixus* e *R. robustus*

	<i>R. prolixus</i> (Fig. 5A)	<i>R. robustus</i> (Fig. 5B)
Cor	Predomina a cor preta	Predomina a cor marrom
Corpo	Macho - 19.97. Fêmea - 20.96	Macho - 20.22 Fêmea - 21.25 p<0,05
Cabeça	Maiores em machos Macho - 3.85 . Fêmea - 3.92 p<0,05	Maiores em fêmeas / Macho – 3.77 Fêmea - 4.10
	Mais granulosa nas laterais; Estreita na porção anterior e ampla na porção posterior; Coloração castanho amarelada com listra dorsal estreita do cílipeo até o pescoço;	Menos granulosa nas laterais; Porção dorsal-longitudinal do cílipeo para o ocelo em forma de quilha; cerca de 2,5 vezes mais larga que o nível dos olhos; ampla na porção anterior, e posterior, estreita na parte medial
Distância interior entre os olhos	Macho – 0.52 Fêmea – 0.52	Macho – 0.63 Fêmea - 0.61
Distância anteocular	Macho - 2.03 Fêmea - 2.23	Macho - 2.23 Fêmea - 2.37
Distância pós-ocular	Macho - 0.90 Fêmea - 0.72	Macho - 0.70 Fêmea - 0.76
Diâmetro do olho	Macho - 1.92 Fêmea - 1.62	Macho - 1.00 Fêmea - 1.62
Comprimento do rosto	Macho – 1° 0.54, 2° 3.23, 3° 0.36 /Fêmea - 1° 0.53, 2° 3.30, 3° 0.37	Macho - 1° 0.91 2° 3.02 3° 0.92 / Fêmea - 1° 0.96 2° 3.31 3° 0.94
Antena (segmentos)	1° segmento é maior em machos Macho - 1°. 0.37 2°. 3.01 3°.2.22 4°. 0.95 Fêmea - 1°. 0.35 2°. 2.87 3°. 1.92 4°. 0.92	2°s, ao 4°s seguimentos maiores em ambos os sexos Macho - 1°. 0.35 2°. 3.26 3°. 2.23 4°. 1.52 Fêmea - 1°. 0.37 2°. 3.17 3°. 2.40 4°. 1.63
Antecílipeo	Plano	Plano
Cílipeo	Indistinguível	
Torax	Mais largo em ambos os sexos	Mais estreito em ambos os sexos
Escutelo	Maior; inclui duas carinas laterais internas proeminentes	Menor; não apresentam carinas proeminentes
Sulco transverso	Não evidente; franja com filamentos curtos e irregulares	Não acentuado; franja com filamentos curtos e retos
Sulco estridulatório	Longo; bem formado	Um pouco estreito
Abdômen	Largura é maior em fêmeas	Largura é maior em machos

Referências

1. Bonney K. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*, 21, 11-20. 2014; Available from: <https://doi.org/10.1051/parasite/2014012>
2. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease [Internet]. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. New York : American Museum of Natural History; 1979 [cited 2021 Nov 2]. 123–520 p. Available from: <https://digitallibrary.amnh.org/handle/2246/1282>
3. Alevi K, de Oliveira J, Garcia A, Cristal D, Delgado L, de Freitas Bittinelli RY, et al. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of argentinian chagas disease vector described based on integrative taxonomy. *Insects*, 11, 830. 2020; Available from: <https://doi.org/10.3390/insects11120830>
4. Galvão C. Taxonomia dos vetores da doença de Chagas da forma à molécula, quase três séculos de história. In: *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores*; Oliveira, J., Alevi, K.C.C., Camargo, L.M.A., Meneguetti, D.U.O., Eds.; *StrictoSensu*: Rio Branco, Brazil, pp. 9–37. 2020;
5. Zhao Y, Galvão C, Cai W. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys*, 1012, 71–93. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3897/zookeys.1012.54779>
6. Stal van C. *Monographie der Gattung Conor hiiiis und Verwandten*. 1859.
7. Bergroth E. A new genus of Reduviidae. *Psyche*, 18, 144-145. 1911;
8. De Paula A, Diotaiuti L, Galvão C. Systematics and biogeography of *Rhodniini* (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. *J. Biogeography*, 34, 699-712. 2007; Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01628.x>
9. Abad-Franch F, Monteiro F, Jaramillo N, Gurgel-Gonçalves R, Dias F, Diotaiuti L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe *Rhodniini* (Triatominae). *Acta Trop.* 110, 159-177. 2009; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.005>
10. Monteiro FA, Barrett T V., Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol.* 2003 Apr 1;12(4):997–1006.
11. Arrese E, Canavoso L, Jouni Z, Pennington J, Tsuchida K, Wells M. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 7-17. 2001; Available from: [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(00\)00102-8](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(00)00102-8)
12. Oliveira G, Baptista D, Guimarães-Motta H, Almeida I, Masuda H, Atella G. Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 62, 164-175. 2006; Available from: <https://doi.org/10.1002/arch.20132>
13. Canavoso L, Stariolo R, Rubiolo E. Flight metabolism in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): the role of carbohydrates and lipids. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98, 909-914. 2003; Available from: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000700009>
14. Canavoso L, Frede S, Rubiolo E. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem Mol. Biol.* 34(8), 845-854. 2004; Available from: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400016>
15. Burmeister H. *Handbuch der Entomologie*. Tome 2, part 1. T.Enslin, Berlin, 400pp. 1835;

16. Dieme C, Yssouf A, Vega-Rúa A, Berenger J, Failloux A, Raoult D, et al. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-14. 2014; Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0544-0>
17. Murugaiyan J, Roesler U. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 184. 2017; Available from: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00184>
18. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiology*, 11, 549-566. 2016; Available from: <https://doi.org/10.2217/fmb.16.5>
19. Laroche M, Bérenger J, Gazelle G, Blanchet D, Raoult D, Parola P. MALDI-TOF MS protein profiling for the rapid identification of Chagas disease triatomine vectors and application to the triatomine fauna of French Guiana. *Parasitology* 145, 665–675. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1017/S0031182017001342>
20. Souza ES, Fernandes R, Galvão C, de Paiva V, da Rosa J. Distinguishing two species of *Cavernicola* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Acta Tropica*, 198, 105071. doi: 10.1016 / j.actatropica.2019.105071. 2019;
21. Souza E, Fernandes R, Guedes W, Dos Santos F, Eberlin M, Lopes N, et al. *Rhodnius* spp. are differentiated based on the peptide/protein profile by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and chemometric tools. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 1431-1439. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02376-y>
22. Kennard R, Stone L. Computer aided design of experiments. *Technometrics* 11:1, 137–48. 1969; Available from: <https://doi.org/10.1080/00401706.1969.10490666>
23. Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* 17, 166-173. 2003; Available from: <https://doi.org/10.1002/cem.785>
24. Brereton R, Lloyd G. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemom.* 28, 213–25. 2014; Available from: <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
25. Forattini OP, Barata JMS. Nota sobre a diferenciação de ovos de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. *Revista de Saúde Pública*, v. 8, p. 447-450. 1974;
26. Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014.
27. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas VD, et al. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas). 2014.
28. Dias JCP, Prata A, Schofield CJohn. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, p. 669-678. 2002;
29. Coura JR, Vias PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010 465:7301 [Internet]. 2010 Jun 23 [cited 2022 Nov 1];465(7301):S6–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature09221>

4. CONCLUSÃO

O protocolo de extração lipídica baseado em Acetonitrila / ácido trifluoroacético (ACN/TFA), juntamente com a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) foram eficientes na extração lipídica por espectrometria de massa MALDI-TOF, e pode ser utilizado de forma eficiente e rápida, na identificação de espécies de triatomíneos.

Os ovos de *R. robustus* tem abertura do opérculo e largura do ovo maiores, mas o comprimento do ovo e o diâmetro do tubo folicular é maior em *R. prolixus*. A principal diferença de tamanhos encontrada em adultos, tanto macho quanto fêmeas, foi no comprimento total do corpo (Maior em *R. robustus*), distância interior entre os olhos (Maior em *R. robustus*) e cabeça (Maior em *R. prolixus*).

Os aspectos morfológicos observados por MEV foram essenciais para diferenciar os ovos das duas espécies, principalmente aspectos do exocório como: o diâmetro dos tubos foliculares grandes e linha limitante circulares em *R. prolixus*; e diâmetro dos tubos foliculares pequenos e linha limitante exagonal em *R. robustus*. Nos adultos as principais diferenças morfológicas são: *R. prolixus* tem cabeça granulosa nas laterais, escutelo inclui duas carinas laterais internas proeminentes e sulco estridulatório apresenta franja com filamentos curtos e irregulares; e *R. robustus* tem cabeça em forma de quilha do clipeo para o ocelo, escutelo não apresentam carinas proeminentes e sulco transversal apresenta franja com filamentos curtos e retos.

5. REFERÊNCIAS

1. Brumpt E. Les entomophthorées parasites des moustiques-Étude critique. Recherches personnelles. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, v. 18, n. 1-2-3, p. 112-144. 1941;
2. Rychman RE. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). The Journal of parasitology, v. 37, n. 5 1, p. 433-434, 1951. 1951;
3. Jurberg J, Silva M, Galvão C, Rocha D, Barbosa H, Carcavallo R. Descrição dos ovos e dos estádios ninfais de *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 vistos através de microscopia óptica e eletrônica de varredura (Hemiptera, Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, p. 209-216. 2002;
4. Pinto C. Classificação dos Triatomídeos (hemípteros-heteropteros hematofagos). Sciencia méd, v. 4, p. 485-490. 1926.
5. Jeannel R. Insectes Hémiptères, iii. Hencocephalidae et Reduviidae. In: Voyage de Ch.Alluaud et R.Jeannel en Afrique orientale (1911-1912), pp. 131-314. 1919;
6. Stal van C. Monographie der Gattung *Conor hiii* und Verwandten. 1859.
7. Laporte FL. Essai d'une classification systematique de l'ordre des Hémiptères (Hémiptères, Hétéroptères, Latr.). Magazine de Zoologie, 1, 1-88 (plus supplement). 1832;
8. Berg C. Hemiptera Argentina enumeravit speciesque novas. P.E.Coni, Buenos Aire, 316 pp. 1879;
9. Brener Z. *Typanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. Scielo Books. p. 24–31. 1997;
10. Gállego Berenguer J. Manual de Parasitología: Morfología y Biología de los parásitos de interés sanitario. Barcelona EU, organizador. p.148–164. 2006;
11. Andrade S. Biodemas, zimodemas e esquizodemas: sua relação com a patologia da doença de Chagas. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias- volume 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 621-37. 2005;
12. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease [Internet]. Bulletin of the American Museum of Natural History. New York : American Museum of Natural History; 1979 [cited 2021 Nov 2]. 123–520 p. Available from: <https://digitallibrary.amnh.org/handle/2246/1282>
13. Jurberg J, Galvão C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. 2006 [cited 2022 Nov 26];1095–116. Available from: www.biologiezentrum.at
14. De Geer C. Memoires pour servir a l'histoire des insectes. Tome III. Pierrer Hesselberg, Stockholm. 696 pp. 1773;
15. Distant W. The Fauna of British India, including Ceylon and Burma. Rhynchota. Vol. 2. Taylor & Francis, London, 503pp. 1904;
16. Burmeister H. Handbuch der Entomologie. Tome 2, part 1. T.Enslin, Berlin, 400pp. 1835;
17. Klug J. In: Meyen, F.J.F. Reise um die Erde, in den Jahren 1830, 1831, und 1832, ausgeführt von F.J.F.Meyen. C.W.Eichhoff, Berlin. 1834;
18. Latreille P. Insectes de l'Amérique recueillis pendant le voyage de MM. de Humboldt et Bonpland. In: Humboldt A. & Bonpland A. Voyage aux régions équinoxiales du nouveau continent. Vol.1 pp.197-397. Paris. 1811;

19. Galvão C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014.
20. Goddard J. Public health entomology. CRC Press. 2022;
21. Martínez A, Carcavallo R. Un nuevo Triatominae neotropical (Hemiptera: Reduviidae). Folia Entomologica Mexicana, 38, 109-118. 1977;
22. Prosen A, Martínez A. Un nuevo género y especie de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). MEPRA Publicación, 23, 5-12. 1952;
23. Lent H. Novo transmissor da doença de Chagas na cidade de Rio de Janeiro, D.F. Estudo dos gêneros *Belminus* Stål, 1859, *Bolboder* Valdés, 1910 e descrição de *Parabelminus carioca* n.g., n.sp. (Hemiptera, Triatomidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 38, 497-516. 1943;
24. Bergroth E. A new genus of Reduviidae. Psyche, 18, 144-145. 1911;
25. Deane M, Lenzi H, Jansen A. Trypanosoma cruzi: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 79(4):513-5. 1984;
26. Stål C. Enumeratio Hemipterorum. Pars 2. Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Handlingar, 10, 1-159. 1872;
27. Jeannel R. Diagnoses préliminaires de Trechinae [Col. Carabidae] cavernicoles nouveaux de France. Bulletin de la Société entomologique de France, v. 24, n. 14, p. 253-255. 1919;
28. Galvão C. A sistemática dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. Entomol Vect. 2003;10(4):511–30.
29. Dujardin J, Schofield C, Panzera F. Les vecteurs de la maladie de Chagas: recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie royale des sciences d'outre-mer. 2000;
30. Fresquet N, Lazzari CR. Daily variation of the response to heat in *Rhodnius prolixus*: The roles of light and temperature as synchronisers. J Insect Physiol. 2014 Nov 1;70:36–40.
31. Carcavallo R, Rodriguez M, Salvatella R, Casas S, Sherlock I, Galvão C, et al. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. 1998;1109–1109.
32. Canale M, Jurberg J, Carcavallo R, Galvão C, Galíndez Giron I, Mena Segura C. Bionomics of some species. In: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H, editores. Atlas of Chagas Disease Vectors in the America. Rio de Janeiro: Fiocruz. p. 839-890. 1999;
33. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909 Aug;1(2):159–218.
34. Jader de Oliveira, Kaio Cesar Chaboli Alevi Luís, Marcelo Aranha Camargo, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti. Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores [Internet]. Rio Branco, Acre; 2020. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/341997195>
35. Uhler P. Observations upon the Heteropterous Hemiptera of Lower California, with description of new species. Proceedings of the California Academy of Science (series 2), 4, 223-295. 1894;
36. Barata JMS. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae: II- Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera-Reduviidae). Revista de Saúde pública, v. 15, p. 490-542. 1981;
37. Barata J. Macroscopic and exocorial structures of Triatominae eggs (Hemiptera, Reduviidae). Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, v. 2, p. 409-448. 1998;

38. Carcavallo R, Barata J, Costa A, Serra O. *Alberprosenia malheiroi* Serra, Atzingen & Serra, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). Redescricao e bionomia. *Rev Saude Publ* 29: 485-495. 1995;
39. Jurberg J, Fagundes L, Barth O. Estudo morfológico de ovos e ninfas de *Dipetalogaster maxima* (Uhler, 1894) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Rev Brasil Biol* 53: 269-283. 1993;
40. Galíndez Girón I. Morfologia e anatomia externa. In: Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas. p. 53-73. 1998;
41. Lent H, Jurberg J. Lent, H; Jurberg, J. On the genus *Psammolestes*, with a study of the genitalia of the species. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 25, n. 4, 1965. 1965;
42. Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas VD, et al. Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas). 2014.
43. Galvão C, Rocha DDS, Jurberg J, Carcavallo R. Início da atividade de vôo em *Triatoma infestans* (Klug, 1834) e *T. melanosoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 137-140. 2001;
44. Malafaia G, de Lima Rodrigues AS. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(5):483–5.
45. Coutinho M, Dias J. A descoberta da doença de Chagas. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*. 1999;16(2):11–51.
46. Chagas Filho C. Histórico sobre a doença de Chagas. Doença de Chagas por um grupo de colaboradores especializados. Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1968;5–21.
47. World Health Organization (WHO). WHO. 2022 [cited 2022 Oct 31]. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
48. Westphalen EVN, Bisugo M da C, de Araújo M de FL. Aspectos epidemiológicos e históricos do controle da doença de Chagas no Continente Americano. *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 9, n. 105, p. 17-34. 2012.
49. World Health Organization (WHO). Integrating Neglected Tropical Diseases into Global Health and Development: Fourth WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Geneva: World health organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. WHO. 2017;
50. Coura JR, Vias PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010 465:7301 [Internet]. 2010 Jun 23 [cited 2022 Nov 1];465(7301):S6–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature09221>
51. Briceño-León R. Chagas disease in the Americas: an ecohealth perspective. *Cad Saude Publica*. 2009;25(SUPPL. 1):S71–82.
52. Organización Panamericana de la Salud (OPS). XV Reunión de la Comisión Intergubernamental para la eliminación del *Triatoma Infestans* y la Interrupción de la Tripanosomiasis Americana Transfusional. INCONSUR. 2006;
53. Ventura-Garcia L, Roura M, Pell C, Posada E, Gascó J, Aldasoro E, et al. Socio-Cultural Aspects of Chagas Disease: A Systematic Review of Qualitative Research. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;
54. Tatto E, Padilha E, Fernandes S. Doença de Chagas Aguda. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento – Guia de consulta rápida para profissionais de saúde. *Rev Pat Trop* 36: 1-32. 2007;

55. de Oliveira G, Ribeiro M, Castro G de S, Menezes A, Lima R, Silva R. Retrospective study of the epidemiological overview of the transmission of Chagas disease in the State of Acre, South-Western Amazonia, from 2009 to 2016. *J Hum Growth Dev.* 28(3):329–36. 2018;
56. Kardec A, Galardo R, Cristina K, Cardoso I. Estudo epidemiológico do comportamento da doença de Chagas no estado do Amapá-Brazil nos anos de 2016 a 2021 Epidemiologic study about Chagas disease in Amapá State Brazil in the years 2016 at 2021 Estudio epidemiológico del comportamiento de la enfermedad. 2022(Cd):2016–23. 2022;
57. Madeira F, de Jesus A, da Silva Moraes M, Barroso N, de Souza Castro G, Ribeiro M. Chagas Disease in the Western Brazilian Amazon: Epidemiological Overview from 2007 to 2018. *J Hum Growth Dev.* 31(1):84–92. 2021;
58. Carvalho E de, Rosa J da, Carvalho A de, Chaves H, Souza E de, Ostermayer A. Study on Chagas disease occurrence in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 44(6):703–7. 2011;
59. Monteiro W, Magalhães L, Santana F, Borborema M, Silveira H, Vale Barbosa M das G. Short Communication *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 genotype as agent of an outbreak of Chagas disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop Med Int Heal.* 15(9):1049–51. 2010;
60. Coura J, Junqueira A, Bóia M, Fernandes O, Bonfante C, Campos J. Chagas disease in the Brazilian Amazon. IV. A new cross-sectional study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 44(3):159–65. 2002;
61. Belém E, Shaw J, Lainson R. Considerações Sobre a Epidemiologia Dos Primeiros Casos Autóctones De Doença De Chagas Registrados. (1):1–5. 1969;
62. Chagas C. Infection naturelle des singes du Para (*Chrysothrix sciureus* L), par *Trypanosoma cruzi*. In: Sociedade Brasileira de Biologia. São Paulo. 1924;
63. Marcondes CB. Entomologia médica e veterinária. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2011 Dec [cited 2021 Nov 24];53(6):308–308. Available from: <http://www.scielo.br/j/rimtsp/a/6Fdcr7jffDw7Nmz4Zh96Ycx/?lang=pt>
64. Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(SUPPL. 1):47–56.
65. Monteiro M. Resposta imunológica celular de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius prolixus* á infecção por linhagens de *trypanosoma cruzi* TCI e TCIV. Dissertação de Mestrado do Programa de pós-Graduação em Medicina Tropical. 2022;
66. Ferraroni JJ, Nunes De Melo JA, Camargo ME. Moléstia de Chagas na Amazônia Ocorrência de seis casos suspeitos, autóctones sorologicamente positivos. *Acta Amaz.* 1977;7(3):438–40.
67. Coura JR, Junqueira AC. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(2):145–54.
68. Souza E, Monte G, Paiva V, Galvão C. *Microtriatoma trinidadensis* (Lent, 1951)(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): first record in the state of Amazonas, Brazil. Volume 15, Número 5, Pags. 905-909. 2019;
69. França M, Frade J, Konasugawa K, Almeida F. Doença de Chagas - primeiro caso autóctone na Amazônia Ocidental - Amazonas - Brasil. *Acta Amaz.* 1980;10(4):759–62.
70. Magalhães L, Silveira H, Prestes S, Costa Magalhães L, Santana R, Ramasawmy R, et al. Bioecological aspects of triatomines and marsupials as

- wild *Trypanosoma cruzi* reservoirs in urban, peri-urban and rural areas in the Western Brazilian Amazon. *Med Vet Entomol* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Nov 14];35(3):389–99. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mve.12507>
71. Magalhães BML, Coelho LIARC, Maciel MG, Ferreira JM BB, Umezawa ES, Coura JR, et al. Serological survey for Chagas disease in the rural areas of Manaus, Coari, and Tefé in the Western Brazilian Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2011 Nov [cited 2022 Nov 14];44(6):697–702. Available from: <http://www.scielo.br/j/rsbmt/a/cmXKtstWjPpRmBYpcdZvKg/abstract/?lang=en>
 72. Monteiro W. Bases do diagnóstico microscópico da malária. 2020;
 73. Souza D. Transmissão oral do *Trypanosoma cruzi*: Histórico dos surtos da doença de Chagas no estado do Amazonas. Dissertação de Mestrado do Programa de pós-Graduação em Medicina Tropical. 2019;
 74. Vanina Ortiz J, Valessa B, Pereira M, Do K, Couceiro N, Hosannah Da Silva E Silva MR, et al. Cardiac Evaluation in the Acute Phase of Chagas' Disease with Post-Treatment Evolution in Patients Attended in the State of Amazonas, Brazil. 2018;
 75. Santana RAG, Magalhães LKC, Magalhães LKC, Prestes SR, Maciel MG, Da Silva GAV, et al. *Trypanosoma cruzi* strain Tc1 is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors* [Internet]. 2014 Jun 11 [cited 2022 Nov 14];7(1):1–7. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-267>
 76. Guerra M das GVB, Guerra JA de O. Doença de Chagas: aspectos gerais, emergência na Amazônia e orientações sobre o atendimento de pacientes no estado do Amazonas, Brasil. 2021;
 77. Barrett T, Arias J. Barrett, T.V. & Arias, J.R. (1985) A new triatomine host of *Trypanosoma cruzi* from the Central Amazon of Brasil: *Cavernicola lenti* n.sp. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80, 91-96. 1985;
 78. Barber H. A new bat-cave bug from Panama (Hemiptera-Heteroptera, Reduviidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 39, 60-63. 1937;
 79. Walker F. *Monographia Chalcidum*. *Entomologist's Magazine*, v. 4, p. 349-461. 1837;
 80. Champion G. *Insecta Rhynchota*. Hemiptera-Heteroptera. In: *Biologia Centrali-Americana*. London. vol.II, 416 pp. 1899;
 81. Almeida F, Santos E, Sposina G. Triatomíneos da Amazonia III. *Acta Amazônica* 3, 43-66. 1973;
 82. Matta A. Um novo Reduvido do Amazonas, *Rhodnius brethesi* n.sp. *Amazonas Médico*, 2, 93-94. 1919;
 83. Sherlock I, Guitton N, Miles M. *Rhodnius paraensis* espécie nova do Estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Acta Amazônica*, 7, 71-74. 1977;
 84. Lent H, Jurberg J. Estudo morfológico comparativo de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e suas genitálias externas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). 1968;
 85. Lent H, Jurberg J. The genus *Panstrongylus* Berg, 1879, with a study of the external genitalia of the species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista brasileira de biologia*. 1975;

86. Lent H, Jurberg J, Carcavallo RU. *Belminus laportei* sp. n. da região Amazônica (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 33-39. 1995;
87. Mejia JM, Galvão C, Jurberg J. *Rhodnius colombiensis* sp. n. da Colombia com quadros comparativos entre as estruturas fálicas do gênero *Rhodnius* Stal 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). 1999;
88. Jurberg J, Silva M, Galvão C, Rocha D, Barbosa H, Carcavallo R. Descrição dos ovos e dos estádios ninfais de *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 vistos através de microscopia óptica e eletrônica de varredura (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 209-216. 2002;
89. Costa J, Barth O, Marchon-Silva V, Almeida C, Freitas-Sibajev M, Panzera F. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) genital structures and eggs of different chromatic forms. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 493-498. 1997;
90. Carcavallo R, Otero M, Tonn R, Ortega R. Notes on the biology, ecology and geographical distribution of *Psammolestes arthuri*. Description of the pre-imago stages. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental*, v. 15, n. 5, p. 231-239. 1975;
91. Carcavallo R, Justus N, Martínez A. Descripción de las ninfas de II, III y IV estadio de *Alberprosenia goyovargasi* Martínez & Carcavallo, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Observaciones com microscopia eletrônica de barrido. *Bol Dir Malariol San Amb*, v. 18, p. 132-131. 1978;
92. Galvão A, Fuentes F. Descrição das ninfas de *Triatoma williami* (B. Galvão & col., 1965) e *T. deanei* (B. Galvão & col., 1967)(sic). *Rev Goiana Med*, v. 17, p. 141-145. 1971;
93. Costa J, Jurberg J, Barth M. Estudos morfológicos de *Cavernicola lenti* Barrett & Arias, 1985 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 247-263. 1991;
94. Jurberg J, Galvão C, Barth O. Estudo morfológico de ovos e ninfas de *Triatoma nitida* Usinger, 1939 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). 1991;
95. Jurberg J, Lima M, Rocha D, Carcavallo R, Galvão C. Descrição de ovos e ninfas de *Triatoma melanosoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo, 1987 (Hemiptera, Reduviidae). 1998;
96. Carcavallo R, Casas S, Sherlock ÍRDA, Girón I, Jurberg J, Galvão C, et al. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. *Fiocruz*. 1999;
97. Rocha D, Jurberg J, Carcavallo R, Cunha V, Galvão C. Influência da temperatura e umidade na biologia de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, p. 357-363. 2001;
98. Da D, Rocha S, Jurberg J, Carcavallo RU, Presgrave OA, Cunha V, et al. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento ninfal de *Rhodnius robustus** Influence of temperature and humidity on the nymphal development of *Rhodnius robustus*. *Rev Saúde Pública* [Internet]. 2001 [cited 2022 Nov 29];35(4):400–6. Available from: www.fsp.usp.br/rsp
99. Almeida C, Francischetti C, Pacheco R, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843)(Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 367-372. 2003;
100. Lent H, Jurberg J, Galvão C, Carcavallo R. *Triatoma melanosoma*, novo status para *Triatoma infestans melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo, 1987

- (Hemiptera: Reduviidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 89, p. 353-358. 1994;
101. Martínez A, Carcavallo R, Jurberg J. *Triatoma gomeznunezi* a new species of Triatomini from Mexico (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores*, v. 1, p. 15-19. 1994;
 102. Carcavallo R, Galíndez Girón I, Martínez A. *Panstrongylus chinai* (Del Ponte, 1929), new species of Triatomini for the entomofauna of Venezuela (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores*, v. 1, n. 6, p. 195-199. 1994;
 103. Catalá S, Schofield C. Antennal sensilla of *Rhodnius*. *Journal of Morphology*, v. 219, n. 2, p. 193-203. 1994;
 104. Catalá SS. Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): a comparative study of five genera. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, v. 26, n. 2, p. 67-73. 1997;
 105. Catala S, Tomasi V, Hliba E, Rovasio R. The cave organ in Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) antennae: an olfactory receptor?. *Biocell-Mendoza-*, v. 22, p. 1-8. 1998;
 106. Silva M, Barbosa H, Jurberg J, Galvão C, Carcavallo R. Comparative ultrastructural analysis of the antennae of *Triatoma guazu* and *Triatoma jurbergi* (hemiptera: Reduviidae) during the nymphal stage development. *Journal of medical entomology*, v. 39, n. 5, p. 705-715. 2002;
 107. Da Rosa JA. Head morphology of 1st and 5th instar nymphs of *Triatoma circummaculata* and *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, v. 28, n. 4, p. 363-375. 1999;
 108. Da Rosa JA. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Saúde pública*, v. 34, n. 5, p. 538-542. 2000;
 109. Da Rosa JA. Study of the external female genitalia of 14 *Rhodnius* species (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) using scanning electron microscopy. *Parasites & vectors*, v. 7, n. 1, p. 1-10. 2014;
 110. Galíndez Girón I, Valderrama A, Añez N, Márquez V, Torres E, Madrid S, et al. Algunos estudios morfométricos en los Triatominae. I. *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol Vect*, v. 1, p. 99-111. 1994;
 111. Galíndez Girón Itamar. Algunos estudios multivariados aplicados a la Sistemática y Ecología de la Subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), con énfasis en *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 y *Rhodnius robustus* Larrousse, Tese de Doutorado. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 1999;
 112. Dujardin J, Bermudez H, Casini C, Schofield C, Tibayrenc M. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, v. 34, n. 5, p. 544-551. 1997;
 113. Matias A. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 947-950. 2001;
 114. Santos C, Jurberg J, Galvão C, Rocha D, Fernandez J. Estudio morfométrico do gênero *Panstrongylus* Berg, 1879 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 939-944. 2003;
 115. Noireau F. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 94, n. 1, p. 23-27. 2000;

116. Monteiro F, Lazoski C, Noireau F, Solé-Cava A. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini, showing paraphyly of Rhodnius including Psammolestes. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 16, n. 1, p. 83-90. 2002;
117. Almeida C, Duarte R, Nascimento R, Pacheco R, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843)(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 1127-1131. 2002;
118. Panzera F, Pérez R, Hornos S, Panzera Y, Cestau R, Delgado V, et al. Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, p. 515-518. 1996;
119. Pérez R, Hernández M, Rose V, Calleros L, Panzera F. Citotaxonomía y evolución cromosómica en Triatominae, insectos vectores de la enfermedad de Chagas (heteropterareduviidae). *Entomology Vector*, v. 10, p. 543-550. 2003;
120. Alevi KCC, da Rosa JA, Oliveira MTV de A. Mini review: karyotypic survey in Triatominae subfamily (Hemiptera, Heteroptera). *Entomology, Ornithology & Herpetology*. 2013;
121. Alevi K, Ravazi A, Mendonça V, Rosa J, Azeredo-Oliveira M. Karyotype of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Triatominae). *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 1, p. 222-226. 2015;
122. da Rosa J, Justino H, Nascimento J, Mendonça V, Rocha C, de Carvalho D, et al. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, reduviidae, triatominae). *ZooKeys*, n. 675, p. 1. 2017;
123. Barata JMS, Urbinatti P. Characterization of the urotergite process in *Rhodnius nasutus* stal, 1859 and *rhodnius robustus* Larrousse, 1927 through scanning electron microscopy and optic microscopy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 2 supl., p. 326. 1998;
124. Lima M, Sarquis O. *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae) está mudando seu habitat como conseqüência da atividade humana?. *Pesquisa em Parasitologia*, v. 102, n. 4, p. 797-800. 2008;
125. Weissenbacher M, Salvatella R, María Hortal De Peluffo. El desafío de las enfermedades emergentes y reemergentes. *Rev. Med. Urug*, p. 34-48. 1998;
126. Chaves LF, Añez N. Geometría de las células del exocorion de huevos de *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859)(Heteroptera: Reduviidae). *Entomotropica*, v. 18, n. 1, p. 1-5. 2003;
127. Monteiro FA, Barrett T V., Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol*. 2003 Apr 1;12(4):997–1006.
128. Pavan M, Monteiro F. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Tropical Medicine & International Health*, v. 12, n. 6, p. 751-758. 2007;
129. Lyman D, Monteiro F, Escalante A. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, p.377-386. 1999;
130. Souza É dos S. Caracterização de espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) pelo método MALDI-TOF-MS. 2020;
131. Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado - FMT/HVD [Internet]. [cited 2022 Dec 26]. Available from: <http://www.fmt.am.gov.br/layout2011/diretoria/quemsomos.asp>

132. Bonney K. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*, 21, 11-20. 2014; Available from: <https://doi.org/10.1051/parasite/2014012>
133. Alevi K, de Oliveira J, Garcia A, Cristal D, Delgado L, de Freitas Bittinelli RY, et al. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): a new species of argentinian chagas disease vector described based on integrative taxonomy. *Insects*, 11, 830. 2020; Available from: <https://doi.org/10.3390/insects11120830>
134. Galvão C. Taxonomia dos vetores da doença de Chagas da forma à molécula, quase três séculos de história. In: *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores*; Oliveira, J., Alevi, K.C.C., Camargo, L.M.A., Meneguetti, D.U.O., Eds.; StrictoSensu: Rio Branco, Brazil, pp. 9–37. 2020;
135. Zhao Y, Galvão C, Cai W. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys*, 1012, 71–93. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3897/zookeys.1012.54779>
136. De Paula A, Diotaiuti L, Galvão C. Systematics and biogeography of Rhodniini (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. *J. Biogeography*, 34, 699-712. 2007; Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01628.x>
137. Abad-Franch F, Monteiro F, Jaramillo N, Gurgel-Gonçalves R, Dias F, Diotaiuti L. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* 110, 159-177. 2009; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.005>
138. Arrese E, Canavoso L, Jouni Z, Pennington J, Tsuchida K, Wells M. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 7-17. 2001; Available from: [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(00\)00102-8](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(00)00102-8)
139. Oliveira G, Baptista D, Guimarães-Motta H, Almeida I, Masuda H, Atella G. Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol*, 62, 164-175. 2006; Available from: <https://doi.org/10.1002/arch.20132>
140. Canavoso L, Stariolo R, Rubiolo E. Flight metabolism in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): the role of carbohydrates and lipids. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98, 909-914. 2003; Available from: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000700009>
141. Canavoso L, Frede S, Rubiolo E. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Biochem Mol. Biol.* 34(8), 845-854. 2004; Available from: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000400016>
142. Dieme C, Yssouf A, Vega-Rúa A, Berenger J, Failloux A, Raoult D, et al. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-14. 2014; Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0544-0>
143. Murugaiyan J, Roesler U. MALDI-TOF MS profiling-advances in species identification of pests, parasites, and vectors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 184. 2017; Available from: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00184>
144. Yssouf A, Almeras L, Raoult D, Parola P. Emerging tools for identification of arthropod vectors. *Future Microbiology*, 11, 549-566. 2016; Available from: <https://doi.org/10.2217/fmb.16.5>

145. Laroche M, Bérenger J, Gazelle G, Blanchet D, Raoult D, Parola P. MALDI-TOF MS protein profiling for the rapid identification of Chagas disease triatomine vectors and application to the triatomine fauna of French Guiana. *Parasitology* 145, 665–675. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1017/S0031182017001342>
146. Souza ES, Fernandes R, Galvão C, de Paiva V, da Rosa J. Distinguishing two species of *Cavernicola* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Acta Tropica*, 198, 105071. doi: 10.1016 / j.actatropica.2019.105071. 2019;
147. Souza E, Fernandes R, Guedes W, Dos Santos F, Eberlin M, Lopes N, et al. *Rhodnius* spp. are differentiated based on the peptide/protein profile by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and chemometric tools. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 1431-1439. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02376-y>
148. Kennard R, Stone L. Computer aided design of experiments. *Technometrics* 11:1, 137–48. 1969; Available from: <https://doi.org/10.1080/00401706.1969.10490666>
149. Barker M, Rayens W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* 17, 166-173. 2003; Available from: <https://doi.org/10.1002/cem.785>
150. Brereton R, Lloyd G. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemom.* 28, 213–25. 2014; Available from: <https://doi.org/10.1002/cem.2609>
151. Forattini OP, Barata JMS. Nota sobre a diferenciação de ovos de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. *Revista de Saúde Pública*, v. 8, p. 447-450. 1974;
152. Dias JCP, Prata A, Schofield CJohn. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, p. 669-678. 2002;

6. ANEXOS

6.1 Dados morfométricos detalhados de ovos e adultos de *R. robustus* e *R. prolixus*

Tabela 1. Média de mensuração (mm) de 13 ovos de *R. prolixus* e *R. robustus*.

	<i>R. prolixus</i>	<i>R. robustus</i>
C (mm)	1.73 ± 0.02 ^b	1.61 ± 0.04 ^c
L (mm)	0.71 ± 0.06 ^b	0.93 ± 0.01 ^c
Ao (mm)	0.67 ± 0.01 ^b	0.73 ± 0.01 ^c



C: comprimento (40x); L: largura (40x); Ao: abertura do opérculo (80x); a,b,c: letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies. Tukey: $p < 0,05$.

Tabela 2. Média de mensuração (mm) de fêmeas e machos de *R. prolixus* e *R. robustus*.

	Machos		Fêmeas	
	<i>R. prolixus</i>	<i>R. robustus</i>	<i>R. prolixus</i>	<i>R. robustus</i>
CT	19.97 ^b	20.22 ^c	20.96 ^b	21.25 ^c
CC	3.85 ^b	3.77 ^c	3.92 ^b	4.10 ^c
DIO	0.52 ^b	0.63 ^a	0.52 ^b	0.61 ^c
DA	2.03 ^b	2.23 ^c	2.23 ^b	2.37 ^c
DP	0.90 ^b	0.70 ^c	0.72 ^b	0.76 ^c
DO	1.92 ^b	1.00 ^c	1.62 ^b	1.62 ^c
R1	0.54 ^b	0.91 ^c	0.53 ^b	0.96 ^c
R2	3.23 ^b	3.02 ^c	3.30 ^b	3.31 ^c
R3	0.36 ^b	0.92 ^c	0.37 ^b	0.94 ^c
LMT	4.60 ^b	4.05 ^c	4.81 ^b	4.10 ^c
LMA	5.90 ^b	6.01 ^c	6.72 ^b	6.52 ^c
A1	0.37 ^b	0.35 ^c	0.35 ^b	0.37 ^c
A2	3.01 ^b	3.26 ^c	2.87 ^b	3.17 ^c
A3	2.22 ^b	2.23 ^c	1.92 ^b	2.40 ^c
A4	0.95 ^b	1.52 ^c	0.92 ^b	1.63 ^c

CC: comprimento da cabeça; DIO: distância interior entre os olhos; DA: distância antecular; DP: distância pós-ocular (excluindo pescoço); DO: diâmetro do olho; R1, R2 e R3: comprimentos do primeiro, segundo e terceiro rostral; CT: comprimento total dos triatomíneos; LMT: largura máxima do tórax; LMA: largura máxima do abdômen; A1, A2, A3 e A4: 1º, 2º, 3º, e 4º segmento antenal, respectivamente; a,b,c: letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies. Tukey: $p < 0,05$. Os valores em negrito indicam os principais achados.

6.2 Procedimento operacional padrão para a criação de triatomíneos em laboratório

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
TÍTULO: Criação de triatomíneos em laboratório		
Elaborado por: Emily de Sousa Moura Rubens Celso Andrade da Silva Júnior Layla Magalhães Matheus Martins Monteiro Sílvia Justiniano	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	Data de aplicação: 01/03/2021
		Data da próxima revisão:

1. **OBJETIVOS**
Descrever os procedimentos para criação de triatomíneos em colônia para uso laboratorial
2. **DEFINIÇÕES**
Não se aplica
3. **APLICÁVEL A**
Criação de triatomíneos para estudo de comportamento e uso laboratorial
4. **RESPONSABILIDADES**
Gerente da unidade, pessoal técnico e alunos
5. **POP'S RELACIONADOS**
Não se aplica
6. **EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO**
 - 6.1. Luva
 - 6.2. Jaleco descartável
 - 6.3. Mascara
 - 6.4. Sapato fechado
7. **RECURSOS NECESSÁRIOS**
 - 7.1. **Materiais**
 - 7.1.1. Pinças entomológicas
 - 7.1.2. Escovinha
 - 7.1.3. Bandejas plásticas
 - 7.1.4. Potes
 - 7.1.5. Papel filtro
 - 7.1.6. Álcool
 - 7.1.7. Hipoclorito

Código	TÍTULO	Revisão	Página
	Criação de triatomíneos em laboratório	01	2

- 7.1.8. Papel toalha
- 7.1.9. Tecido filô
- 7.1.10. Ligas
- 7.1.11. Etiquetas de identificação
- 7.1.12. Lápis
- 7.1.13. Caneta
- 7.1.14. Borracha
- 7.1.15. Tesoura

7.2. Equipamentos

- 7.2.1. Microscópio

8. PROCEDIMENTOS

8.1. Condição laboratorial

- 8.1.1. Sala com temperatura entre 25 e 26°C com umidade relativa do ar acima de 60%;

8.2. Limpeza dos potes e contagem dos triatomíneos

- 8.2.1. A troca e limpeza dos potes da colônia ocorre a cada duas semanas;
- 8.2.2. Transferir os triatomíneos para bandejas plásticas e realizar a limpeza dos potes;
- 8.2.3. Limpar os potes com água corrente e sabão neutro;
- 8.2.4. Adicionar fundo e sanfona confeccionados de papel filtro para os potes;
- 8.2.5. Contar os triatomíneos colocando-os novamente no pote;
- 8.2.6. Número máximo de ninfas para cada pote: 250 ninfas;
- 8.2.7. Número máximo de adultos para cada pote: 30 adultos;
- 8.2.8. Identificar cada pote com etiquetas contendo: nome da espécie, número de ninfas e/ou adultos e data da troca;



8.3. Separação de ovos para eclosão

- 8.3.1. Realizar semanalmente a limpeza dos potes contendo adultos para a retirada de ovos;
- 8.3.2. Alocar os adultos em bandeja plástica, retirando a estrutura em sanfona do pote;
- 8.3.3. Verificar a presença de ovos no fundo do pote;
- 8.3.4. Transferir os ovos para pequenos potes previamente preparados com fundo e sanfona de papel filtro.
- 8.3.5. Fechar o pote com tecido filô e elásticos;
- 8.3.6. Anotar data de abertura do pote e acompanhar o período para eclosão dos ovos;
- 8.3.7. A partir da eclosão, repetir procedimentos a partir do item 8.1;

8.4. Alimentação

- 8.5. A alimentação com uso de cobaias deverá seguir como descrito no protocolo de alimentação direta com uso de animais.

6.3 Procedimento operacional padrão para a o MALDI-TOF de triatomíneos

	FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
TÍTULO: Procedimentos para o MALDI-TOF de triatomíneos		
Elaborado por: Izabela de Souza Guimarães Eder dos Santos Souza	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	Data de aplicação: 01/03/2021 Data da próxima revisão:

1. OBJETIVOS

Utilizar a proporção de massa em relação a carga (m/z) para comparar as espécies de triatomíneos.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica

3. APLICÁVEL A

Espécies de triatomíneos mantidos em colônia.

4. RESPONSABILIDADES

Gerente da unidade e técnicos de laboratório.

5. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica

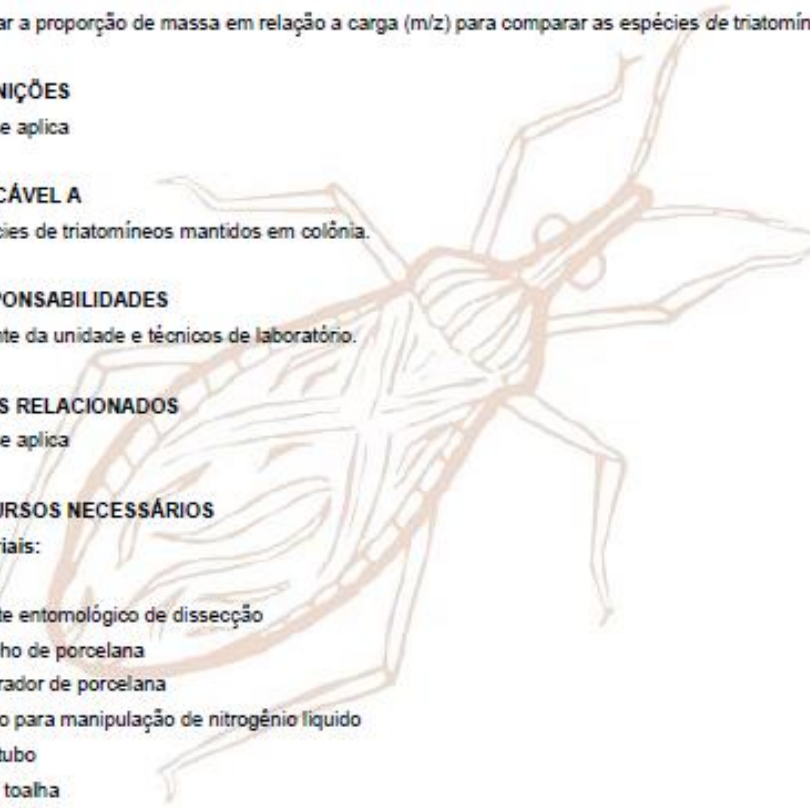
6. RECURSOS NECESSÁRIOS

6.1. Materiais:

- 6.1.1. Pinça
- 6.1.2. Estilete entomológico de dissecação
- 6.1.3. Cadinho de porcelana
- 6.1.4. Macerador de porcelana
- 6.1.5. Frasco para manipulação de nitrogênio líquido
- 6.1.6. Microtubo
- 6.1.7. Papel toalha
- 6.1.8. Pincel permanente
- 6.1.9. Bisturi
- 6.1.10. Placa MALDI

6.2. Equipamentos

- 6.2.1. Centrífuga
- 6.2.2. Espectrômetro de massa



Código	TÍTULO	Revisão	Página
	Procedimentos para o MALDI-TOF de triatomíneos	01	2

7. PROCEDIMENTOS

7.1. Retiradas das pernas

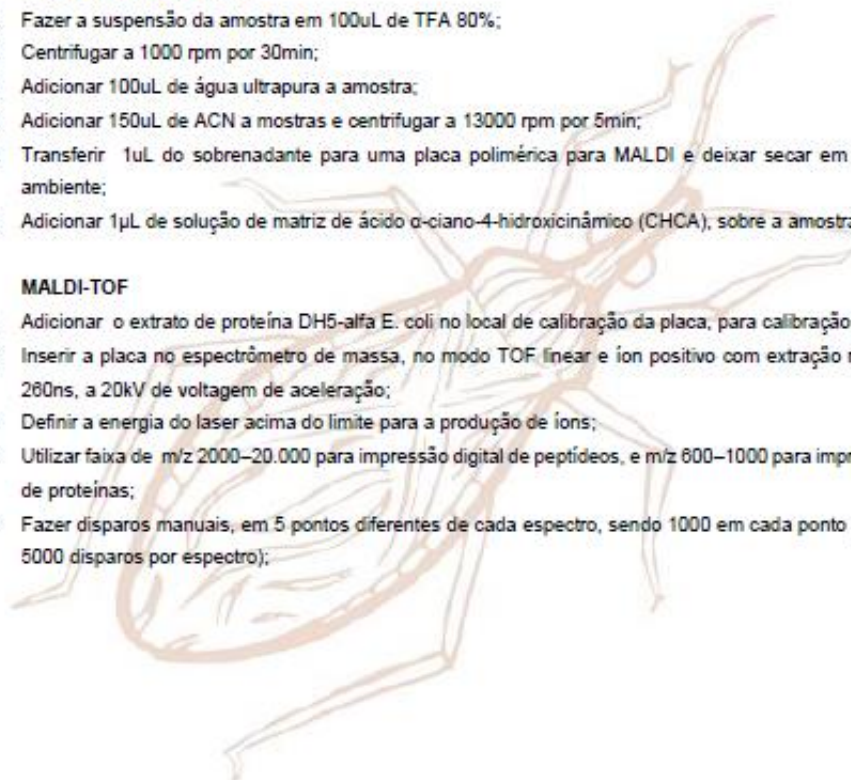
- 7.1.1. Retirar 4 triatomíneos da colônia e coloca-los em recipiente plástico fechados com tecido filó;
- 7.1.2. Sacrificar os triatomíneos em freezer a -20°C por 5min;
- 7.1.3. Retirar todas as pernas utilizando pinças estéreis e colocar dentro do cadinho de porcelana;
- 7.1.4. Adicionar o nitrogênio líquido e macerar com o auxílio de macerador de porcelana, até se tornar um pó;
- 7.1.5. Transferir as pernas maceradas para um microtubo;

7.2. Preparação das amostras



- 7.2.1. Fazer a suspensão da amostra em 100 μL de TFA 80%;
- 7.2.2. Centrifugar a 1000 rpm por 30min;
- 7.2.3. Adicionar 100 μL de água ultrapura a amostra;
- 7.2.4. Adicionar 150 μL de ACN a mostras e centrifugar a 13000 rpm por 5min;
- 7.2.5. Transferir 1 μL do sobrenadante para uma placa polimérica para MALDI e deixar secar em temperatura ambiente;
- 7.2.6. Adicionar 1 μL de solução de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), sobre a amostra seca;

7.3. MALDI-TOF

- 7.3.1. Adicionar o extrato de proteína DH5-alfa E. coli no local de calibração da placa, para calibração externa;
- 7.3.2. Inserir a placa no espectrômetro de massa, no modo TOF linear e ion positivo com extração retardada de 260ns, a 20kV de voltagem de aceleração;
- 7.3.3. Definir a energia do laser acima do limite para a produção de íons;
- 7.3.4. Utilizar faixa de m/z 2000–20.000 para impressão digital de peptídeos, e m/z 600–1000 para impressão digital de proteínas;
- 7.3.5. Fazer disparos manuais, em 5 pontos diferentes de cada espectro, sendo 1000 em cada ponto (Totalizando 5000 disparos por espectro);



6.4 Procedimento operacional padrão para a microscopia eletrônica de varredura de triatomíneos

	<p>FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO Centro de Entomologia Médica Av. Pedro Teixeira, 25 - Dom Pedro, Manaus - AM, 69040-000 Tel.: (92) 2127-3518/2127-3525</p>	
PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP		
TÍTULO: Procedimentos para a microscopia eletrônica de varredura de triatomíneos		
Elaborado por: Izabele de Souza Guimarães Eder dos Santos Souza	Revisado e aprovado por: Maria das Graças Vale Barbosa Guerra	Data de aplicação: 01/03/2021
		Data da próxima revisão:

1. **OBJETIVOS**
 Estudo morfológico comparativo triatomíneos

2. **DEFINIÇÕES**
 Não se aplica.

3. **APLICÁVEL A**
 Espécies de triatomíneos mantidos em colônia.

4. **RESPONSABILIDADES**
 Gerente da unidade e técnicos de laboratório.

5. **POP'S RELACIONADOS**
 Não se aplica.

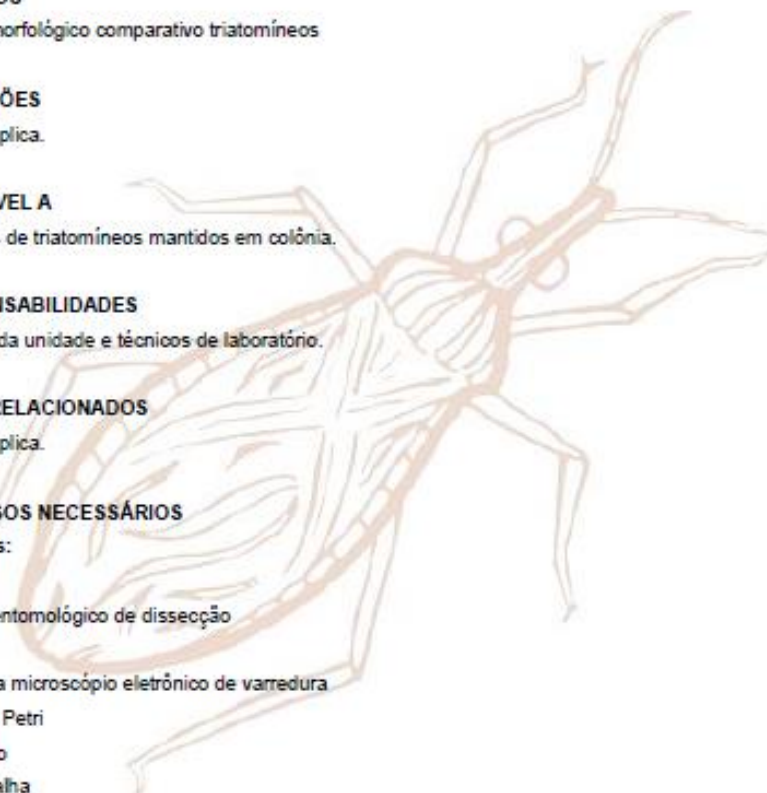
6. **RECURSOS NECESSÁRIOS**

6.1. **Materiais:**

- 6.1.1. Pinças
- 6.1.2. Estilete entomológico de dissecação
- 6.1.3. Bisturi
- 6.1.4. Stub para microscópio eletrônico de varredura
- 6.1.5. Placa de Petri
- 6.1.6. Microtubo
- 6.1.7. Papel toalha
- 6.1.8. Pincel permanente
- 6.1.9. Esmalte incolor

6.2. **Equipamentos**

- 6.2.1. Microscópio estereoscópico
- 6.2.2. Microscópio óptico
- 6.2.3. Microscópio Eletrônico de Varredura
- 6.2.4. Equipamento de ultra-som



Código	TÍTULO	Revisão	Página
	Procedimentos para a microscopia eletrônica de varredura	01	2

6.2.5. Equipamento metalizador

6.2.6. Estufa

6.2.7. Capela

7. PROCEDIMENTOS

7.1. Limpeza e dissecação

7.1.1. Dissecar partes da cabeça, sulco estridulatório e ovos, com o auxílio de microscópio estereoscópico, microscópio óptico, pinça, estilete entomológico e bisturi;

7.1.2. Limpar as amostras em equipamento de ultra-som;

7.2. Fixação

7.2.1. Lavar as amostras com solução tampão fosfato ou PBS;

7.2.2. Mergulhar as amostras em placa de Petri contendo solução de Karnovsky (Glutaraldeído 2,5% e formoldeído 4,0% em tampão cacodilato) , por no mínimo 12h;

7.2.3. Retirar o fixador com tampão cacodilato, mergulhar 3 vezes por 15 min;

7.3. Pós-fixação

7.3.1. Mergulhar as amostras em placa de Petri contendo tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0.8% em água destilada;

7.3.2. Manter na capela com luz apagada, de 40min a 1h;

7.4. Desidratação alcoólica

7.4.1. Mergulhar as amostras em placas de Petri para desidratação em série alcoólica, com concentrações de 70%, 80%, 90% e 100% respectivamente;

7.5. Secagem

7.5.1. Secar as amostras em estufa por 20min a 45°C;

7.5.2. Fixar as amostras em stub, com esmalte incolor e enumerar o stub com pincel para identificação;

7.6. Metalização

7.6.1. Colocar os stubs em equipamento metalizador durante 2min, com potência de 10mA;

7.7. MEV

7.7.1. Colocar as amostras metalizadas em microscópio eletrônico de varredura, observar e fotografar;

