Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Daniel Pagotto Vendrami

Estudos populacionais de *Triatoma sordida* e *Triatoma costalimai* (Hemiptera:Reduviidae) baseados em marcadores mitocondriais e morfometria geométrica

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

Versão Corrigida

São Paulo

2017

Daniel Pagotto Vendrami

Estudos populacionais de *Triatoma sordida* e *Triatoma costalimai* (Hemiptera:Reduviidae) baseado em marcadores mitocondriais e morfometria geométrica

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli

São Paulo

2017

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Vendrami, Daniel Pagotto

Estudos populacionais de *Triatoma sordida* e *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae) baseado em marcadores mitocondriais e morfometria geométrica / Daniel Pagotto Vendrami. – São Paulo, 2017.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Mauro Toledo Marrelli

Descritores: 1. TRIATOMINAE. 2. MORFOMETRIA. 3. GENÉTICA DE POPULAÇÕES. 4. INSETOS VETORES. 5. MARCADOR MOLECULAR. 6. DOENÇA DE CHAGAS.

USP/IMTSP/BIB-15/2017.

A pessoa que por várias vezes me apoiou incondicionalmente e foi de suma importância para a conclusão deste trabalho. Dedico esse trabalho à minha amiga e companheira Natasha

Agradecimentos

Gostaria de deixar registrado meus agradecimentos,

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauro Toledo Marrelli, pela orientação e ensinamentos ao longo desse projeto e da minha vida acadêmica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do meu projeto de doutorado.

Aos moradores, de cada sítio visitado, que gentilmente nos deixaram investigar seus galinheiros, pocilgas e armazéns em busca de triatomíneos. E pelos cafés e conversas após cada coleta.

Aos colegas que tanto me auxiliaram nos trabalhos de campo:

No Mato Grosso do Sul, Dr. Paulo Silva de Almeida, João França, Ezquiel.

Na Bahia: Eduardo Oyama, Wisley Santarém P. de Souza, Orlando Marcos e Carlos Gustavo.

Em Goiás: Marcelo Santalucia, Djalma, João, Olavo e José Ignácio.

Em Minas Gerais: Antonio Langer, Raimundo e Manoel

Ao amigo, Dr. Walter Ceretti Junior, pelo grande apoio para a realização deste trabalho, seja nas coletas de campo ou discutindo os achados.

Aos Profs Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves e Dr. Marcos Takashi Obara da Universidade de Brasília pelos conselhos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vagner José Mendonça, pelo auxílio e ensinamentos nos trabalhos de campo e nas conversas sobre resultados deste trabalho.

Aos amigos da velha guarda da FSP, Antônio Medeiros-Sousa e Gabriela Carvalho pelos momentos de conversas, descontração e discussões que foram essenciais para o meu crescimento profissional.

Aos amigos da nova geração Rafael Christe e Ramon Wilk pelas discussões sobre a vida acadêmica, sobre morfometria e afins. E a novíssima geração, Amanda e Eduardo. E aos colegas da entomologia da FSP: Fredy Galvis, Andrey Andrade, Paulo Urbinatti, Prof. Delsio Natal

A minha amiga, companheira Natasha, pelo apoio, motivação, puxões de orelha e compreensão durante todo o período de realização deste trabalho. Ao Bolota e Amora, pelo carinho, amor e companhia.

À minha família pelo apoio incondicional para a realização deste trabalho dando todo o aporte necessário, em especial meus pais que sempre estiveram presentes durante todo o período.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

“ O especialista enxerga e vai longe em seu campo, mas não sabe o que ocorre ao seu redor e não perde tempo averiguando os estragos que seus êxitos poderiam causar em outro âmbito da existência, alheios ao seu. Esse ser unidimensional pode ser ao mesmo tempo, um grande especialista e uma pessoa inculta porque seus conhecimentos, em vez de conectá-lo com os outros, o isolam numa especialidade que é apenas uma célula diminuta do vasto campo do saber”

Mario Vargas Llosa em A civilização do espetáculo

Resumo

Vendrami DP. Estudos populacionais de *Triatoma sordida* e *Triatoma costalimai* (Hemiptera:Reduviidae) baseado em marcadores mitocondriais e morfometria geométrica (Tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 2017

Triatoma sordida é considerada de importância secundária no ciclo da Doença de Chagas humana, uma vez que vem ocupando o lugar de *Triatoma infestans* no peri-domicílio das casas. *Triatoma costalimai* é considerada uma espécie silvestre e endêmica do cerrado brasileiro. Recentemente tem ocorrido um aumento do número de invasões domiciliares por *T. sordida* e *T. costalimai*, devido ao impacto causado pelo homem no meio ambiente. Ambas as espécies já foram encontradas naturalmente infectadas por *Trypanosoma cruzi* e, portanto, contribuem para o ciclo antroponozóico da doença. O presente trabalho teve como objetivo verificar a variabilidade genética e morfológica dessas duas espécies, por morfometria geométrica alar e da cabeça e marcadores moleculares mitocondriais sendo *T. sordida* coletado nos estados de Mato Grosso do Sul (5 populações), Goiás (4 populações) e Minas Gerais (3 populações); e *T. costalimai* coletados nos estados da Bahia (1 população), Goiás (2 populações) e Minas Gerais (1 população). A hipótese

Os resultados mostram que as populações de *T. sordida* encontram-se altamente estruturadas geneticamente, e que a morfologia alar apresenta uma heterogeneidade, o que permite concluir que mesmo estruturadas geneticamente, não há um processo de especiação ocorrendo para essa espécie. As populações de *T. costalimai* apresentam alta variabilidade morfológica do conexivo, embora as asas e cabeças apresentam certa similaridade entre as populações estudadas. Os marcadores genéticos indicam distinção entre espécimes que apresentam uma linha laranja continua no conexivo daqueles que apresentam manchas laranjas triangulares. As diferenças encontradas sugerem que *T. costalimai* compreende duas subespécies, com diferenças morfológicas e cromáticas.

Descritores: Triatominae. Morfometria. Genética de Populações. Insetos Vetores. Marcador Molecular. Doença de Chagas.

Abstract

Vendrami DP. Populational studies of *Triatoma sordida* and *Triatoma costalimai* (Hemiptera:Reduviidae) using mitochondrial markers and Geometric Morphometrics (Thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017

Triatoma sordida is considered of secondary importance in the cycle of Human Chagas Disease, since it has occupied the place of *Triatoma infestans* in the peridomicile of the houses. *Triatoma costalimai* is a wild and endemic species of Brazilian cerrado. Recently there has been an increase in the number of home invasions by these species, due to the impact caused by man in the environment. Both species have already been found naturally infected by *Trypanosoma cruzi* and, therefore, contribute to the antroponotic cycle of the disease. The present work had as objective to verify the genetic and morphological variability of these two species, through the geometric morphometry of the head and mitochondrial molecular markers. The results show that the populations of *T. sordida* are highly structured genetically, and that the wing morphology shows heterogeneity in the wing shape, which allows to conclude that even if genetically structured, there is no speciation process occurring for this species. The populations of *T. costalimai* have high morphological variability of the connexivum, although the wings and heads present some similarity between the populations studied. Genetic markers indicate a distinction between specimens with a continuous orange line in the connexivum of those with triangular orange spots. The differences found suggest that *T. costalimai* comprises two subspecies, with morphological and chromatic differences.

Descriptors: Triatominae. Morphometry. Population Genetics. Insect Vectors. Molecular Markers. Chagas Disease.

Sumário

1 Introdução	11
1.1 Doença de Chagas	11
1.2 Subfamília Triatominae	12
1.2.1 <i>Triatoma sordida</i>	14
1.2.3 <i>Triatoma costalimai</i>	15
1.3 Análises Morfométricas	17
1.4 Marcadores moleculares	18
1.5 Microevolução em Triatominae	19
2 Objetivos	21
2.1 Geral	21
2.2 Específicos	21
3 <i>Triatoma sordida</i>	22
3.1 Material e métodos	23
3.1.1 Seleção e caracterização das áreas de estudo	23
3.1.2 Coleta e Identificação	25
3.1.3 Variação Morfológica. Morfometria geométrica das asas	27
3.1.4 Análise Molecular	29
3.2 Resultados	33
3.2.1 Análise geométrica das asas	33
3.2.2 Reconstrução filogenética com haplótipos únicos	39
3.2.3 Análise dos espécimes coletados no Estado do Mato Grosso do Sul	41
3.2.4 Análise dos espécimes coletados em Posse, Goiás	45
3.2.5 Análise dos espécimes coletados em Januária, Minas Gerais.	48
3.3 Discussão	52
3.3.1 Análise morfométrica das asas	52
3.3.2 Análise Filogeográfica	54
3.3.3 Diversidade haplotípica	56
3.3.4 Estruturação Populacional	58
3.3.5 Neutralidade	59
4 <i>Triatoma costalimai</i>	61
4.1 Material e Métodos	62
4.1.2 Caracterização das áreas de coleta	62
4.1.3 Coleta e Identificação	67
4.1.4 Variação Morfológica	69

4.1.5 Análise de morfometria geométrica.....	69
4.1.6 Análise Molecular	72
4.1.7 Análise Genética.....	74
4.2 Resultados	77
4.2.1 Variação Morfológica	77
4.2.2 Análises de Morfometria Geométrica	80
4.2.3 Cabeça	87
4.2.4 Análise Genética.....	91
4.3 Discussão	102
4.3.1 Variações Morfológicas.....	103
4.3.2 Variações genéticas: inter e intra específicas.....	106
5 Conclusão	110
Referências	111

1 Introdução

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas Humana (DCH), primitivamente uma zoonose silvestre, tornou-se uma patologia também humana, antroponose, a partir das transformações do ambiente natural determinadas pela ação antrópica. Trata-se de uma doença que assola em sua maioria indivíduos que moram na zona rural e que vivem em precárias condições de habitação ¹.

Essa doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, um protozoário flagelado que tem suas fases do desenvolvimento no vetor, insetos da subfamília Triatominae, e no hospedeiro em ambiente silvestre, pequenos mamíferos ou marsupiais. Quando o triatomíneo, invade as moradias humanas e se alimenta do sangue do homem, o *T. cruzi* passa a desenvolver seu ciclo no homem, causando a patologia. Para que a doença se manifeste é necessário que um triatomíneo infectado por *T. cruzi* faça seu repasto alimentar no homem. Nos triatomíneos, os parasitas, na sua forma infectante, estão concentrados na porção final do aparelho digestivo. Durante ou logo após o repasto, o barbeiro tende a defecar perto do local da picada ou perto de mucosas. Como a picada causa uma lesão na pele, esta pode ser a porta de entrada do *T. cruzi* no organismo humano².

Na América latina, segundo a Organização mundial da Saúde (OMS), entre 6 a 7 milhões de pessoas encontram-se infectadas com *T. cruzi*. No Brasil, dados de 2010, apresentam cerca de 1.500.000 de casos positivos. Devido a diferentes metodologias para se amostrar o número de casos reais junto com a subnotificação da doença fica difícil estipular a real prevalência da doença na população brasileira ^{3,4}.

A DCH não é uma doença que se restringe apenas aos países latinos americanos. Devido ao intenso fluxo migratório atualmente existem cerca de 70 mil pessoas vivendo com a doença em países da Europa, 300.000 nos Estados Unidos e Canadá^{5,6}. Mostrando que cada vez mais a DCH se torna um problema global³. A falta de controle para detectar a presença de *T. cruzi* tanto no sangue quanto nos órgãos de doadores também ajuda a manter o elevado número de casos nesses países⁷.

A doença de Chagas tem um grande impacto econômico e social, pois além de afetar a vida dos pacientes crônicos da doença, ela causa grandes impactos para o sistema de saúde, estima-se que um paciente custe cerca de 3.500 dólares/ano, enquanto uma pessoa saudável custe aproximadamente 400 dólares/ano⁸

1.2 Subfamília Triatominae

A subfamília Triatominae constitui um grupo amplamente distribuído pela região Neotropical, entre os Grandes Lagos da América do Norte e a província de Chubut no Sul da Argentina e está representada por 150 espécies ocorrentes e duas fósseis, distribuídas em 18 gêneros (Tabela 1). Dessas a maioria apresenta capacidade para que o parasita *T. cruzi* complete seu ciclo, e se tornar um potencial vetor da DCH. Das espécies de triatomíneos descritas, 69 ocorrem em território brasileiro⁹⁻¹¹, nos mais variados ecótopos, como palmeiras (espécies do gênero *Rhodnius* e *Panstrongylus*), associados a ninhos de pequenos mamíferos (algumas espécies do gênero *Triatoma*) ou em formações rochosas, como é o caso das espécies *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sherlocki*, *Triatoma costalimai* e *Triatoma rubrovaria*¹².

Tabela 1- Tribos e gêneros, segundo número de espécies conhecidas, de triatomíneos. Adaptado de Oliveira e Alevi¹³

Tribo	Gêneros	Nº. Espécies
ALBERPROSENINI	1- <i>Alberprosenia</i>	2
BOLBODERINI	2- <i>Belminus</i>	8
	3- <i>Bolbodera</i>	1
	4- <i>Microtriatoma</i>	2
	5- <i>Parabelminus</i>	2
CAVERNICOLINI	6- <i>Cavernicola</i>	2
RHODNINI	7- <i>Psammolestes</i>	3
	8- <i>Rhodnius</i>	21
TRIATOMINI	9- <i>Linshcosteus</i>	6
	10- <i>Dipetalogaster</i>	1
	11- <i>Eratyrus</i>	2
	12- <i>Hermanlenticia</i>	1
	13- <i>Meccus</i>	6
	14- <i>Mepraia</i>	3
	15- <i>Nesotriatoma</i>	3
	16- <i>Panstrongylus</i>	15
	17- <i>Paratriatoma</i>	1
	18- <i>Triatoma</i>	74
TOTAL		152

Nesse panorama, dentre os gêneros epidemiologicamente mais significantes incluem-se *Rhodnius* Stål, 1859, *Panstrongylus* Berg, 1879 e *Triatoma* Laporte 1832, aos quais pertencem o maior número de espécies descritas e aquelas de maior relevância em saúde pública por possuírem consideráveis sinantropia e capacidade de domiciliação e, dessa forma, de estabelecer o elo entre o parasito e o homem ¹⁴.

As espécies com maior grau de sinantropia são *T. infestans* e *T. rubrofasciata*, que ocorrem estritamente domiciliadas; *T. brasiliensis* Neiva 1911, *T. dimidiata*, *R. prolixus*, *P. megistus* Burmeister 1835 e *T. sordida* (Stål 1859), entre outras, consideradas em processo de domiciliação, pois são capturadas tanto em ecótopos silvestres quanto artificiais e são frequentemente capturadas

em colônias domiciliares. Essas espécies, portanto, estão entre os principais vetores do mal de Chagas no Continente^{15,16}.

As populações domiciliadas de *Triatoma infestans* no Brasil encontram-se hoje eliminadas, estando o país certificado desde 09 de junho de 2006. No entanto, é aceito que o controle dessas populações do ambiente domiciliar possa deixar um nicho ecológico vago que poderá ser ocupado por populações autóctones de triatomíneos, até então estritamente silvestres ou peridomiciliares. Assim, as ações de vigilância entomológica das espécies tidas como “vetoras secundárias” da DCH, tornaram-se ainda mais importantes¹⁷.

O planejamento e monitoramento de intervenções de controle dependem da compreensão da biologia do vetor, ou seja: das suas necessidades ecológicas, fisiológicas, da sua capacidade de adaptar-se ao ambiente doméstico (sinantropia) e da previsão da emergência potencial de resistência a inseticidas. Para esse fim, são necessárias investigações ecológicas, comportamentais, fisiológicas, epidemiológicas e/ou evolutivas, assim como necessariamente de julgamentos taxonômicos acurados em fim, a identificação exata do mesmo^{18,19}.

1.2.1 *Triatoma sordida*

Triatoma sordida é um inseto de tamanho médio, (machos 14-19mm; fêmeas 15-20mm) com aspecto geral marrom claro (raramente escuro) com manchas amarelas na cabeça, pescoço, pronoto, escutelo, hemiélitros, pernas, cujos fêmures amarelos apresentam anel escuro subapical e tíbias castanhas com anéis claros na base (Figura 1). O conexivo apresenta macha negra estreita na margem basal e mais extensa na margem exterior²⁰. Esse triatomíneo tem sua ocorrência ao longo da região central do Brasil, grande parte do Paraguai, Bolívia até a região central da Argentina.

No ambiente silvestre, *T. sordida* pode ser encontrado principalmente em cascas de árvores vivas ou mortas, e sobre os troncos de várias espécies de palmeira, onde é associado com os pássaros ²¹. Essa espécie possui capacidade de ocupar diversos ecótopos, onde, além de pássaros, se relaciona também com gambás e roedores ^{21,22}.

Por muito tempo essa espécie foi considerada de menor importância epidemiológica, quando comparada a *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*, por ser geralmente encontrado em galinheiros e distante de habitações humanas ^{19,23}. No entanto, essa espécie apresenta um comportamento de invasão domiciliar, devido à sua atração pela luminosidade ¹⁴. Atualmente é considerada uma espécie com alto potencial de domiciliação, pois o número de notificações indicando a presença de ninfas e adultos no intradomicílio vem aumentando desde a década de 1960 ^{19,23,24}.

As ações de controle sobre esse vetor não têm um efeito tão duradouro como ocorreu com *T. infestans*, pois por ser um triatomíneo com origem nas regiões descampadas do Brasil ^{25,26}, há constante invasão de indivíduos provenientes do ambiente silvestre. *Triatoma sordida* é a espécie mais comumente capturada em condições domiciliares e peridomiciliares no nordeste do estado de São Paulo e estado de Goiás ²⁷.

1.2.3 *Triatoma costalimai*

Triatoma costalimai Verano e Galvão, 1959, é um triatomíneo de tamanho médio (machos 26mm e fêmeas 25,5mm) de coloração marrom escura, com marcas avermelhadas no pescoço, cório e conexivo e apresenta poucas sensilas²⁰. É encontrado em algumas regiões do cerrado brasileiro, com um tipo de vegetação característica: mata-seca, formação vegetal encontrada no bioma

Cerrado e não possuem associação com cursos de água²⁸, em afloramentos rochosos e associado a ninhos de pequenos roedores, mais frequentemente ao mocó (*Kerodon rupestris*)²⁰.

A sua área de ocorrência compreende os estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia e Tocantins. Mesmo que a distribuição geral seja conhecida, pouco se sabe sobre os locais específicos de seu encontro ²⁹⁻³¹.

Devido a alterações no ambiente silvestre essa espécie tem sido encontrada com mais frequência invadindo habitações humanas ^{32,33}. E uma vez que essa espécie é encontrada naturalmente infectada por *T. cruzi* ³⁴, ela pode passar a desempenhar um papel importante na manutenção do ciclo enzoótico da doença de Chagas.

Devido às suas características morfológicas e padrão cromático, essa espécie é agrupada no subcomplexo *Triatoma matogrossensis*. O subcomplexo *Triatoma matogrossensis*, pertencente ao complexo *Triatoma infestans*, e foi proposto por Schofield e Galvão³⁵. É formado pelas seguintes espécies: *T. costalimai* Verano e Galvão 1959, *Triatoma baratai* Carcavallo e Jurberg, 2000, *Triatoma deaneorum* Galvão, Souza e Lima, 1967, *Triatoma guazu* Lent e Wygodzinsky, 1979, *Triatoma jurbergi* Carcavallo, Galvão e Lent, 1998, *Triatoma matogrossensis* Leite e Barbosa, 1953, *Triatoma williami* Galvão, Souza e Lima, 1967 e *Triatoma vandae* Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau e Lent, 2002.

Porém, estudos de sistemática molecular indicam que *T. costalimai* pode não ter origem monofilética com nenhuma espécie desse subcomplexo, em estudos com diferentes marcadores mitocondriais^{36,37} a filogenia desta espécie se mantém inconclusiva³⁸.

1.3 Análises Morfométricas

De acordo com Bookstein ³⁹ a morfometria é o estudo da variação da forma e sua covariação com outras variáveis, como o tamanho, tipo de fonte alimentar. Por muito tempo os estudos morfométricos consistiram em medidas lineares entre pontos de determinadas estruturas e sua posterior comparação estatística. Há alguns anos novos métodos vêm sendo utilizados permitindo uma melhor quantificação, visualização e comparação de padrões corporais de forma gráfica e clara, a chamada morfometria geométrica ^{40,41}. Esse método captura a geometria da forma analisada e mantém a maior quantidade de informação possível durante as análises estatística ⁴².

Para a coleta de dados utilizam-se pontos de referência (*landmarks*) de uma determinada estrutura corporal do organismo em estudo, tomando suas coordenadas posicionais sobre um plano cartesiano imaginário que circunscreve a estrutura corporal ^{40,42}. Os dados obtidos podem ser ordenados em banco de dados e analisados por métodos estatísticos, permitindo comparar variações morfométricas entre grupos ⁴³. O alto poder de resolução obtido das estruturas permite gerar diversos marcadores taxonômicos e populacionais ⁴⁴.

Em insetos, os estudos morfométricos considera a relação da forma e o tamanho de determinada estrutura. As asas são estruturas muito utilizadas, pelo fato de serem estruturas bidimensionais e os vários pontos de encontro entre as nervuras alares são utilizadas como pontos anatômicos, permitindo a obtenção de um grande número de caracteres ⁴¹. Essa estrutura já foi utilizada para as mais variadas análises como verificar a relação entre fatores genéticos e ambientais com o formato da asa dos triatomíneos ⁴⁵, também é utilizada para determinar a origem de reinfestação em construções no peridomicílio ⁴⁶, verificar a

sazonalidade de *T. infestans* em diferentes ecótopos ⁴⁷ e auxiliar na descrição de novas espécies ^{48,49}.

Em triatomíneos, a cabeça é uma estrutura também utilizada para estudos morfométricos. Pode revelar tanto influências ambientais quanto genéticas através da variação da forma entre populações estudadas ⁵⁰. Essa estrutura fornece informações sobre o estágio de desenvolvimento das ninfas, bem como mudanças ontogenéticas relacionadas às fontes alimentares e adaptações ao hospedeiro ^{51,52}. Através da morfometria geométrica da cabeça dos três principais gêneros de triatomíneos (*Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*), Patterson *et al.* ⁵³ evidenciariam que as medidas da cabeça de *Triatoma* e *Panstrongylus* apresentam proporções semelhantes reforçando a parafilia desses dois gêneros.

1.4 Marcadores moleculares

De acordo com Futuyma ⁵⁴ marcadores genéticos ou moleculares são mutações detectáveis que os geneticistas usam para reconhecer determinadas regiões de cromossomos ou genes.

Dentre as sequências genéticas utilizadas como marcadores, estão as pertencentes ao genoma mitocondrial. Esse genoma é encontrado em cópia única nas mitocôndrias na célula animal. Geralmente é de herança materna, mas ocasionalmente pode ocorrer herança biparental ⁵⁵. Esse marcador pode ser utilizado para estudos evolutivos, incluindo análises de estrutura populacional, fluxo gênico, biogeografia e inferência filogenética.

Sequências de genes mitocondriais têm taxa evolutiva mais rápida do que o DNA nuclear (aproximadamente 10x mais rápido) ⁵⁶, sendo a maioria das mutações as do tipo neutra, onde só há mudança de bases na sequência, sem

alteração na função da proteína ⁵⁷. Em triatomíneos os marcadores mitocôndrias mais utilizados são Citocromo b oxidase (Cit B), Citocromo c oxidase (Co1) e duas subunidades do DNA ribossomal que está inserido no genoma mitocondrial: as subunidades 16S e 12S⁵⁷.

A subunidade 16S é um marcador conservado, utilizado para inferir a história evolutiva, como no estudo realizado por Hypsa *et al.* ³⁶, em um dos primeiros trabalhos filogenéticos de triatomíneos, ou em conjunto com outros marcadores moleculares como feito por Justi *et al.* ³⁷, que utilizaram os seguintes marcadores mitocondriais: CitB, Co1, Co2, 16S, e os ribossômicos: 28S, 18S, para inferir uma filogenia mais robusta para as espécies de triatomíneos.

O gene citocromo oxidase B (CitB) é um gene geralmente utilizado para comparação de espécies mais próximas geneticamente, devido às suas mutações ocorrerem geralmente na 3ª posição do códon. Em triatomíneos este marcador foi utilizado também para estudos de inferência filogenética, de estruturação populacional ^{58,59} e também para auxiliar a descrição de uma nova espécie¹⁰ ou separação de espécies crípticas ⁶⁰.

1.5 Microevolução em Triatominae

Microevolução pode ser compreendida como o conjunto de mudanças evolutivas em menor escala, ou seja, dentro de populações. Mecanismos como seleção, fluxo gênico, deriva genética e mutações regulam a microevolução de populações de uma espécie em um determinado habitat. Tais mecanismos atuam sobre o patrimônio gênico alterando sua composição, podendo manifestar-se de diversas formas no fenótipo ⁶¹.

Os triatomíneos são insetos que apresentam grande capacidade de se adaptar ao meio em que vive. São espécies que apresentam alta plasticidade

morfológica ⁶². Essa adaptação morfológica pode levar a uma caracterização geográfica de cada população bem como pode ser o primeiro passo em um processo de especiação. Um estudo de estruturação populacional, utilizando Co1 e microssatélites em *T. dimidiata* em diferentes eco-regiões na Colômbia apontou para a separação dos espécimes coletados de acordo com a região coletada ⁶³.

A determinação da origem da infestação é de grande importância para as medidas de controle. A partir das análises de diversidade é possível estabelecer se uma população encontrada no peri-domicílio sofreu a influência do efeito gargalo, o qual uma população é reduzida ao mínimo e novos indivíduos se originam e apresentam pouca variabilidade genética e aumente a probabilidade de selecionar populações que tendem a se domiciliar mais facilmente ⁶⁴.

2 Objetivos

2.1 Geral

- a) Examinar a variabilidade genética e morfológica de populações de *Triatoma sordida* e *Triatoma costalimai*

2.2 Específicos

- b) Verificar a variabilidade morfológica presente nas asas de espécimes de *Triatoma sordida*
- c) Verificar a variabilidade do gene CitB nas populações de *T. sordida*
- d) Verificar a variabilidade morfológica presente nas asas e cabeças de espécimes de *Triatoma costalimai*
- e) Confirmar o status específico de exemplares de *T. costalimai* da cidade de Carmo do Rio Verde através de marcadores moleculares

3 *Triatoma sordida*

3.1 Material e métodos

3.1.1 Seleção e caracterização das áreas de estudo

Para a realização deste trabalho foram visitadas zonas rurais de 3 estados, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais pertencentes às regiões centro-oeste e sudeste do Brasil. Os municípios escolhidos foram definidos em contato prévio com a secretaria estadual de saúde de cada estado, por haver registro da presença de *Triatoma sordida* no peri-domicílio.

Posse, Goiás. Localizado na região do nordeste goiano, tem uma área de aproximadamente 1.900,00 km², cerca de 33 mil habitantes e uma economia predominantemente rural. Neste município foram visitadas quatro áreas (Tabela 1), onde, com autorização do morador, os galinheiros e outros anexos das propriedades foram vistoriados e os triatomíneos encontrados foram coletados.

Tabela 1 - Local de coleta, tipo de ecótopo e geolocalização das áreas em que foram encontrados exemplares de *T. sordida* em Posse- GO

Local		GPS
São Joaquim (Sítio2)	Galinheiro	S 14° 17' 49" W 46° 36' 27"
Riacho do Porco (sítio)	Galinheiro	S 14° 14' 25.1" W 46° 31' 01.5"
Riacho do Porco (sítio)	Galinheiro	S 14° 14' 21" W 46° 30' 59"
Faz Lagoa	Galinheiro	S 14° 15' 25" W 46° 33' 24"

Januária, Minas Gerais. Localizado na região do médio São Francisco, com uma população estimada em 68.000 habitantes, com uma área de 6 691,174 km², e grande atividade rural. Nesta localidade foram visitadas três regiões (tabela 2) nas quais, foram executados procedimentos de vistoria e coleta de espécimes de *T. sordida* nos galinheiros e demais anexos das propriedades.

Tabela 2- Local de coleta, tipo de ecótopo e geolocalização das áreas em que foram encontrados exemplares de *T. sordida* em Januária-MG

Local		GPS
FAZ. LAPÃO	Galinheiro	SEM PONTO
FAZ. LAPÃO	Galinheiro	SEM PONTO
FAZ. TABUA	Galinheiro	SEM PONTO

Aquidauana, Mato Grosso do Sul. Esse município localizado na região do pantanal sul-mato-grossense, possui uma área de 16 958,496 km² e aproximadamente 47.000 habitantes. Neste município foram visitados dois locais, Morrinhos e Aldeia Limão Verde.

Ladário, Mato Grosso do Sul. Município situado na região pantaneira do Mato Grosso do Sul, localizado na margem esquerda do rio Paraná. Fazendo divisa com o município de Corumbá. Possui uma área de 342,509 km² e aproximadamente 20 mil habitantes. Neste município foi visitado um sítio.

Anastácio, Mato Grosso do Sul. Município conurbado com Aquidauana, possui área de 2 949,206 km² e uma população aproximada de 24 mil habitantes. Nessa localidade também foi visitado um sítio.

Miranda, Mato Grosso do Sul. Município pertencente a microrregião de Aquidauana, possui área de 5 478,627 km², uma população de 25 794 hab.

Para ilustrar a distribuição das áreas onde foram coletados essa espécie, o mapa mostra a localização dessas áreas no território brasileiro (Figura 1).

Figura 1 A: Mapa do Brasil indicando os locais onde foram realizadas as coletas de *T. sordida*. Este mapa foi criado usando o programa DIVA-GIS (<http://www.diva-gis.org>)

3.1.2 Coleta e Identificação

As coletas de exemplares de *T. sordida* foram feitas através de busca ativa, com pinça, seguindo metodologia sugerida pelo Ministério da Saúde, nos domicílios, das zonas rurais, dos municípios, descritos acima. As buscas foram realizadas nos anexos das casas principais, sendo em sua maioria galinheiros, pocilgas ou em locais onde eram armazenados madeira e outros materiais como demonstrado na Figura 2.

Figura 2- Locais a onde foram encontrados *T. sordida*. A e B: Busca ativa por exemplares de *T. sordida*, C: Captura com auxílio de pinça de uma ninfa de *T. sordida*, D: Ninfa de *Triatoma sordida* Fonte: Daniel Vendrami, 2017

Os exemplares coletados foram armazenados em recipientes plásticos e foram trazidos ao laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Universidade de São Paulo e foram identificados utilizando a chave dicotômica de Lent e Wygodzinsky²⁰.

3.1.3 Variação Morfológica. Morfometria geométrica das asas

Foram realizadas análises morfométricas das asas de exemplares de *T. sordida* cedidos pelo Dr. Marcos Takashi Obara da Universidade de Brasília. Todos os exemplares foram coletados em campo, conforme Tabela 3.

Tabela 3- Local de origem dos *T. sordida* utilizados para análise de morfometria geométrica alar. Código de identificação de cada população (ID), localidade, número de asas analisadas (N) e data da coleta.

ID	LOCALIDADE	N	DATA
BA1	Rio de Contas-BA	17	20/05/2009
BA2	Xique-Xique-BA	24	22/05/2009
BA3	Carinhanha-BA.	19	20/05/2009
GO1	Guarani- GO	26	22/04/2008
GO2	São Luis dos Belos Montes- GO	17	15/04/2008
GO3	Posse – GO	19	16/10/2008
MG1	Conceição das Alagoas - MG	26	24/06/2008
MS1	Douradina -MS	17	16/04/2008
MS2	Miranda- MS	28	18/11/2007
MS3	Campo Grande – MS	32	11/04/2008
MS4	Paranaíba- MS	28	19/06/2008
TO1	Aurora do Tocantins	18	17/03/2008

Para a digitalização dos marcos anatômicos das asas foi utilizado o software TPSdig⁶⁵. Nas asas foram selecionados nove marcos anatômicos entre os sugeridos por Schachter-Broide⁴⁷ (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 13) (Figura 3).

Figura 3- Asa de *T. sordida* indicando os marcos anatômicos utilizados para análises morfométricas

Para análise exploratória dos dados foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP), baseado na matriz de covariância. Indivíduos de cada área de coleta foram projetados sobre os dois principais eixos CP1 e CP2 para detectar a variabilidade dos formatos alares.

A comparação entre os grupos amostrados foi feita utilizando a Análise de Variável Canônica (ACV) que ressalta as características de cada formato em cada grupo para uma melhor distinção entre eles ⁶⁶.

Foi gerada uma matriz de Distância de Procrustes (DP) entre os grupos para a comparação da distância real entre as nuvens de pontos de cada localidade. A significância estatística foi obtida através do teste de permutação.

Para a comparação do tamanho das estruturas analisadas foi utilizado o estimador isométrico Tamanho do centroide (TC), que é definido pela raiz quadrada da soma das distâncias elevadas ao quadrado entre o centro e os pontos ⁶⁷.

O efeito da influência do tamanho no formato alar (alometria) foi verificado por meio de regressão múltipla utilizando a forma como variável dependente e o tamanho do centroide como variável independente.

Todas as análises descritas acima foram feitas utilizando o programa *morphoJ* v1.02e⁶⁶.

As variações da forma e do tamanho das estruturas entre as populações analisadas foram medidas por meio do teste da análise de variância (ANOVA). A comparação par-a-par das variâncias foi feita por meio do teste *post-hoc* de Tukey's no programa Past v.1.89⁶⁸

3.1.4 Análise Molecular

3.1.4.1 Caracterização das sequências de DNA

Foram utilizados os três pares de perna de cada espécime coletado, durante o período deste projeto, para a obtenção de DNA total. As pernas foram congeladas com nitrogênio líquido e posteriormente maceradas com pistilos plásticos estéreis. A extração foi feita utilizando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Crawley, United Kingdom) seguindo o protocolo do fabricante.

Para as reações de amplificação, foram utilizados: 1,0 µl de DNA da amostra; 4,0 µl de 5x FIREpol Master mix, 13 µl de água ultrapura, 1 µL dos oligonucleotídeos denominados CitBFor: 5' GGA CAA ATA TCA TGA GGA GCA ACA G 3', e CitBRev: 5' ATT ACT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G 3', obtendo um volume final de 20 µl.⁶⁹ em termociclador My Cycler_ (Bio-Rad), com ciclos de temperatura assim programado um ciclo de 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 min (para desnaturação), 45°C por 1 min (para anelamento), 72°C por 2 min (para extensão), com um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min.

Após a amplificação, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo SAMBROOK *et al.*⁷⁰, para a visualização dos produtos amplificados.

As reações de sequenciamento foram feitas nos dois sentidos (*forward* e *reverse*) com o kit comercial ABI Prism dGTP Big Dye® Terminator v3.1 (PE Applied Biosystem, Warrington, UK), utilizamos nesse estudo, 1µl (10µm) do oligonucleotídeo, aproximadamente, 20ng de DNA do gene CitB. Essas reações foram feitas em termociclador My Cycler_ (Bio-Rad) com os ciclos de temperatura programados para: 96°C por 2min seguidos de 35 ciclos de 45s a 96°C, 30s a 50°C, 4 min a 60°C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. A cada reação de sequenciamento foram adicionados 100 µl de etanol 100% com 3 M de acetato de sódio, e incubados no gelo por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 min na velocidade de 4.000 rpm a temperatura ambiente (TA). O álcool com acetato foi removido invertendo-se os tubos e, a seguir foram adicionados 200µl de etanol gelado 70% e as amostras foram novamente centrifugadas por 30min a 4.000 rpm a TA. Todo o etanol foi removido com o auxílio de uma micropipeta. As amostras foram secas a 95°C e corridas em sequenciador automático ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI, na Rede Premium da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Para obter uma melhor qualidade das sequências analisadas, cada par de sequência foi alinhada utilizando o software MUSCLE⁷¹.

3.1.4.2 Análise de Genética de Populações

As sequências obtidas foram analisadas primeiramente pelo programa DNAsp v.5⁷² para que fossem calculadas as estatísticas genômicas: Diversidade nucleotídica (π), Diversidade haplotípica (h), que consistem em calcular o valor médio da diferença de nucleotídeos por site entre duas sequências⁷³.

O teste de neutralidade Tajimas'D foi realizado com o intuito de estabelecer se as mutações encontradas são neutras⁷⁴. O teste Fu and Li's⁷⁵ também foi realizado para verificar se a mutação encontrada na sequência não causa mudanças evolutivas, se são neutras⁷⁶.

Para visualizar a relação genealógica entre os haplótipos encontrados, foi realizado uma genealogia de rede de haplótipos, utilizando o programa Network v5.0⁷⁷. Neste programa foi usado a configuração Median Joining, que identifica grupos proximalmente relacionados e introduz um ancestral hipotético para se obter a rede mais parcimoniosa⁷⁸.

A análise de variância molecular (AMOVA) e o índice de heterozigotidade genética F_{st} , foram calculados utilizando o pacote "*popp*"⁷⁹ no ambiente computacional R⁸⁰. Essas análises foram feitas para avaliar o nível de estruturação que há entre as populações amostradas.

Para verificar se as populações seguem o modelo de Isolamento por Distância (IBD) foi realizado o teste de Mantel, entre a matriz de distância geográfica versus valores de F_{st} . A significância do teste foi através do teste de permutação. Ambas as análises foram realizadas no software Past v1.89⁶⁸

3.1.4.3 Reconstrução filogenética com haplótipos únicos

A análise filogeográfica foi realizada através de uma árvore de Neighbor-Joining, utilizando o modelo Kimura-2-parametros (K2P), para visualizar como os haplótipos estão agrupados. Essa análise foi feita no software MEGA 6⁸¹

3.2 Resultados

Em todos os locais visitados obtivemos autorização do morador para verificar a presença de *T. sordida* nos galinheiros e outros anexos das propriedades. As localidades que se mostraram positivas para a presença de triatomíneos, e o número de indivíduos analisados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4-Populações de *T. sordida* utilizada no estudo, informando o município pesquisado e seu respectivo local de coleta, data e número de espécimes analisados (N)

ID	Município	Local	Número de espécimes		Data
			Coletado	Genotipado	
P3	Posse	São Joaquim (Sitio2)	46	10	09/12/2014
P5	Posse	Riacho do Porco (sitio)	143	11	09/12/2014
P6	Posse	Riacho do Porco (sitio)	36	12	09/12/2014
P7	Posse	Faz Lagoa	148	13	09/12/2014
J10	Januária	FAZ. LAPÃO	21	12	09/07/2015
J11	Januária	FAZ. LAPÃO	56	5	09/07/2015
J12	Januária	FAZ. TABUA	71	12	09/07/2015
ALV	Aquidauana	Aldeia limão verde	16	10	14/10/2014
ANA	Anastácio	Sitio duas estrelas	10	6	15/10/2014
AQU	Aquidauana	Morrinhos	25	15	13/10/2014
LAD	Ladário	Sitio 13 Assentamento 72 lote 44	14	7	27/07/2016
MIR	Miranda	Agua Branca Chac. N. S. AP	34	9	28/07/2016

3.2.1 Análise geométrica das asas

O tamanho do centroide (TC) variou entre 2,19mm e 2,67mm nas populações analisadas neste estudo. A população de menor média do tamanho de centroide foi MS2 (2,19mm) e a de maior foi BA1 (2,67mm). As demais populações apresentaram as seguintes médias BA2 (2,52 mm), BA3 (2,65 mm),

GO1 (2,32mm), GO2 (2,57mm), GO3 (2,48mm), MG1 (2,42mm) MS1 (2,35mm), MS3 (2,51mm) MS4 (2,47mm) e TO (2,38mm).

Na análise de *bloxplot* do TC (Figura 4), percebemos que houve variações entre populações do mesmo estado, o estado que teve a menor variação foi a Bahia, onde as populações apresentaram os maiores valores para o tamanho do centróide. As populações de Mato Grosso do Sul apresentaram grande variação intrapopulacional. Não houve correlação entre distância geográfica e o tamanho do centróide (teste de mantel R: 0,03682 $p=0.2$).

Figura 4- Boxplot da variação do tamanho do centróide dos exemplares de *T. sordida* provenientes de 12 localidades

A influência do tamanho no formato alar foi de 3,99%.

A Análise de Componentes Principais foi realizada para verificar a presença de agrupamentos dos dados sem a definição de um grupo *a priori*. O

resultado que obtivemos foram os indivíduos apresentando baixa variabilidade no formato alar e sobrepostos no morfoespaço, pode-se ressaltar que a população de MS1 apresenta uma forma ligeiramente diferente dos demais, como visto na Figura 5. O Componente Principal (CP) 1 contribuiu com 33,75% da variação dos dados e o CP2 com 16,6%.

Figura 5- Gráfico de dispersão dos componentes principais (PC). A contribuição de cada componente está escrita entre parêntese. Cada cor representa uma população e cada ponto um indivíduo. As elipses indicam a distribuição da frequência dos dados amostrados.

Quando a comparação foi feita com os grupos já definidos, a Análise de Variável Canônica (AVC), três populações apresentaram uma certa diferenciação

no formato alar, MS1, TO1 e GO2, quando comparada com as demais populações neste trabalho (Figura 6).

Figura 6- Gráfico de dispersão das Variáveis Canônicas. As elipses representam a probabilidade de 90% das asas de uma determinada região pertencer ao mesmo grupo. A contribuição de cada variável está escrita entre parêntese. Cada cor representa uma população e cada ponto um indivíduo.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que há diferenças entre o formato alar dos grupos estudados, Pillai trace=8, GL=110, $F=94,18$ $p<0,001$. Quando comparada a variação par-a-par percebemos poucas comparações que não

apresentaram significância estatística, como por exemplo as comparações entre as populações da Bahia (Tabela 5).

Tabela 5- Valores de p , após a correção de Bonferroni, para comparação par-a-par da variação do formato alar entre as populações estudadas. Os valores em negritos são significantes estatisticamente

	BA1	BA2	BA3	GO1	GO2	GO3	MG1	MS1	MS2	MS3	MS4
BA1	0										
BA2	1	0									
BA3	1	0,044191	0								
GO1	0,38832	0,020742	0,548423	0							
GO2	0,046596	<0,0001	0,000382	0,022931	0						
GO3	0,649725	1	0,034884	0,442958	0,000619	0					
MG1	0,000286	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,005854	0				
MS1	<0,0001	0,000145	<0,0001	0,000106	0,001192	0,000571	<0,0001	0			
MS2	0,005629	0,000653	<0,0001	1	0,133833	0,033203	0,002046	<0,0001	0		
MS3	1	1	0,009631	0,164351	<0,0001	1	0,000358	<0,0001	0,960213	0	
MS4	0,03639	1	0,000247	0,003971	0,000267	1	0,002126	0,000041942	0,000802	1	0
TO1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

3.2.2 Análise Filogeográfica

Inicialmente foi gerada uma árvore de Neighbor-Joining (Figura 7) com intuito de verificar o agrupamento dos haplótipos encontrados nos exemplares de Posse, Januária e das localidades do Estado do Mato Grosso do Sul, adicionando-se haplótipos de *T. sordida* da Bolívia e Argentina como grupo externo. Os haplótipos procedentes de Januária receberam a nomenclatura JANhap, os haplótipos de Posse foram nomeados POShap, e o de Mato Grosso do Sul MShap.

Figura 7- Árvore de Neighbor-Joining, mostrando as relações entre os haplótipos do gene CitB encontrados. Foi utilizado o modelo Kimura-2-parâmetro. *T. sordida* Arg e *T. sordida* BO são utilizados como *outgroup*. Valores acima dos nós, representa os valores de *bootstrap*, valores acima de 70 são considerados ideais.

A análise dessa árvore mostra a formação de um grupo mais basal, aos demais, formados por haplótipos encontrados na Argentina e Bolívia. Diretamente derivado desse grupamento nota-se que, com exceção dos haplótipos MSHAP1, MSHAP7, MSHAP11 e MSHAP12, os demais pertencentes aos dos espécimes coletados no Estado do Mato Grosso do Sul ficaram agrupados. Os haplótipos dos exemplares de Januária e Posse (e dentro deste, os haplótipos MSHA1, MSHAP7, MSHA11 e MSHA12), formaram um *cluster* onde se encontraram misturados não aparecendo nenhum padrão evidente. Isso indica que estes haplótipos podem ter sido derivados de um ancestral comum.

Esta separação presente nas populações do Mato Grosso do Sul, pode indicar que estão estruturadas geneticamente quando comparadas às demais populações aqui estudadas.

3.2.3 Análise dos espécimes coletados no Estado do Mato Grosso do Sul

3.2.3.1 Estatísticas genômicas

Neste estado foi amostrada somente uma localidade em cada município. Devido a essa metodologia as populações foram comparadas entre elas.

Foram obtidas 47 sequências do fragmento do CitB com tamanho de 443 pares de base. Estas apresentaram 28 sítios polimórficos e 14 haplótipos encontrados, com diversidade haplotípica de 0.01827 e diversidade haplotípica de 0.883.

Os haplótipos encontrados estão descritos na Tabela 6. Não foi observado nenhum haplótipo dominante. A população de Ladário apresentou somente um haplótipo, H1

Tabela 6- Resumo das estatísticas genômicas do gene CitB encontradas para as populações de *Triatoma sordida* no estado de Mato Grosso do Sul. Separadas por locais de coletada.

	MIR	AQU	ALV	ANA	LAD
N	9	15	10	6	7
h	4	2	4	5	1
Hap_1					7
Hap_2	1				
Hap_3	6			1	
Hap_4	1				
Hap_5	1				
Hap_6		7			
Hap_7		8			
Hap_8			1		
Hap_9			4		
Hap_10			2		
Hap_11				1	
Hap_12				2	
Hap_13				1	
Hap_14				1	
Hd	0.583	0.533	0.778	0.933	0
π	0.00640	0.01565	0.017	0.02077	0
S	9	13	18	17	0
K	2.83	6.93	2.924	9.2	0
D	-0.0664	1.47**	1,15240	1.46	0
Fs	-0.93216	2.88**	0,00208	1.2961	0

N=número de indivíduos analisados, h=número de haplótipos encontrados, Hd=diversidade haplotípica, π =diversidade nucleotídica, S=número de sítios polimórficos, K=diferenças nucleotídica par a par, F's=valor da estatística F de Fu's, D= valor da estatística D de Tajima. *=valor de $p < 0,05$

Os testes de neutralidade Fu's F e Tajimas'D quando comparados considerando todas as populações como se fosse uma única não apresentaram significância estatística. Quando os testes foram realizados para cada população, observamos um valor estatístico significativo somente na população de Aquidauana, indicando que há algum fator não aleatório influenciando na evolução dessa população.

3.2.3.2 Estruturação Populacional

Os valores de F_{st} indicam que as populações se encontram altamente estruturadas entre elas, os valores variaram entre 0.11 entre Anastácio e Aldeia Limão Verde e 0.58 entre Aquidauana e Ladário. Os demais valores estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7- Matriz com valores de F_{st} par-a-par para populações de *T. sordida* do Mato Grosso do Sul.

	LAD	MIR	AQU	ALV
MIR	0.5663717			
AQU	0.5839745	0.3056680		
ALV	0.4570637	0.2171327	0.1468144	
ANA	0.4069592	0.1213389	0.1924024	0.1162791

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que as populações apresentam uma maior variação intra-populacional do que inter-populacional. O valor de phi total foi de 0.4129 (Tabela 8).

Tabela 8- Componentes de variação para AMOVA, percentagem de variação explicada em cada nível hierárquico por município amostrado.

	GL	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem
Entre populações	4	8.42	0.19	41.3
Dentro da cada população	42	11.9	0.29	58.70
Total	46	20.31	0.48	100

GL= Graus de liberdade

O teste de mantel foi realizado para verificar a hipótese de as populações estarem isoladas por distância. As populações se mostraram estar isoladas por distância ($R:0,64$, $p<0,05$).

3.2.3.3 Análise de rede de haplótipos

A rede de haplótipos (Figura 8) tem uma aparência mais difusa, e mesmo apresentando baixa frequência o haplótipo H2 encontrado nos exemplares coletados em Miranda, que pode ter dado origem aos demais, pois dele partem os ramos para a formação dos demais haplótipos. Por sua proximidade geográfica, os haplótipos da ALV e AQU estão agrupados mais próximos.

Figura 8- Rede genealógica de máxima parcimônia, mostrando a relação entre os haplótipos encontrados nas populações de *T. sordida* de Mato Grosso do Sul

3.2.4 Análise dos espécimes coletados em Posse, Goiás

3.2.4.1 Estatísticas genômicas

Nesta localidade foram amostrados quatro locais, totalizando 46 sequências, com tamanho de 383 pares de bases. Das quais, foi obtido um total de 15 sítios polimórficos, e 16 mutações. A diversidade nucleotídica geral foi de 0.00869, já a diversidade haplotípica geral de 0.825, havendo a presença de 13 haplótipos nas áreas estudadas.

Estes haplótipos estão bem distribuídos nas populações estudadas como observado na Tabela 9. As quatro populações apresentaram haplótipos exclusivos.

Tabela 9- Resumo das estatísticas genômicas encontradas para as populações de *Triatoma sordida* na cidade de Posse- GO. Separadas por locais de coletada.

	P3	P5	P6	P7
N	10	11	12	13
H	4	7	4	4
Hap_1	2			
Hap_2	1			
Hap_3	6	1		3
Hap_4	1			
Hap_5		5	3	7
Hap_6		1	7	
Hap_7		1		
Hap_8		1		
Hap_9		1	1	
Hap_10		1		
Hap_11			1	
Hap_12				2
Hap_13				1
HD	0.644	0.818	0.636	0.759
Π	0.00342	0.00722	0.00764	0.00817
S	5	8	7	7
K	1.311	2.764	2.924	3.128
D	-1,03527	0,00208	1,02352	1,46692
Fs	-0,686	0,00208	0,00208	1,10218

N=número de indivíduos analisados, h=número de haplótipos encontrados, Hd=diversidade haplotípica, π =diversidade nucleotídica, S=número de sítios polimórficos, K=diferenças nucleotídica par a par, F's=valor da estatística F de Fu's, D=valor da estatística D de Tajima. *=valor de $p < 0,05$

Os testes de neutralidade, Tajima'D teste e Fu's F teste foram todos não significantes.

3.2.4.2 Estrutura populacional

Os valores de *Fst* encontrados na população de Posse, indicam que, exceto por P5 e P7 (0.007), as populações amostradas estão estruturadas (Tabela 10).

Tabela 10- Matriz com valores de *Fst* par-a-par para populações de *T. sordida* de Posse- GO.

	P3	P5	P6	P7
P3	0			
P5	0.54907	0		
P6	0.28214	0.24920	0	
P7	0.38736	0.00781	0.14939	0

Os resultados obtidos através do teste da Análise Variância Molecular (AMOVA) mostram que, entre as populações do município de Posse, há baixa estruturação populacional com um valor de phi total de 0.198 (Tabela 11).

Tabela 11- Componentes de variação para AMOVA, percentagem de variação explicada em cada nível hierárquico por localidade amostrada.

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem
Entre população	3	3.997	0.085	19.86
Dentro da população	42	14.567	0.346	89.14
Total	45	18.565	0.432	100

GL= Graus de Liberdade

A população não apresenta o padrão de Isolamento por Distância ($R=0,54$
 $p=0,16$)

3.2.4.3 Rede de haplótipos

A topologia da rede apresentou 13 haplótipos que derivaram a partir de um único haplótipo (H3), possível ancestral. Desta forma, podemos admitir que as populações de *T. sordida*, aqui estudadas sofreram expansão populacional. (Figura 9)

Figura 9- Rede genealógica de máxima parcimônia, mostrando a relação entre os haplótipos encontrados nas populações de *T. sordida* de Posse- GO

3.2.5 Análise dos espécimes coletados em Januária, Minas Gerais.

3.2.5.1 Estatísticas genômicas

Para um total de 29 indivíduos, divididos em três populações distintas, do município de Januária foram amplificados fragmentos constituídos por 333 pares de base. Nesta amostra foi obtido um total de 4 sítios polimórficos com diversidade nucleotídica de 0.00192. Entre as três populações amostradas a diversidade haplotípica foi de 0.520.

Os sítios polimórficos das sequências obtidas originaram 6 haplótipos, com uma diversidade haplotípica que variou entre 0 a 0.900. O haplótipo 1 está presente em todas as populações (Tabela 12). Na população J12 foi observado somente a presença do haplótipo 1.

Tabela 12- Resumo das estatísticas genômicas encontradas para as populações de *Triatoma sordida* na cidade de Januária-MG. Separadas por locais de coletada.

	J10	J11	J12
N	12	5	12
h	3	4	1
Hap_1	7	1	12
Hap_2	2		
Hap_3	3		
Hap_4		2	
Hap_5		1	
Hap_6		1	
Hd	0.621	0.900	0
π	0.00214	0.00420	0
S	2	3	0
K	0.712	1.4	0
D	0.21992	-0.1745	0
F	0.027	-1.648	0

N=número de indivíduos analisados, h=número de haplótipos encontrados, Hd=diversidade haplotípica, π =diversidade nucleotídica, S=número de sítios polimórficos, K=diferenças nucleotídica par a par, F's=valor da estatística F de Fu's, D= valor da estatística D de Tajima. *=valor de $p < 0,05$

Os testes de neutralidade, Tajima'D teste e Fu's F teste, nas duas populações polimórficas, J10 e J11, foram todos não significantes.

3.2.5.2 Estrutura populacional

Os valores de F_{st} encontrados entre as populações J10 e J11 foi de 0.19793, entre J10 e J12, de 0.14545 e entre J11 e J12, 0.3. Indicando nesse caso que há estruturação moderada entre as populações.

A Análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 13) apresentou uma grande variação dentro de cada população amostra, contribuindo com 68,79% da variação. Entre cada população a variação foi menor, 31,21%. O valor phi total obtido nessa análise foi de 0.3121, indicando uma estruturação moderada entre as populações.

Tabela 13- Componentes de variação para AMOVA, percentagem de variação explicada em cada nível hierárquico por localidade amostrada

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem
Entre população	2	2.059	0.091	31.21
Dentro da população	26	5.216	0.200	68.79
Total	28	7.275	0.291	100

3.2.5.3 Rede de Haplótipos

A análise de rede de haplótipos (Figura 10), mostrou um nó principal constituído pelo H1 que contém toda a população J12 e alguns indivíduos das populações J10 e J11. A partir desse nó partem quatro nós derivados desse haplótipo. O haplótipo H6 é derivado do haplótipos H5. Para estas amostras, admitimos que, o H1 seja o haplótipo ancestral.

Figura 10- Rede genealógica de máxima parcimônia, mostrando a relação entre os haplótipos encontrados nas populações de *T. sordida* na cidade de Januária-MG.

3.3 Discussão

Neste trabalho verificamos a variabilidade do formato alar em populações de *T. sordida* ao longo de um eixo Leste-Oeste dentro do Brasil, envolvendo os estados da Bahia, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. As populações apresentaram um formato heterogêneo, indicando um formato correspondente para cada local de coleta.

Para análises moleculares, que envolveram outras populações amostras, encontramos os primeiros dados para a variação haplotípica para populações de *T. sordida* no Mato Grosso do Sul. Quanto à totalidade dos haplótipos encontrados percebemos uma separação entre alguns haplótipos encontrados no Mato Grosso do Sul com os demais. As análises de estruturação populacional indicaram populações altamente estruturadas.

3.3.1 Análise morfométrica das asas

Quando se analisa o tamanho em estudos morfométricos, entende-se que esta característica é modulada mais por condições ambientais na quais o inseto está inserido do que determinantes genéticos⁴¹. Percebemos essa influência quando observamos a variação das populações BA1 e BA3 (Figura 4). Essas populações estão em regiões com padrões ambientais similares (região de cerrado baiano) e por isso apresenta pouca variação no tamanho do centroide de seus indivíduos.

As amostras, em sua maioria, foram obtidas em galinheiros, com isso a fonte alimentar para os indivíduos foi basicamente a mesma. Já é sabido que tanto

as influências nutricionais quanto ambientais podem afetar no desenvolvimento e tamanho do inseto, e por consequência o formato alar^{21,82}.

A morfometria geométrica além de refletir a influência do ambiente nas estruturas analisadas, pode ser considerada como um *proxy* da variação genética, pois a forma é considerada um caractere poligênico⁸³. Como é sabido os inseticidas podem influenciar a seleção de genótipos que apresentam resistência as substancias inseticidas⁸⁴. E indiretamente pode selecionar determinados formatos alares. Esse fato pode ser observado em algumas populações aqui estudadas, como MS1 e TO1, que apresentaram um formato alar diferente dos demais. Essas populações foram estudadas quanto a sua resistência a inseticida no trabalho de Obara *et al.*⁸⁵, que encontraram algumas populações, dentre elas MS1 e TO1, com maior probabilidade de evolução de resistência quando comparadas com a população de referência. Isso mostra uma possível seleção de um formato alar específico.

A grande similaridade entre os formatos alar de uma forma geral pode ser creditada a plasticidade fenotípica que esses insetos apresentam⁵⁰. A plasticidade fenotípica é a capacidade de um genótipo produzir fenótipos diferentes em resposta a diferentes mudanças ambientais⁸⁶. Isso corrobora com os dados obtidos na comparação da variação do formato alar, pois cada população apresenta uma variação pequena quando comparada com outras e no entanto, quanto analisadas todas juntas, como na análise de variável canônica (Figura 6), não há uma distinção muito clara entre as populações. Esse tipo de adaptação tem uma grande importância, pois melhora a resposta adaptativa da espécie ao nicho ecológico em que vive e pode levar ao processo de especiação⁸⁷.

3.3.2 Análise Filogeográfica

A distribuição de *T. sordida* é bem ampla, sendo encontrado em grande parte da região central do Brasil⁸⁸. Essa é uma das regiões que mais sofrem impactos ambientais devido ao uso da terra para a agricultura. Este uso causa fragmentação no habitat natural dos triatomíneos, porém pode fornecer ambientes favoráveis ao *T. sordida*, como casca de árvores secas e pilhas de madeira, permitindo a esse triatomíneo resistir às mudanças climáticas locais^{88,89}.

Desta forma, o fluxo gênico entre as populações silvestres de *T. sordida* torna-se limitado. Em escala macrogeográfica, alguns trabalhos com outras espécies de triatomíneos suportam essa hipótese. Borges *et al.*⁹⁰ observaram estruturação genética entre populações domiciliadas de *Triatoma brasiliensis*, dos Estados de Pernambuco e Ceará utilizando três marcadores diferentes: RAPD, isoenzimas e Morfometria Geométrica.

Em *Panstrongylus megistus* utilizando dois marcadores de DNA mitocondrial, ITS-1 e ITS-2, também foi observado a estruturação das populações da região sul, onde espécimes de Rio Grande do Sul compartilhavam somente um haplótipo com espécimes do Paraná, os demais haplótipos encontrados formaram um grupo entre os demais estados estudados⁹¹.

Em trabalho semelhante ao apresentado aqui, também com *T. sordida* e o gene CitB, como marcador, em populações do Estado de Minas Gerais, Pessoa *et al.*⁵⁹ indicaram possíveis fatores que contribuem para o padrão encontrado: o isolamento geográfico; a distribuição focal dos indivíduos; a baixa capacidade de dispersão dos triatomíneos e o ciclo de vida longo de suas espécies.

Esses fatores vão de encontro à teoria proposta por Avise *et al.*⁹² que a partir de análises utilizando fragmentos de DNA mitocondrial, propõe quatro

teorias de estruturação populacional: 1) Descontinuidade Filogenética com separação espacial; 2) Descontinuidade Filogenética sem separação espacial; 3) Continuidade Filogenética com separação espacial e 4) Continuidade Filogenética sem separação espacial. O presente resultado corrobora com a hipótese de Continuidade Filogenética com separação espacial, pois, as populações aqui estudadas não apresentaram muita variação molecular entre as populações. Isto nos leva a crer que podemos inferir que *T. sordida* ainda se encontra em unidade *panmítica*, na qual existe várias subpopulações de uma espécie em uma grande área⁹³

Essa separação espacial pode levar ao processo de especiação, em que há a formação de novas espécies partindo da premissa do isolamento geográfico e reprodutivo. Como é sabido, *T. sordida* tem uma ampla distribuição na América do Sul, sendo encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai e Bolívia⁹⁴.

Devido a essa ampla distribuição geográfica alguns autores admitem que a espécie *T. sordida* seja na verdade um complexo de espécies crípticas. Noireau *et al.*⁹⁵ em estudos com marcadores isoenzimáticos conseguiu distinguir dois grupos de *T. sordida* na Argentina, onde estes grupos apresentaram grande distância genética e algumas diferenças morfológicas, além de comportamentos distintos. Panzera *et al.*⁹⁶ apontaram, por meio da citogenética, que, as populações de *T. sordida* que ocorrem no Brasil, correspondam a *T. sordida stricto sensu*. Nos resultados aqui encontrados, a análise de Neighbor-Joining, aponta para uma possível separação geográfica das populações estudadas, mas, não implicando necessariamente, em um processo de especiação. Já foi verificado por meio da morfometria geométrica alar, que em populações de *T. sordida* amostradas ao longo da região central do Brasil, não há indícios desta especiação e que por essa técnica, esta espécie ainda se encontra em unidade *panmítica*⁹⁷.

Os resultados das populações aqui estudadas indicam que a possível origem de dispersão foi a partir de Minas Gerais e Goiás, uma vez que no agrupamento obtido pela NJ, os haplótipos de Posse e Januária apresentam uma origem comum bem como nessas amostras apresentam uma grande diversidade haplotípica. A partir dessa análise inferimos que as populações estejam em expansão partindo de um dos possíveis centros de dispersão preconizados por Forattini⁸⁸ que seriam áreas descampadas na região do Cerrado.

3.3.3 Diversidade haplotípica

A diversidade haplotípica encontrada nesses locais de estudos corroboram com resultados semelhantes observados em *T. dimidiata*⁹⁸, *T. sanguisuga*⁹⁹ ou, mesmo em *T. sordida*⁵⁹. Essa grande diversidade pode ter implicações nas medidas efetivas de controle desse vetor, uma vez que a aplicação de inseticida pode selecionar espécimes que apresentem genes que favoreçam a resistência a inseticida.

Quando observamos somente as populações coletadas no estado do Mato Grosso do Sul, encontramos uma variação haplotípica muito alta dentro de cada população estudada, não sendo observado a presença de um haplótipo dominante, contrastando com resultado obtido em 14 populações provenientes de MG do trabalho de Pessoa *et al.*⁵⁹ e das populações de Januária, onde foram encontrados a presença de haplótipos dominantes. Essa diferença, na distribuição dos haplótipos dessas populações, pode estar relacionada com as medidas de controle utilizadas em cada estado. Em Minas Gerais, o controle da dengue e leishmaniose ocorre concomitantemente e acabam influenciando no controle de triatomíneos. Também há a possibilidade de os moradores dessas regiões estarem, eles mesmos, fazendo o controle dos barbeiros utilizando doses de

veneno sem averiguação correta¹⁰⁰. A presença de um grande número de haplótipos privados pode indicar um limitado fluxo gênico¹⁰¹.

A população de Ladário, não apresentou diversidade haplotípica, contendo somente um haplótipo, o mesmo acontece na população J12 de Januária. Esse resultado pode ter vários fatores, como a presença do efeito fundador ou de deriva genética nessa amostra, ou o efeito gargalo, que consiste em um único haplótipo restante após eliminação dos demais existentes. Essa situação é comum em triatomíneos, uma vez que esta população é proveniente de galinheiros, e a mesma pode ter sido originada de uma única fêmea sobrevivente, após aplicação de inseticida¹⁰⁰. Resultados similares foram encontrados por Monteiro *et al.*¹⁰², quando foram analisados os padrões alozimáticos de populações de *T. sordida* em galinheiros, no estado de Minas Gerais, incluído uma população do município de Januária.

Apesar das amostras apresentarem baixa diversidade nucleotídica (Posse: 0.00342 a 0.00817; Januária: 0.00214 a 0.00642), ambas apresentaram alta diversidade haplotípica (Posse: Hd entre 0.636 a 0.818, Januária: Hd de 0 a 0.9). Esses resultados corroboram com valores encontrados para outras espécies de triatomíneos tanto em ecótopos silvestres, quanto no peri-domicílio^{99,103}. A diversidade encontrada em amostras do peri-domicílio, pode ser resultante da recolonização dos galinheiros por indivíduos silvestres, após medidas de controle.

Quando uma espécie apresenta alta diversidade haplotípica, subentende-se que, a mesma, possa apresentar melhor chance de adaptação ao meio em que vive. Como resultado prático, essa alta diversidade haplotípica pode influenciar nas medidas de controle, uma vez que isso pode aumentar a chance de encontrar insetos naturalmente resistentes ao inseticida utilizado^{59,104}. Como demonstrado

por Obara *et al.*⁸⁵ onde a população de *T. sordida* proveniente da cidade de Posse, Goiás, apresentou alta probabilidade de mostrar resistência a inseticida, deltametrina.

3.3.4 Estruturação Populacional

Em ambos municípios estudados, Posse e Januária, as análises de estruturação populacional, em escala micro-geográficas, demonstraram grande diversidade haplotípica. Em Januária temos um haplótipo dominante e alguns alelos raros. Já em Posse obtivemos um número maior de haplótipos, mesmo havendo divisão entre as quatro áreas estudadas, mas não houve a presença de um haplótipo dominante.

Essa estruturação entre as localidades estudadas, tanto no município de Posse, quanto em Januária também é confirmada pelos altos valores de *Fst* obtidos entre elas. De acordo com Brenière *et al.*¹⁰⁵, a estruturação encontrada em populações no peri-domicílio é um provável resultado da combinação do efeito fundador: que consiste na formação de uma nova população a partir de um número reduzido de indivíduos ou em uma seleção não aleatória dos genes de uma população. E deriva genética: processo pelo qual as frequências alélicas são modificadas através de processos aleatórios⁶¹.

Quando observado os valores de *Fst* encontrados no município de Posse, notamos que apenas duas populações não se encontram estruturadas, P5 e P7 (*Fst* 0.007). Essas populações distam uma da outra em 12 quilômetros de distância. Cabe ressaltar que o valor de *Fst* encontrado entre P5 e P6, foi bem mais elevado (0.24920) e essas localidades estavam separadas por menos de 500m distância. De acordo com Futuyma e Peterson¹⁰⁶ a diferenciação genética entre populações depende do balanço entre o fluxo gênico e influencia

diversificadora da deriva genética e seleção natural. Isso nos leva a pensar que entre as populações P5 e P7 mesmo distantes tenham sofrido pressões seletivas que resultaram em uma população mais próxima geneticamente.

A alta diversidade haplotípica reflete-se também, no teste de variância molecular, uma vez que a variação intra-populacional, encontrada nas amostras estudadas, foi alta, enquanto a variação, entre as populações, muito baixa. Como se trata de uma espécie com ampla área de ocorrência é muito provável que sua alta variabilidade local seja devida a constantes reintroduções de indivíduos provenientes do ambiente silvestre, buscando refúgio e alimento⁵⁹. No estudo de Breniere *et al.*¹⁰⁵ com *Meccus palidipenis*, foi encontrado resultado similar, utilizando marcadores microssatélites, em relação às populações do peri-domicílio nas quais os autores concluíram ocorrer estruturação das populações. Com espécimes analisados de *Triatoma maculata* utilizando outro marcador mitocondrial, o gene ND4, também foi observada alta diversidade haplotípica, determinando forte estruturação populacional entre localidades da Colômbia¹⁰⁷. Na Venezuela, o marcador CitB apontou que espécimes silvestres de *R. prolixus* são responsáveis pela re-colonização do ambiente peri-domiciliar, a partir insetos que se movem das palmeiras para as casas¹⁰⁸.

3.3.5 Neutralidade

De todos os testes de neutralidade realizados neste trabalho, apenas a população de Aquidauana apresentou valores significativos estatisticamente para ambos os testes, Tajimas'D e Fu's. A significância encontrada faz rejeitar a hipótese nula prevista nas premissas do teste, que seria de as populações não sofrerem nenhum tipo de pressão de seleção⁷⁴. Portanto, isso nos levar a hipotetizar que para esta população algum fator externo esteja direcionando a

evolução, como alguma característica ambiental daquele micro-habitat, ou seleção através de indivíduos resistentes ao inseticida. Já as demais populações, para as quais não foram encontrados valores significativos, ou estão em processo de expansão populacional ou ocorreram poucas mutações deletérias indicando haver pouca pressão seletiva atuando nessa espécie¹⁰⁹.

Tendo essa espécie como a mais frequente encontrada em Minas Geras e Goiás e vivendo tão próxima às habitações humanas a chance de invasão e posterior domiciliação se torna um risco real¹¹⁰. Apesar de *T. sordida* não ser encontrado com frequência no intra-domicílio, os relatos da ocorrência da espécie neste ambiente são cada vez mais frequentes, e mesmo que a taxa de infecção por *T. cruzi* desse triatomíneo seja de apenas 0,6% no município de Posse¹¹¹, a grande chance de contato entre o homem e o vetor aumenta o risco de transmissão do parasita. Em nossa experiência, registramos a ocorrência de *T. sordida* em todos os municípios visitados.

Nossos resultados, implicam também nas medidas de controle adotadas para esse vetor. Devido à grande variabilidade genética observada em *T. sordida*, é necessário um melhor entendimento da sua estruturação populacional para que se possa entender melhor a dinâmica de infestação e reinfestação, desse vetor, no peri-domicílio e intra-domicílio levando em conta as características moleculares dos insetos existentes em cada área.

4 *Triatoma costalimai*

4.1 Material e Métodos

4.1.2 Caracterização das áreas de coleta

Para a obtenção de exemplares de *Triatoma costalimai*, foram escolhidas áreas de coleta onde já havia sido notificada a presença desse triatomíneo^{30,112,113}.

Posse, Goiás - Município localizado na região noroeste do estado de Goiás. Foram visitadas áreas rurais nesse município. Nessas áreas procuramos por afloramentos rochosos naturais. As rochas encontradas nessas áreas são do tipo calcária e as formações vegetais são do tipo “Mata Secas Sempre-verde” e “Florestas Semidecíduas” interligadas às rochas²⁸. O entorno também apresenta muita vegetação (Figura 11), contribuindo com o sombreamento das rochas

Figura 11- Fotos dos locais onde foram encontrados exemplares de *T. costalimai* em Posse-GO. Contexto no qual as rochas estão inseridas. Fonte: Daniel Pagotto Vendrami, 2014.

Carmo do Rio Verde, Goiás - Município localizado na região central do estado de Goiás. Neste município também foram visitadas áreas rurais, com afloramentos rochosos naturais. Diferentemente do município de Posse, essas formações rochosas são do tipo sedimentar. Estão inseridas também num contexto de cerrado rupestre, mas com pouca vegetação entrelaçada as pedras (Figura 12), deixando as rochas mais expostas ao sol.

Figura 12- Perfil da paisagem em Carmo do Rio Verde-GO. Rochas em que foram encontrados exemplares de *Triatoma costalimai*. Fonte: Daniel Pagotto Vendrami, 2016.

São Desidério, Bahia - Município localizado na região noroeste do estado da Bahia, inserido no bioma Cerrado. Foram visitadas duas áreas que apresentavam afloramentos rochosos naturais, com vegetação característica e entrelaçada às pedras (Figura 13).

Figura 13- Perfil da Paisagem em São Desidério onde foram capturados exemplares de *Triatoma costalimai*. Daniel Pagotto Vendrami, 2016

Januária, Minas Gerais - Localizado na região do médio São Francisco, com uma população estimada em 68.000 habitantes, com uma área de 6 691,174 km², e grande atividade rural (Figura. 14).

Figura 14- Perfil da paisagem investigada em Januária -MG para a coleta de *Triatoma costalimai* Daniel Pagotto Vendrami, 2015

A Figura 15 apresenta a posição geográfica dos municípios estudados em relação ao território brasileiro.

Figura 15. Mapa do Brasil indicando as cidades nas quais foram realizadas as coletas de exemplares de *Triatoma costalimai*. Este mapa foi criado usando o programa DIVA-GIS (<http://www.diva-gis.org>).

4.1.3 Coleta e Identificação

Em cada cidade estudada as saídas a campo foram feitas durante três dias consecutivos, no período vespertino. Com exceção do município de São Desidério, onde além das coletas diurnas foram realizadas 2 coletas noturnas, compreendendo o período de três horas após o crepúsculo, com o objetivo de aumentar o número de espécimes coletados.

A busca ativa nos afloramentos rochosos e no peri-domicílio foi realizada com o auxílio de agentes de saúde de cada município estudado e três pesquisadores. Para a investigação nas rochas, foram utilizados os seguintes materiais: para a remoção de grandes blocos rochosos foi utilizado uma barra de ferro como alavanca; marreta e talhadeira para quebrar algumas rochas sobrepostas. Uma vez detectado a presença de triatomíneos, estes foram capturados utilizando pinças entomológicas e armazenados em recipientes plásticos para transporte (Figura 16).

Figura 16- Coleta de exemplares de *T. costalimai*. A: Exploração de rochas em Posse-GO. B: Metodologia de exploração das frestas de rochas (Posse-GO), C: Captura de triatomíneos, D: Exemplo de fragmentação de rocha no município de Carmo do Rio Verde- GO. Fonte: Daniel Pagotto Vendrami, 2017.

Os exemplares coletados foram trazidos ao Laboratório de Entomologia em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP), e identificados utilizando a chave proposta por Lent e Wygodzinsky²⁰.

Posteriormente, os indivíduos foram contabilizados e separados por sexo, estágio. Alguns exemplares coletados nas cidades de Posse e Carmo do Rio Verde foram direcionados para a Universidade de Brasília na tentativa de formação de colônia da espécie.

4.1.4 Variação Morfológica

Os exemplares adultos, após serem mortos por congelamento, foram montados em posição natural do corpo, como se estivessem vivos, e fotografados em posição dorsal, e com enfoque na região abdominal dorsal, utilizando um estereomicroscópio Leica M205C com câmera digital acoplada com aumento de 0,7x.

4.1.5 Análise de morfometria geométrica

Para essa análise utilizamos duas estruturas bem estabelecidas na literatura: asa (hemélitro) direita e a cabeça.

As asas direitas dos adultos coletados foram retiradas com o auxílio de pinça, e montadas entre lâmina e lamínula e utilizando Bálsamo do Canadá para a fixação. Já as cabeças foram fotografadas diretamente no triatomíneo. A quantidade de espécimes utilizados está descrita na Tabela 14.

Tabela 14- Número de asas e cabeças utilizadas para análise de morfometria geométrica dos exemplares de *T. costalimai*, separada por origem.

Município	Origem	Asa	Cabeça
Posse	Silvestre	15	7
	F1	5	13
Carmo do Rio Verde	Silvestre	5	5
	F1*	6	6
São Desidério	Silvestre	9	8

*=espécimes que tiveram o desenvolvimento para a fase adulta em colônia

Para a digitalização dos marcos anatômicos das asas e da cabeça foi utilizado o software TPSdig⁶⁵. Nas asas foram selecionados 9 marcos anatômicos entre os sugeridos por Schachter-Broide⁴⁷ (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 13). Já para os marcos anatômicos da cabeça foram utilizados 10 marcos anatômicos como indicado na Figura 17.

Figura 17- Marcos anatômicos utilizados para as análises morfométricas dos exemplares de *T. costalimai*. A: marcos da asa. B: Marcos da cabeça. Fonte: Daniel Pagotto Vendrami, 2017

Para análise exploratória dos dados foi realizada a Análise de Componentes Principais (ACP), baseado na matriz de covariância. Indivíduos de cada área de coleta foram projetado sobre os dois principais eixos CP1 e CP2 para detectar a variabilidade dos formatos alar e da cabeça.

A comparação entre os grupos amostrados foi feita utilizando a Análise de Variável Canônica (ACV) que ressalta as características de cada formato em cada grupo para uma melhor distinção entre eles ⁶⁶. Também foi realizado o teste de Análise da Função Discriminante (AFD) para a comparação par-a-par dos grupos estudados. A confiabilidade deste teste foi medida através do teste de validação cruzada.

Foi gerada uma matriz de Distância de Procrustes (DP) entre os grupos para a comparação da distância real entre as nuvens de pontos de cada localidade. A significância estatística foi obtida através do teste de permutação.

Para a comparação do tamanho das estruturas analisadas foi utilizado o estimador isométrico Tamanho do centroide (TC), que é definido pela raiz quadrada da soma das distâncias elevadas ao quadrado entre o centro e os pontos ⁶⁷. Para esta análise foram utilizados somente os triatomíneos coletados em campo, pois os de colônia podem ter sofrido influência da criação, fonte alimentar e condições microclimáticas, os quais podem modular o tamanho ⁵⁰.

As variações da forma e do tamanho das estruturas entre as populações analisadas foram medidas por meio do teste da análise de variância (ANOVA). A comparação par-a-par das variâncias foi feita por meio do teste *post-hoc* de Tukey's

O efeito da influência do tamanho no formato alar (alometria) foi verificado por meio de regressão múltipla utilizando a forma como variável dependente e o tamanho do centroide como variável independente.

Para as análises da morfometria geométrica da cabeça foram utilizados somente o componente simétrico, pois essa estrutura apresenta simetria bilateral e a informação pode ser decomposta em componente simétrico e assimétrico⁶⁶, afim de diluir o efeito posicionamento das cabeças, assimetria e erros de medidas.

Todas as análises descritas acima foram feitas utilizando o programa *morphoJ* v1.02e ⁶⁶.

Para verificar se as populações estão isoladas por distância, foi realizado o teste de Mantel, utilizando a matriz de Distância de Procrustes *versus* Distância Geográfica (Km) no programa Past ver1.89 ⁶⁸.

4.1.6 Análise Molecular

4.1.6.1 Caracterização das sequências de DNA

Para a análise molecular, os exemplares foram levados até o Laboratório de Entomologia em Saúde Pública – FSP/USP, e a extração do DNA foi feita utilizando-se do tecido abdominal de cada espécime. A extração foi feita utilizando o Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Crawley, United Kingdom) seguindo o protocolo do fabricante. O número de espécimes analisados está descrito na Tabela 15

Tabela 15- Exemplares de *T. costalimai* utilizados para estudos moleculares. Código de identificação das populações, estadio de vida e gene amplificado

Município	Identificação	Estadio		Gene amplificado
		Adulto	Ninfa	
Posse				
	P9	1		16S
	P10	1		16S
São Desidério				
	SD	1	36	16S
Carmo do Rio Verde				
	Carmo		1	16S/CitB
	PSM		10	16S
	MA		8	16S
	PS		16	16S
Januária				
	Januária	1		CitB

Ambas as reações de amplificação foram montadas a partir do DNA genômico extraído com volume final de 20 µL, utilizando-se 1,0 µL de DNA da amostra, 4 µL de 5x FIREpol Master mix, 13 µL de água ultrapura e 1 µL dos oligonucleotídeos [10mM]

Para o gene 16S os oligonucleotídeos foram utilizados de acordo com LYMAN *et al.*⁶⁹, e denominados aqui como: 16SF 5' CAT CTG TTT A(A/T)C AAA (A/G)AC AT 3', e 16SR 5' AAA AAA ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG TAA 3'. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador My Cycler_ (Bio-Rad) com os ciclos de temperatura programados para: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 seg (para desnaturação), 50°C por 1 min (para anelamento), 72°C por 1 min (para extensão), com um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min.

Para o gene Citocromo b (CitB), foram utilizados os oligonucleotídeos denominados CitBFor: 5' GGA CAA ATA TCA TGA GGA GCA ACA G 3', e CitBRev: 5' ATT ACT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G 3'⁶⁹ em termociclador My Cycler_ (Bio-Rad) com os ciclos de temperatura programados para: 1 ciclo de 94°C por 5 min, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 min (para desnaturação), 45°C por 1 min (para anelamento), 72°C por 2 min (para extensão), com um ciclo de extensão final de 72°C por 10 min.

Após a amplificação dos genes, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo SAMBROOK *et al.*⁷⁰, para a visualização das bandas.

4.1.6.2 Sequenciamento

Foram feitas as reações de sequenciamento nos dois sentidos (*forward* e *reverse*) com o kit comercial ABI Prism dGTP Big Dye® Terminator v3.1 (PE Applied Biosystem, Warrington, UK). Para os genes utilizados nesse estudo foram utilizados 1.0µL (10µm) do oligonucleotídeo, aproximadamente, 20ng de DNA em 1ul de amostra. Essas reações foram feitas em termociclador My Cycler (Bio-Rad) com os ciclos de temperatura programados para: 96°C por 2min seguidos de 35 ciclos de 45s a 96°C, 30s a 50°C, 4 min a 60°C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C até a precipitação. Para a precipitação, em cada reação de sequenciamento foram adicionados 100 µL de etanol 100% com 3 M de acetato de sódio, e incubados no gelo por 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 30 min na velocidade de 4.000 rpm a TA. O álcool com acetato foi removido invertendo-se os tubos e, a seguir foram adicionados 200µl de etanol gelado 70% e as amostras foram novamente centrifugadas por 30min a 4.000 rpm a T.A. Todo o etanol foi removido com o auxílio de uma micropipeta. As amostras foram secas a 95°C e corridas em sequenciador automático ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer/HITACHI na Rede Premium da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Cada par de sequências foi alinhado utilizando o software MUSCLE⁷¹ para obter uma melhor qualidade das sequências analisadas.

4.1.7 Análise Genética

Quando foi obtida mais de duas sequências de cada local amostrado, utilizou-se o programa DNAsp v.5⁷² para a verificação dos haplótipos existentes.

A partir das sequências obtidas foi montada uma matriz de distância utilizando o modelo de Kimura 2 parâmetros, para a verificação da distância genética entre os espécimes, para cada gene estudado.

A análise de Máxima Verossimilhança foi conduzida após a seleção de modelo mais adequado. Todas essas análises foram feitas utilizando o programa MEGA 6⁸¹.

A inferência Bayesiana foi realizada utilizando o programa Mr. Bayes¹¹⁴, com 1.000.000 replicações da cadeia de Monte Carlo e sendo amostrada uma árvore a cada 1000. O melhor modelo evolutivo foi escolhido no programa *jmodeltest*.¹¹⁵.

Para a realização das análises descritas acima foram incluídos exemplares de *Triatoma costalimai* e dos triatomíneos pertencentes aos subcomplexos: *matogrossensis*, *infestans*, *maculata*, *rubrovaria*, *brasiliensis* e *sordida*, e foram utilizados como *outgroup* as sequências de *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma delpontei* existentes no *genbank*¹¹⁶ descritos na Tabela 16.

Foram cedidos dois exemplares adultos de *Triatoma costalimai* do município de Mambáí- Goiás, para análises genéticas, pelo Prof. Dr. Rodrigo Gurgel Gonçalves, pesquisador da Universidade da Brasília, além de uma sequência de *T. costalimai* do gene *Citb* oriundo da Bolívia, denominada COCHIS, pelo Dr. Etienne Waleckx.

Tabela 16- Espécie de triatomíneos e número de acesso das sequencias dos genes 16S e CitB no genbank

Espécie	16S	CitB
<i>Triatoma garciabesi</i>	KC249006.1	KC249249.1
<i>Triatoma pseudomaculata</i>	KC249057.1	KC249277.1
<i>Triatoma jatai</i>	KT601153.1, KT601155.1, KT601154.1	
<i>Triatoma williami</i>	KT601157.1	KC608981.1
<i>Triatoma matogrossensis</i>	KC249036.1	KC249272.1
<i>Triatoma sordida</i>	KC249077.1	KC249291.1
<i>Triatoma guasayana</i>	KC249010.1	KC249252.1
<i>Triatoma wygodzinskyi</i>	KC249091.1	
<i>Triatoma costalimai</i>	KT601152.1 KT601151.1 KC248998.1* KC248997.1 AY035459.1	KC249246.1* KC608975.1 KC249247
<i>Triatoma vanda</i>	KC249084.1	KC249298.1 KC249300.1
<i>Triatoma jurbergi</i>	AY035456.1	KC249264.1
<i>Triatoma rubrovaria</i>	KC249067.1	GQ398005.1
<i>Triatoma baratai</i>		KC249238.1
<i>Triatoma guazu</i>		KC608976.1
<i>Triatoma delpontei</i>	KC249001.1	
<i>Triatoma circummaculata</i>	KC248994.1	KC249245.1
<i>Triatoma maculata</i>	AF324524.1	
<i>Triatoma carcavallo</i>	KC248990.1	
<i>Rhodnius pictipes</i>	KC249057.1	

4.2 Resultados

Exemplares de *T. costalimai* foram encontrados em todos os municípios pesquisados (Tabela 17). Em sua maioria, os exemplares foram encontrados em ambientes silvestres. Em São Desidério foram encontrados também exemplares no intra-domicílio. Na cidade de Januária, a busca ativa nas áreas silvestres foi negativa e o único exemplar obtido em um Posto de Informação de Triatomíneos (PIT), localizado no bairro Brejo do Amparo.

4.2.1 Variação Morfológica

Nos locais onde foram encontrados exemplares da espécie *T. costalimai*, foi possível observar uma diferença no padrão da coloração do inseto e do conexivo (Figura 18). Nas localidades de São Desidério e Posse, o conexivo apresentou manchas alaranjadas de forma continua chegando na sutura do conexivo. Os espécimes coletados em Carmo do Rio Verde e o exemplar de Januária, apresentaram o conexivo com uma pequena mancha alaranjada (Figura 19).

Tabela 17- Dados gerais das coletas dos exemplares de *T. costalimai*, de acordo com Município, Código de Identificação (ID), Ecótopo, Indivíduos coletados (IC), localização georreferenciada e data da coleta.

Município	ID	Localidade	Ecótopos	IC	GPS	Data
Posse						
	P8	Jatobá de Baixo	Silvestre (rochas)	5(N)	S 14° 10' 37.4" W 46° 22' 34.7"	10/12/2014
	P9	Jatobá de Baixo	Silvestre (rochas)	6(N)	S 14° 10' 34.4" W 46° 22' 31.8"	10/12/2014
	P10	Jatobá de Baixo	Galinheiro	17(N)	S 14° 11' 40.5" W 46° 22' 41.7"	11/12/2014
	P11	Jatobá de Baixo	Silvestre (rochas)	3(N)	S 14° 11' 40.5" W 46° 22' 41.7"	11/12/2014
São Desidério						
		Baixo dos Coqueiros	Intra (Cozinha)	1(A)	S 12°29'21.4" W 044°55'13.1"	01/08/2016
		Baixo dos Coqueiros	Intra (Quarto)	1(A)	S 12°29'17" W 044°55'18"	01/08/2016
		Brejo		1(A)	S 12°30'49.1" W 044°54'34.6"	01/08/2016
São Desidério						
		Lamirin	Intradomicilio (Quarto,Sala, Cozinha**)	4(A)	S 12°29'55.7" W 044°54'54.9"	01/08/2016
		Baixo dos Coqueiros	Intradomicilio (Sala)	1(A)	S 12°29'20.9" W 044°55'18.8"	02/08/2016
	SD	Baixo dos Coqueiros	Silvestre (rochas)	40(10A/30N)	S 12°29'55.6" W 044°54'55.2"	02/08/2016
		Baixo dos Coqueiros	Intradomicilio	2(A)		04/08/2016
		Baixo dos Coqueiros	Silvestre (rochas)	20(1A/19)	S 12°29'55.6" W 044°54'55.2"	04/08/2016
Carmo do Rio Verde						
	Carmo	Pedra Solta	Silvestre (rochas)	3(2A/1N)	S 15° 29' 25.9" W 49° 51' 06.4"	13/06/2016
	PSM	Pedra Solta	Silvestre (rochas)	25(7A/18N)	S 15° 28' 39.6" W 49°51'16.9"	14/06/2016
	MA	Morro Alegria	Silvestre (rochas)	10(N)	S 15° 27' 52.8" W 49°50'20.9"	14/06/2016
	PS	Pedra Solta 1	Silvestre (rochas)	36(10A/26N)	S 15° 30' 05.0" W 49° 49' 46.2"	15/06/2016
Januária						
	Januária	Brejo do Amparado	Doado	1 (A)		

Entre parêntese estão o número de espécimes coletados separados entre: ninfa N e adultos A. **restos de triatomíneos adultos neste cômodo.

Figura 18- Exemplos de *T. costalimai* capturados. Diferentes padrões de conexivo. A: Posse, B: São Desidério; C: Carmo do Rio Verde, D: Januária E: *Triatoma costalimai* Tipo – Taquatinga – Goiás.

Figura 19- Tipos de conexivos encontrados nos exemplares de *T. costalimai*. A: São Desidério, B: Posse, C: Carmo do Rio Verde

4.2.2 Análises de Morfometria Geométrica

4.2.2.1 Asas

4.2.2.1.1 Tamanho

Os valores médios encontrados para o tamanho do centróide (TC) foram de 2,83mm para os espécimes de São Desidério, 2,67mm para os exemplares de Carmo do Rio Verde e 2,87mm para os encontrados em Posse. O teste de ANOVA mostrou uma diferença significativa nas formas das asas $F=3,482$, $df=2$, $p=0,04514$. O teste de comparação par-a-par de Tukey's, mostrou diferenças estatisticamente significativa ($p<0.05$) entre as amostras de Carmo do Rio Verde e Posse (Tabela 18; Figura 20).

Tabela 18- Comparação par-a-par da variação do tamanho do centroide dos exemplares de *T. costalimai*, pelo teste Tukey's *post-hoc*

	Carmo do Rio Verde	Posse	São Desidério
Carmo do Rio Verde		0,027	0,082
Posse	3,883		0,8697
São Desidério	3,169	0,7139	
Na diagonal inferior tem o valor de comparação das médias. Na diagonal superior os valores do teste de significância. Em negrito valores significativos

Figura 20- *Boxplot* da variação do tamanho do centroide dos exemplares de *T. costalimai*.

A relação entre o tamanho e a forma alar (alometria) foi de 9,8% e apresentou significância ($p < 0.05$). Essa influência foi retirada para a Análise de Variável Canônica.

4.2.2.1.2 Forma

A Análise de componente principal (ACP) apresentou um grupo homogêneo, onde não foi possível distinguir a formação de grupos em particular, com as amostras bem distribuídas no morfoespaço, como visto na Figura 21. O componente principal (CP) 1 representa 29,88% da variação encontrada nos dados e o CP2 representa 22,39%

Figura 21- Gráfico de dispersão dos componentes principais (PC). A contribuição de cada componente está escrita entre parêntese. Cada cor representa uma população e cada ponto um indivíduo

A Análise de Variável Canônica (AVC) mostrou um agrupamento entre os exemplares das localidades estudadas. Houve uma pequena sobreposição da população de São Desidério sobre Posse e Carmo do Rio Verde. As nuvens de pontos das duas últimas estão próximas no morfoespaço, porém não há sobreposição. A Variável Canônica (VC) 1 contribuiu com 67,2% da variação dos dados e a CV2 com 32,8% (Figura 22).

Figura 22- Gráfico de dispersão das Variáveis Canônicas. As elipses representam a probabilidade de 90% das asas de uma determinada região pertencer ao mesmo grupo. A contribuição de cada variável está escrita entre parêntese. Cada cor representa uma população e cada ponto um indivíduo

A Análise da Função Discriminante (AFD) mostrou uma baixa taxa de acerto quando se comparou as populações de Carmo do Rio Verde com os de São Desidério, classificando corretamente 65% as asas dos exemplares de São Desidério e 62% as asas dos exemplares de Carmo do Rio Verde. As asas dos exemplares de Posse foram classificadas corretamente 75% das vezes quando comparadas com as dos exemplares de Carmo do Rio Verde. Estas apresentaram

uma baixa taxa de classificação Correta: 72%. Quando realizada a comparação entre exemplares de São Desidério e de Posse, os da primeira cidade tiveram uma taxa de acerto de 55% e as da segunda de 75%.

Quando se compara as deformações entre as asas ficou evidente a pouca diferença entre os formatos (Figura 23). Para todas as combinações, o ponto 9 foi o que mais apresentou variação entre as asas.

Figura 23- Gráfico tipo wireframe mostrando a comparação par a par entre a forma consenso de cada população de *T. costalimai*. A: Posse (azul claro) e São Desidério (Azul escuro), B: Carmo do Rio Verde (azul claro) e São Desidério (Azul escuro), C: Carmo do Rio Verde (azul claro) e Posse (azul escuro)

A distância de Procrustes obtida entre as populações amostradas, indica uma proximidade entre as nuvens de pontos obtidos na análise. O teste de significância indica que mesmo sendo pequena, é uma diferença significativa (Tabela 19).

Tabela 19- Distância de Procrustes entre as populações de *T. costalimai*

	Carmo	Posse	São Desidério
Carmo do Rio Verde	0	<0,0001	0,0001
Posse	0,0283	0	0,0016
São Desidério	0,0287	0,0242	0

Na diagonal inferior valores da distância de Procrustes. Na diagonal superior valores do teste de permutação. Valores em negrito $p < 0,05$

4.2.3 Cabeça

4.2.3.1 Tamanho

O tamanho do TC da cabeça apresentou pouca variação. O tamanho médio dos espécimes de Carmo do Rio Verde foi de 2.13mm, Posse 2.10mm e São Desidério 2.17mm. A variação das amostras foram comparadas por meio do teste de ANOVA, e não houve diferença significativa entre elas, $F=0,8129$, $df=11,16$, $p=0.4682$.

4.2.3.2 Forma

A Análise de Componente Principal (ACP), utilizando todos os 10 marcos anatômicos, não mostrou nenhuma estruturação. Os pontos ficaram distribuídos ao longo do morfoespaço. A contribuição de cada componente foi baixa, sendo o PC1 contribuiu com 41,84% e PC2 com 26,29%. Figura 24.

Figura 24- Gráfico de dispersão dos Componentes Principais. A contribuição de cada componente está escrita entre parêntese. Cada cor representa uma população e cada ponto um indivíduo.

A AVC mostrou uma sobreposição entre os pontos, apresentando pouca variação no morfoespaço. Há uma distinção entre as elipses de distribuição de igual frequência, o que uma possível separação entre os grupos estudados. A VC1 contribuiu com 73,34% para essa distribuição e VC2 com 26,66% Figura 25.

Figura 25- Gráfico de dispersão das Variáveis Canônicas. A contribuição de cada variável está escrita entre parêntese. Cada cor representa uma população e cada ponto um indivíduo.

A AFD apresentou valores baixos na correta classificação dos espécimes. Apesar desta baixa taxa de acerto, as diferenças encontradas foram estatisticamente significantes entre Posse e São Desidério e entre Carmo do Rio Verde e São Desidério, ambas com $p < 0,05$. Entre as cidades de Posse e São

Desidério a diferença não foi significativa. Essas diferenças são observadas através do gráfico de wireframe (Figura 26)

Figura 26- Gráfico tipo wireframe mostrando a comparação par a par entre a forma consenso de cada população de *T. costalimai*. A: Posse (azul claro) e São Desidério (Azul escuro), B: Carmo do Rio Verde (azul claro) e São Desidério (Azul escuro), C: Carmo do Rio Verde (azul claro) e Posse (azul escuro).

4.2.4 Análise Genética

4.2.4.1 Gene 16S

No total, foram obtidas 34 sequências do fragmento do gene 16S com tamanho de 471 pares de bases. Para espécimes da cidade de Carmo do Rio verde foram obtidas 24 sequências. No município de São Desidério, foram obtidas seis. Tanto para cidade de Posse quanto de Mambai, foram obtidas duas sequências do material genético estudado. Nas sequências de Carmo do Rio Verde e São Desidério foram encontrados 4 haplótipos distintos: dois pertencentes a Carmo e dois de São Desidério. Denominados *T. costalimai* Carmo e *T. costalimai* São Desidério nesse estudo. Esses haplótipos foram utilizados para as análises de distância genética, Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana.

A matriz de distância genética entre os espécimes de *T. costalimai* foi gerada utilizando o algoritmo Kimura 2 Parâmetros (Tabela 20). Nessa matriz observamos que os espécimes de São Desidério e Posse apresentaram uma distância genética de 0,01. Quando essas mesmas localidades foram comparadas com espécimes de Carmo do Rio Verde, ambas apresentaram uma distância genética de 0,02. As amostras de Carmo também apresentaram a mesma distância quando comparadas com as sequências de *T. costalimai* existentes no *genbank*. As sequências de *T. costalimai* do Brasil variam entre 0,028 e 0,038 quando comparado com a da Bolívia.

Tabela 20- Matriz de distância, K2P do gene 16S entre os espécimes de *T. costalimai* e *T. jatai*. Na diagonal inferior distância. Na diagonal superior o erro padrão.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	KT601153.1_Triatoma_jatai		0,009	0,009	0,009	0,011	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,000	0,008	0,007	0,000
2	T._costalimai_CRV1	0,033		0,007	0,007	0,010	0,008	0,002	0,007	0,008	0,008	0,008	0,009	0,007	0,007	0,009
3	KT601152.1_T._costalimai_TO	0,031	0,023		0,000	0,009	0,005	0,007	0,005	0,005	0,005	0,005	0,009	0,005	0,004	0,009
4	KT601151.1_T._costalimai_TO	0,031	0,023	0,000		0,009	0,005	0,007	0,005	0,005	0,005	0,005	0,009	0,005	0,004	0,009
5	KC248998.1_T._costalimai_Bol	0,041	0,038	0,033	0,033		0,010	0,010	0,009	0,010	0,010	0,010	0,011	0,009	0,008	0,011
6	KC248997.1_T._costalimai_Posse	0,028	0,023	0,013	0,013	0,038		0,008	0,002	0,003	0,000	0,000	0,008	0,006	0,005	0,008
7	T._Costalimai_CRV2	0,031	0,002	0,023	0,023	0,036	0,023		0,007	0,008	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007	0,008
8	T._Costalimai_Mambai_1	0,025	0,020	0,010	0,010	0,036	0,002	0,020		0,002	0,002	0,002	0,008	0,005	0,004	0,008
9	T._CostalimaiMambai_2	0,028	0,023	0,013	0,013	0,038	0,005	0,023	0,002		0,003	0,003	0,008	0,006	0,005	0,008
10	T._costalimai_P10	0,028	0,023	0,013	0,013	0,038	0,000	0,023	0,002	0,005		0,000	0,008	0,006	0,005	0,008
11	T._costalimai_P9	0,028	0,023	0,013	0,013	0,038	0,000	0,023	0,002	0,005	0,000		0,008	0,006	0,005	0,008
12	KT601155.1_Triatoma_jatai_16	0,000	0,033	0,031	0,031	0,041	0,028	0,031	0,025	0,028	0,028	0,028		0,008	0,007	0,000
13	T._costalimai_SD1	0,025	0,020	0,010	0,010	0,030	0,013	0,020	0,010	0,013	0,013	0,013	0,025		0,003	0,008
14	T._costalimai_SD2	0,023	0,018	0,008	0,008	0,028	0,010	0,018	0,008	0,010	0,010	0,010	0,023	0,002		0,007
15	KT601154.1_Triatoma_jatai_05	0,000	0,033	0,031	0,031	0,041	0,028	0,031	0,025	0,028	0,028	0,028	0,000	0,025	0,023	

O modelo evolutivo que melhor se ajustou aos dados para a análise de Máxima Verossimilhança foi HKY+G. A árvore resultante da análise (Figura 27) mostra um agrupamento que contém exemplares de *T. costalimai* das localidades de Mambaí, Posse e São Desidério, populações essas, que apresentam o conexivo contínuo, esse agrupamento é suportado por um valor mediano de *bootstrap* (56). Externo a esse agrupamento encontra-se o *T. jatai*. Basal a esse clado temos as sequências de Carmo do Rio Verde (*T. costalimai* CRV). Ainda observando o clado entre *T. costalimai* e *T. jatai*, pode-se notar um agrupamento de haplotipos de acordo com sua localização geográfica.

Nota-se também a formação de um clado entre exemplares dos subcomplexos sordida e matogrossensis. É importante ressaltar que a amostra de *T. costalimai* proveniente da Bolívia (KC248998.1) não se agrupa com os demais *T. costalimai* analisados.

Figura 27- Árvore de Máxima Verossimilhança obtida com sequencias do gene 16S, de espécies oriundas do genbank mais os exemplares de *T. costalimai* desse estudo. Valores de *bootstrap* menores que 50 não foram mostradas. Após o colchete está indicado a qual subcomplexo pertence cada espécie. As espécies no quadro vermelho têm conexivo descontínuo, as do quadro verde conexivo contínuo.

O melhor modelo evolutivo para análise bayesiana foi o TrNef +G+I. Essa análise mostrou uma árvore (Figura 28) com uma separação entre os espécimes de *T. costalimai* de Carmo com o clado formado entre *T. costalimai* e *T. jataí* com um valor de probabilidade posterior bayesiana (BPP) considerado alto, 0,88. Pode-se observar um agrupamento geográfico entre as amostras de *T. costalimai*. As sequências da população de São Desidério se mostraram basais às de Posse, Mambaí e de Tocantins. Nesta análise o exemplar da Bolívia (*T. costalimai_Bol*) se apresentou mais próximo ao clado das espécies pertencentes ao subcomplexo *matogrossensis* e *sordida*.

Figura 28- Árvore de Análise Bayesiana, obtida com sequencias do gene 16S, de espécies oriundas do genbank mais os exemplares de *T. costalimai* desse estudo. Os números nos nós são valores de probabilidade, indicando qual seria a probabilidade de o agrupamento ser real. As espécies no quadro vermelho têm conexivo descontínuo, as do quadro verde conexivo contínuo.

4.2.4.2 Gene Citocromo oxidase B

Em relação a esse gene, foi obtido a amplificação para apenas uma amostra de Carmo do Rio Verde e uma de Januária. As amplificações apresentaram um tamanho de 333 pares de base, e foram comparadas com as demais sequências de *T. costalimai* disponíveis no genbank.

Para as análises de distância, Máxima Verossimilhança e Análise Bayesiana as sequências foram alinhadas com as demais e no total foram utilizados 178 pares de bases.

As distâncias encontradas entre as populações estão descritas na Tabela 21. A distância genética entre os espécimes de Januária e Carmo do Rio Verde foi de 0,06. Quando essas sequências foram comparadas com as demais de *T. costalimai* existentes no *genbank* pode-se observar uma grande distância entre elas. A sequência de Mambaí apresentou distância de 0,18 para a sequência de Carmo e 0,22 para a de Januária. Os mesmos valores foram encontrados quando Carmo e Januária foram comparadas a sequência de *T. costalimai* existente em Posse. Essa distância é maior do que encontrada entre espécies diferentes como em *T. williami* e *T. baratai* 0,072

Tabela 21- Matriz de distância genética, do gene CitB, entre espécies de triatomíneos. Diagonal inferior valores da distância genética. Na superior o erro padrão (+/-)

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 <i>T. rubrovaria</i>		0,026	0,010	0,032	0,032	0,029	0,027	0,027	0,030	0,029	0,024	0,024	0,025	0,025	0,029	0,032	0,032	0,022	0,031	0,027
2 <i>T. baratai</i>	0,112		0,029	0,033	0,029	0,029	0,034	0,030	0,029	0,031	0,032	0,032	0,023	0,021	0,027	0,033	0,033	0,027	0,028	0,026
3 <i>T. circummaculata</i>	0,017	0,133		0,033	0,032	0,029	0,028	0,028	0,029	0,030	0,027	0,027	0,028	0,028	0,031	0,033	0,033	0,023	0,032	0,030
4 <i>T. costalimai</i>	0,139	0,153	0,146		0,040	0,035	0,039	0,034	0,032	0,038	0,036	0,036	0,030	0,030	0,033	0,000	0,000	0,036	0,042	0,034
5 <i>T. garciabesi</i>	0,139	0,126	0,147	0,199		0,019	0,022	0,024	0,035	0,023	0,023	0,023	0,032	0,030	0,033	0,040	0,040	0,037	0,037	0,032
6 <i>T. guasayana</i>	0,124	0,126	0,132	0,167	0,059		0,021	0,018	0,034	0,021	0,020	0,020	0,031	0,029	0,033	0,035	0,035	0,033	0,033	0,031
7 <i>T. jurbergi</i>	0,104	0,164	0,111	0,199	0,079	0,078		0,022	0,035	0,019	0,010	0,010	0,036	0,033	0,032	0,039	0,039	0,031	0,032	0,031
8 <i>T. matogrossensis</i>	0,117	0,140	0,124	0,161	0,092	0,059	0,078		0,032	0,021	0,021	0,021	0,029	0,027	0,037	0,034	0,034	0,035	0,037	0,035
9 <i>T. pseudomaculata</i>	0,132	0,134	0,125	0,145	0,163	0,154	0,163	0,147		0,035	0,032	0,032	0,029	0,029	0,035	0,032	0,032	0,027	0,028	0,034
10 <i>T. sordida</i>	0,132	0,140	0,139	0,198	0,085	0,072	0,066	0,072	0,162		0,018	0,018	0,033	0,030	0,034	0,038	0,038	0,031	0,035	0,033
11 <i>T. vanda</i>	0,091	0,156	0,111	0,175	0,086	0,072	0,017	0,072	0,148	0,059		0,000	0,032	0,029	0,031	0,036	0,036	0,029	0,030	0,029
12 <i>T. vanda</i>	0,091	0,156	0,111	0,175	0,086	0,072	0,017	0,072	0,148	0,059	0,000		0,032	0,029	0,031	0,036	0,036	0,029	0,030	0,029
13 <i>T. guazu</i>	0,097	0,085	0,118	0,125	0,148	0,147	0,171	0,132	0,133	0,154	0,148	0,148		0,008	0,030	0,030	0,030	0,027	0,033	0,028
14 <i>T. williami</i>	0,097	0,072	0,118	0,125	0,133	0,132	0,155	0,118	0,133	0,139	0,133	0,133	0,011		0,028	0,030	0,030	0,027	0,033	0,026
15 <i>T. costalimai</i> Bolívia	0,119	0,099	0,140	0,146	0,141	0,140	0,134	0,171	0,164	0,155	0,126	0,126	0,126	0,112		0,033	0,033	0,027	0,027	0,006
16 <i>T. costalimai</i> Mambai	0,139	0,153	0,146	0,000	0,199	0,167	0,199	0,161	0,145	0,198	0,175	0,175	0,125	0,125	0,146		0,000	0,036	0,042	0,034
17 <i>T. costalimai</i> Posse	0,139	0,153	0,146	0,000	0,199	0,167	0,199	0,161	0,145	0,198	0,175	0,175	0,125	0,125	0,146	0,000		0,036	0,042	0,034
18 <i>T. costalimai</i> Carmo do Rio Verde	0,084	0,112	0,091	0,175	0,186	0,154	0,140	0,170	0,113	0,139	0,126	0,126	0,112	0,112	0,112	0,175	0,175		0,019	0,026
19 <i>T. costalimai</i> Januária	0,147	0,112	0,154	0,216	0,186	0,154	0,155	0,185	0,113	0,170	0,140	0,140	0,155	0,155	0,112	0,216	0,216	0,060		0,026
20 <i>T. costalimai</i> Bolívia2	0,112	0,092	0,133	0,153	0,134	0,133	0,126	0,163	0,156	0,148	0,119	0,119	0,119	0,105	0,006	0,153	0,153	0,105	0,105	

A árvore de Máxima Verossimilhança (Figura 29) apresentou dois grupos distintos, um formado pelas espécies do subcomplexo sordida e outro formado por espécies do subcomplexo pseudomaculata, de acordo com Pita *et al.*¹¹⁷.

Notamos que as sequências de *T. costalimai* que existem no *genbank* ficaram agrupadas, esses exemplares são provenientes de Mambai e Posse. Já as sequências de Januária e Carmo, formaram um clado distinto e longe dos outros *T. costalimai* existentes na análise. Também é valido notar a posição do *T. costalimai* proveniente da Bolívia (COCHIS, TCBOLIVIA (GB)), formando um clado distinto e separado dos demais *T. costalimai*.

Figura 29- Filogenia de Máxima Verossimilhança, com o gene CitB, utilizando espécies de triatomíneos, para verificar a posição taxonômica de *T. costalimai* de Carmo e Januária, que apresentam conexivo descontínuo (quadro vermelho), comparado a *T. costalimai* de conexivo contínuo (quadro verde). Valores de *bootstrap* menores que 50 não foram mostradas.

Para a análise bayesiana o modelo sugerido foi o HKY+G, nesta árvore houve a formação de dois grupos distintos, o primeiro com as espécies pertencentes ao subcomplexo *Triatoma sordida* e outro formado pelas espécies do subcomplexo *pseudomaculata*. Neste último os exemplares de *T. costalimai* ficaram bem distantes dos *T. costalimai* de Januária e Carmo. As duas sequências da Bolívia se agruparam e estão dentro do clado *pseudomaculata* (Figura 30).

Figura 30- Filogenia baseado na inferência bayesiana, com o gene CitB, utilizando espécies de triatomíneos, para verificar a posição taxonômica de *T. costalimai* de Carmo e Januária, que apresentam conexivo descontinuo (quadro vermelho), comparado a *T. costalimai* de conexivo contínuo (quadro verde). O número indicado nos nós são valores de probabilidade posterior bayesiana, o qual indica a probabilidade de o ramo ser formado por determinado grupo de espécie.

4.3 Discussão

Os resultados apresentados mostram uma variação morfológica importante em *Triatoma costalimai*. Foram identificados dois padrões de conexivo distintos ocorrendo em ambientes silvestres. O padrão de conexivo com a pigmentação alaranjada se apresentando de forma contínua na borda desta estrutura e um padrão descontínuo, onde a pigmentação alaranjada aparece predominantemente na região central do conexivo, muito similar ao padrão encontrado na espécie tipo descrita por Verano e Galvão ¹¹².

Além disso, foram feitas comparações entre esses grupos, os que apresentam conexivo descontínuo e os que apresentam conexivo contínuo utilizando a morfometria geométrica de duas estruturas bem estabelecidas na literatura: asa e cabeça ⁵⁰. Essas análises mostraram uma possível separação entre os grupos analisados, indicando a possibilidade de serem espécies distintas, além de confirmar a validade dessa ferramenta para a identificação correta do local no qual o triatomíneo habita.

Foram realizados estudos filogenéticos para exemplares de *T. costalimai*, coletados em Carmo do Rio Verde, São Desidério e Januária, utilizando os marcadores mitocondriais CitB e 16S. Em grande maioria dos estudos filogenéticos de Triatominae, os exemplares de *T. costalimai* foram provenientes da região de Posse ³⁶⁻³⁸ e por isso apresentam um conexivo contínuo. Quando incluído as sequências de *T. costalimai* com o padrão descontínuo de conexivo, estas se agruparam separadas ao clado de exemplares que apresentam o conexivo contínuo. Na análise específica do fragmento do gene 16S, houve a formação de um grupo contendo exemplares de conexivo contínuo, basal a esse,

exemplares de *Triatoma jatai* e mais distante a esse clado, a presença dos indivíduos de conexivo descontínuo.

4.3.1 Variações Morfológicas

O padrão cromático é um dos critérios mais utilizados para a descrição de espécies em Triatominae ²⁰. Neste trabalho, *T. costalimai* apresentou alguns padrões diferentes de coloração do conexivo, que pode caracterizar a região na qual ele foi coletado. Essa diferença já foi observada em *Triatoma patagonica*, onde em cada região em que foi encontrado na Argentina, apresentou um padrão distinto de conexivo ⁵¹. Em outro par de espécies, *Triatoma pessoai* e *Triatoma lenti*, uma das características que separavam essas espécies era o padrão de cor e tamanho encontrado no conexivo ⁴⁹.

Uma mesma espécie pode apresentar uma variação cromática, como ocorre com exemplares da espécie *T. infestans*, que quando habitam árvores apresentam uma coloração mais escura e é considerada uma variante (*T. infestans* “dark morph”), mas quando esta mesma espécie é encontrada em formações rochosas, ela apresenta um padrão de cor mais similar ao encontrado no ambiente domiciliar ¹¹⁸. Em *T. brasiliensis* também ocorre fenômeno semelhante, onde uma variação cromática identificada como *T. brasiliensis macromelassoma* encontrada numa região de Pernambuco é considerada um híbrido natural entre *T. brasiliensis* e *T. juazerensis* ¹¹⁹.

Além de padrões cromáticos, outras estruturas podem ser utilizadas para a caracterização dos locais onde habitam estas espécies de triatomíneos, e também apresentar indícios de mudanças morfológicas que levam a uma melhor adaptação ao novo ambiente. Por exemplo, já foi observado em algumas espécies

de triatomíneos que o fenótipo da antena pode sofrer alterações, como perder receptores sensoriais após o processo de domiciliação, uma vez que o triatomíneo fica mais próximo a fonte alimentar e não há necessidade de se explorar o ambiente ao redor ^{120,121}.

As estruturas da asa e da cabeça também são consideradas fontes importantes de variação morfológica dentro de cada espécie. Em triatomíneos é comum o uso dessas estruturas, através da morfometria geométrica, para avaliar uma possível influência do local onde o triatomíneo é encontrado. Também fornecem subsídios para definir a origem de re-infestações dos ambientes após o uso de inseticidas ou para separação de espécies irmãs ^{46,122,123}.

Além da variação do padrão dos conexivos encontrados, um outro fator que corrobora com a separação fenotípica dos espécimes analisados foi a AVC das asas, onde foi encontrado um padrão de separação entre os grupos estudados. A AFD também suportou essa distinção presente na amostra estudada. Estudos comparando a morfometria da asa em triatomíneos são comuns na literatura. Villacis *et al.* ¹²⁴ encontraram uma distinção no formato alar entre *Rhodinus ecuadorensis* pertencentes a regiões distintas no Equador, separando os formatos em duas principais regiões, Norte e Sul. Em *T. dimidiata* foi possível caracterizar algumas subespécies que ocorrem em território mexicano de acordo com sua distribuição geográfica¹²⁵. Para a descrição de espécies, a morfometria geométrica alar, pode contribuir para a distinção entre espécies próximas, a exemplo de *Triatoma jatai*, na qual as asas foram comparadas com *T. costalimai* ⁴⁸.

A pouca variação encontrada no formato da cabeça entre as localidades estudadas pode estar relacionada ao fato que esses triatomíneos foram coletados em ambientes silvestres. Nesses ambientes não há uma seleção e adaptação a

uma determinada fonte alimentar, como ocorrem em ambientes peri-domiciliares ou domiciliares, sendo que os insetos silvestres se alimentam no animal que está disponível. A fonte alimentar pode modular algumas características do formato da cabeça, como descrito por Guarneri *et al.*²¹ e Oropeza *et al.*⁵².

O tamanho dos triatomíneos pode ser influenciado basicamente por características ambientais do seu local de origem⁴¹. Neste trabalho, encontramos somente uma variação significativa no tamanho da asa entre as populações coletadas na cidade de Posse e Carmo do Rio Verde, indicando que algum fator ambiental pode ter levado a essa diferença.

Por outro lado, no tamanho da cabeça não encontramos diferenças. No geral, as cabeças se apresentaram pequenas (aproximadamente 2,8mm), resultado esse esperado para espécimes coletados em ambientes silvestres, pois nestes ambientes o inseto tende a se desenvolver mais rapidamente, resultando num tamanho menor. Além disso, a competição para a obtenção do alimento também influencia o tamanho dos exemplares no ambiente¹²⁶. O tipo de sangue ingerido também pode influenciar no desenvolvimento do inseto como um todo, pois sangue de animais diferentes propiciam um aporte nutricional distinto. Resultados obtidos em laboratório com *T. infestans* mostraram que sangue de mamífero favorece um melhor desenvolvimento quando comparado ao de aves⁸². Os espécimes aqui estudados apresentaram fontes similares de repasto alimentar (réptil e mamífero) (resultados não mostrados), indicando ser mais um indício da influência da fonte alimentar no desenvolvimento dos triatomíneos uma vez que nossos dados indicam uma similaridade tanto no formato da cabeça quanto no tamanho desta estrutura.

Ambientes similares podem proporcionar pressões evolutivas que podem gerar similaridade nas estruturas analisadas. Futuyma⁵⁴ define esse fenômeno

como convergência ecológica, onde o ambiente modula a evolução para selecionar caracteres semelhantes em espécies diferentes. Como as localidades deste estudo estão inseridas no Bioma Cerrado, em afloramentos rochosos, acredita-se que o microclima seja similar nos locais amostrados. Essas condições podem levar o genótipo do indivíduo a sofrer o processo de canalização, onde diferentes genótipos poder produzir fenótipos similares para se adaptar ao ambiente ⁵⁴ Esse fenômeno já foi observado em triatomíneos do gênero *Rhodnius*

122

4.3.2 Variações genéticas: inter e intra específicas

Na literatura científica ainda não há um consenso sobre quais valores de similaridades ou diferenças nos diferentes marcadores, são aceitáveis para a definição de uma nova espécie ¹²⁷. Ambos marcadores abordados neste trabalho, genes 16S e CitB, indicaram uma separação entre os exemplares de *T. costalimai* que apresentaram conexivo descontínuo (das localidades Carmo do Rio Verde e Januária) dos que apresentavam conexivo contínuo (dos municípios Posse, São Desidério e Mambai)

Em estudos com algumas espécies do complexo *Infestans*, Garcia *et al.* ¹²⁸ utilizando o 16S como marcador, encontraram distâncias entre diferentes espécies, similares às que encontramos nesse estudo. Por exemplo, entre *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma circummaculata* a distância foi de 0,018; e entre *T. matogrossensis* e *T. sordida* foi de 0,015. As distâncias entre os exemplares coletados no município Carmo do Rio Verde (conexivo descontínuo) apresentaram uma distância de 0.023 para os *T. costalimai* de Tocantins, mesma distância para

os exemplares de Posse (Conexivo contínuo), e para os exemplares de São Desidério a distância foi menor, 0,018 e 0,020.

Essas distâncias também são consideradas para a revalidação de espécies já descritas e que foram colocadas em sinonímia, como por exemplo *Triatoma bahiensis*, que foi sinonimizado com *Triatoma lenti*, considerando as características morfológicas, e posteriormente com o uso de marcadores mitocondriais, a distância genética encontrada foi de 2,5% ⁴⁹.

No trabalho de Teves *et al.* ¹²⁹, a espécie *T. jatai*, apresentou uma distância de 0,025 para o marcador 16S, para *T. costalimai* coletados em Tocantins. No nosso estudo, *T. jatai* apresentou uma distância de 0.033 para *T. costalimai* do Carmo do Rio Verde, 0,023 para São Desidério e 0,028 para Posse. Esse valor encontrado indicou *T. jatai* como espécie afim de *T. costalimai*. Quando comparado os dois haplótipos de 16S de Carmo do Rio Verde a distância genética foi pequena, o mesmo ocorreu quando comparado os haplótipos de São Desidério e os de Posse e Mambai. Para o gene CitB também foram encontradas distâncias pequenas entre Carmo do Rio Verde e Januária, e quando comparada aos *T. costalimai* do *genbank*, a distância foi maior.

Ambos marcadores aqui estudados, apontam o exemplar de *T. costalimai* encontrado na Bolívia, como uma outra espécie, morfologicamente semelhante ao *T. costalimai* encontrado no Brasil. Resultado esse que já foi posto em questão no trabalho de Justi e Galvão ¹³⁰, quando apresentaram uma filogenia de triatominae, e esse exemplar ficou separado dos demais *T. costalimai* brasileiros.

T. costalimai sempre foi considerado pertencente ao subcomplexo matogrossensis, devido principalmente à sua área de ocorrência e seu padrão morfológico ³⁸. Porém, analisando as filogenias que se tem disponível na literatura, esta espécie sempre aparece mais distante do clado formado pelas espécies do

subcomplexo ^{37,131}. Os resultados aqui encontrados, para os dois genes, confirmam a posição distante de *T. costalimai* quando comparado às espécies do subcomplexo *matogrossensis*. O valor alto de probabilidade posterior bayesiana (0,88) encontrado para a árvore do gene 16S sugere a formação de um grupo contendo os exemplares de *T. costalimai* de conexivo contínuo (Posse, Mambai, Tocantins e São Desidério), formando um grupo com *T. jatai*, e mais basal a esse clado, os exemplares de Carmo do Rio Verde, de conexivo descontínuo.

Podemos citar também, além da variação morfométrica e genética encontrada para os espécimes analisados, a diferença de ecótopos nos quais eles foram coletados. Apesar de estarem inseridos no contexto de Cerrado, que apresenta Mata Seca, o tipo de sedimento rochoso é diferente entre os locais amostrados. As rochas existentes no município de Carmo do Rio Verde são do tipo granito, enquanto as de Posse e São Desidério são do tipo calcária ¹³². Essa diferença no tipo de rocha, pode alterar o microclima nas frestas, locais onde os triatomíneos são encontrados. Essas diferenças podem acabar levando a mudanças fenotípicas para uma melhor adaptação ao ambiente⁶².

Triatoma costalimai vem sendo encontrado em ambientes próximos as moradias. Machiner *et al.* ³⁰, encontraram um grande número desse triatomíneo vivendo em rochas próximas as casas em Mambai-GO. Em Tocantins, em um levantamento no período de 2003 a 2014, também houve grande ocorrência de triatomíneos invadindo casas³³. Resultados similares a esse também foram encontrados em São Desidério, onde em uma semana houve a ocorrência de 5 invasões, havendo um naturalmente infectado com *T. cruzi*. Esse comportamento de invasão pode estar relacionado às mudanças ocasionadas pela agricultura, onde queimadas e aplicações de veneno, podem afastar a fonte alimentar e o triatomíneo passa a buscar uma fonte alternativa ¹³³.

Apesar de ainda não se ter estudos conclusivos sobre como certos genótipos participam do comportamento de invasão em triatomíneos, já é levantada a hipótese de que populações com genótipos diferentes podem ter capacidades vetoriais distintas ¹³³. Com o avanço das técnicas moleculares será possível responder quais são os genes envolvidos no processo de domiciliação, bem como se algum fenótipo em particular é mais propenso a se infectar com *T. cruzi* ^{134,135}.

Neste trabalho ocorreram algumas limitações, como um baixo número de indivíduos adultos coletados em campo, o longo período de desenvolvimento das ninfas nas colônias que foram originadas ao longo do estudo. O baixo número de pares de base para o fragmento do gene CitB, também pode levar a um viés de análise filogenética, mas que de certa forma corroborou com os resultados do 16S.

Os resultados de todas as análises realizadas neste trabalho mostram fortes evidências que a espécie *Triatoma costalimai* pode se tratar de um subcomplexo de espécies crípticas, formada por indivíduos de conexivo contínuo, descontínuo e *Triatoma jataí*. Estudos de estruturas morfológicas e genitálias, comparações com um maior número de indivíduos e estudos de cruzamento entre os fenótipos são necessários para a confirmação desse subcomplexo de espécies.

5 Conclusão

- a) Existem variabilidade morfológica e genética em ambas espécies;
- b) *Triatoma sordida* apresenta pouca variabilidade da forma alar;
- c) As populações de *T. sordida* encontram-se estruturadas geneticamente;
- d) Há indícios de que algumas populações de *T. sordida* do Mato Grosso do Sul estejam se diferenciando geneticamente;
- e) *T. costalimai* apresenta variabilidade morfológica;
- f) *T. costalimai* encontrado em Carmo do Rio Verde apresenta-se geneticamente distante das demais populações estudadas, sugerindo ser uma possível subespécie de *T. costalimai*.

Referências

- 1 Dias, J. V., Queiroz, D. R., Diotaiuti, L. e Pires, H. H. Knowledge of triatomine insects and of the Chagas disease among people from localities which have different levels of vector infestations. *Cien Saude Colet* **21**, 2293-2304, doi:10.1590/1413-81232015217.07792015 (2016).
- 2 Brenière, S. F., Aznar, C. e Hontebeyrie, M. in *American Trypanosomiasis chagas disease* (ed Jenny e Tibayrenc Telleria, Michel) (Elsevier, 2010).
- 3 Dias, J. C. P. et al.. II Consenso brasileiro em doença de chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* **25**, 7-86 (2016).
- 4 Saúde, M. d. S. S. d. V. e. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. *Bol Epidemiol* **46** (2015).
- 5 Antinori, S. et al.. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *European Journal of Internal Medicine* (2017).
- 6 Manne-Goehler, J. (Oxford University Press US, 2017).
- 7 Lescure, F.-X. et al.. Chagas disease: changes in knowledge and management. *The Lancet infectious diseases* **10**, 556-570 (2010).
- 8 Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E. e Hotez, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet infectious diseases* **13**, 342-348 (2013).
- 9 Galvão, C. *Vetores da doença de chagas no Brasil*. (SciELO-Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014).
- 10 Souza, E. et al.. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n.(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará State, Brazil. *ZooKeys*, 45-62 (2016).
- 11 da Rosa, J. A. et al.. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys* **675**, 1 (2017).

- 12 Gaunt, M. e Miles, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **95**, 557-565 (2000).
- 13 Oliveira, J. d. e Alevi, K. C. C. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **50**, 434-435 (2017).
- 14 Schofield, C.J. Triatominae - Biología y control. West Sussex: *Eurocommunica Publications*. (1994).
- 15 Silveira, A. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. Silveira AC, Vinhaes M. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **31**, 31 (1998).
- 16 Dias, J. C. P., Silveira, A. C. e Schofield, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 603-612 (2002).
- 17 Dias, J. C. P., Machado, E. M., Fernandes, A. L. e Vinhaes, M. C. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. *Cad. Saúde Pública* **16**, 13-34 (2000).
- 18 Abad-Franch, F. e Monteiro, F. A. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **77**, 437-454 (2005).
- 19 Monteiro, F. A., Escalante, A. A. e Beard, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends in parasitology* **17**, 344-347 (2001).

- 20 Lent, H. e Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **163**, 123-520 (1979).
- 21 Guarneri, A. A., Pereira, M. H. e Diotaiuti, L. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of medical entomology* **37**, 373-379 (2000).
- 22 Dias, J. P. *et al.*. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **41**, 296-300 (2008).
- 23 Crocco, L. e Catalá, S. Feeding and defaecation patterns in *Triatoma sordida*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **91**, 409-413 (1996).
- 24 Waleckx, E., Gourbiere, S. e Dumonteil, E. Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **110**, 324-338, doi:10.1590/0074-02760140409 (2015).
- 25 Forattini, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Revista de Saúde Pública* **40**, 964-998 (2006).
- 26 Noireau, F., Zegarra, M., Ordoñez, J., Gutierrez, T. e Dujardin, J.-P. Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia: application on control interventions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**, 347-351 (1999).
- 27 Santalucia, M. *et al.*. Nota sobre as espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) encaminhados para o controle de qualidade no Lacen-GO em Goiás. *Ars Veterinaria* **31**, 73 (2015).
- 28 Ribeiro, J. F. a. W., Bruno Machado Teles. *Mata Seca*, 2017).

- 29 Carcavallo, R. *et al.* in *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas* 561-619 (Fiocruz, 1998).
- 30 Machiner, F., Cardoso, R. M., Castro, C. e Gurgel-Gonçalves, R. Occurrence of *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae) in different environments and climatic seasons: a field study in the Brazilian savanna. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **45**, 567-571 (2012).
- 31 Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J. e Peterson, A. T. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. *Journal of tropical medicine* **2012** (2012).
- 32 Garcia-Zapata, M. *et al.* House invasion by secondary triatomine species in Mambai, Goiás-Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **18**, 199-201 (1985).
- 33 Nogueira Brito, R., Diotaiuti, L., Celencina Fagundes Gomes, A., de Cássia Moreira de Souza, R. e Abad-Franch, F. *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae) in and Around Houses of Tocantins State, Brazil, 2005–2014. *Journal of Medical Entomology* (2017).
- 34 Mello, D. A. e Borges, M. M. Primeiro encontro do *Triatoma costalimai* naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo de aspectos biológicos da amostra isolada. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **76**, 61-69 (1981).
- 35 Schofield, C. e Galvão, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica* **110**, 88-100 (2009).
- 36 Hypša, V. *et al.* Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Molecular phylogenetics and evolution* **23**, 447-457 (2002).

- 37 Justi, S. A., Russo, C. A., dos Santos Mallet, J. R., Obara, M. T. e Galvão, C. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites e vectors* **7**, 149 (2014).
- 38 Gardim, S. *et al.*. Evolutionary relationships of the *Triatoma matogrossensis* subcomplex, the endemic *Triatoma* in central-western Brazil, based on mitochondrial DNA sequences. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **89**, 766-774 (2013).
- 39 Bookstein, F. L. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. (Cambridge University Press, 1997).
- 40 James Rohlf, F. e Marcus, L. F. A revolution morphometrics. *Trends in Ecology e Evolution* **8**, 129-132, doi:10.1016/0169-5347(93)90024-j (1993).
- 41 Dujardin, J. P. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **8**, 875-890, doi:10.1016/j.meegid.2008.07.011 (2008).
- 42 Adams, D. C., Rohlf, F. J. e Slice, D. E. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* **71**, 5-16, doi:10.1080/11250000409356545 (2004).
- 43 Monteiro, L. R. e Reis, S. F. d. *Princípios de morfometria geométrica*. (Holos, 1999).
- 44 Moratore, C. *Padrões genético-morfológicos em populações de Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae)*, Universidade de São Paulo, (2009).
- 45 Dujardin, J. P., Beard, C. B. e Ryckman, R. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and*

- evolutionary genetics in infectious diseases* **7**, 161-167, doi:10.1016/j.meegid.2006.07.005 (2007).
- 46 Feliciangeli, M. D., Sanchez-Martin, M., Marrero, R., Davies, C. e Dujardin, J. P. Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). *Acta tropica* **101**, 169-177, doi:10.1016/j.actatropica.2006.12.010 (2007).
 - 47 Schachter-broide, J., Dujardin, J.-P., Kitron, U. e Gürtler, R. E. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *Journal of medical entomology* **41**, 643-649 (2004).
 - 48 Gonçalves, T. C. M., Teves-Neves, S. C., Santos-Mallet, J. R. d., Carbajal-de-la-Fuente, A. L. e Lopes, C. M. *Triatoma jatai* sp. nov. in the state of Tocantins, Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **108**, 429-437 (2013).
 - 49 Mendonca, V. J. *et al.*. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock e Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa* **4107**, 239-254, doi:10.11646/zootaxa.4107.2.6 (2016).
 - 50 Dujardin, J. P., Costa, J., Bustamante, D., Jaramillo, N. e Catala, S. Deciphering morphology in Triatominae: the evolutionary signals. *Acta tropica* **110**, 101-111, doi:10.1016/j.actatropica.2008.09.026 (2009).
 - 51 Nattero, J. *et al.*. Morphological and Genetic Differentiation within the Southernmost Vector of Chagas Disease: *Triatoma patagonica* (Hemiptera - Reduviidae). *PLoS One* **11**, e0168853, doi:10.1371/journal.pone.0168853 (2016).

- 52 Oropeza, A. M., Fernández, C. A. P., Liria, J. e Soto-Vivas, A. Head geometric morphometrics of two Chagas disease vectors from Venezuela. *Zoological Systematics* **42**, 65-70 (2017).
- 53 Patterson, J. S., Barbosa, S. E. e Feliciangeli, M. D. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta tropica* **110**, 187-199 (2009).
- 54 Futuyma, D. J. Evolution. Sunderland, MA. USA: *Sinauer Associates*. Gouy MAM, Guindon S, Gascuel O. *SeaView version 4*, 221-224 (2005).
- 55 Hoy, M. A. *Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications*. (Academic Press, 2003).
- 56 Monteiro, F., Marcet, P. e Dorn, P. Population genetics of triatomines. *American Trypanosomiasis–Chagas disease—one hundred years of research*. Elsevier, Amsterdam, 169-208 (2010).
- 57 Mas-Coma, S. e Bargues, M. D. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta tropica* **110**, 112-136, doi:10.1016/j.actatropica.2008.10.013 (2009).
- 58 Giordano, R., Cortez, J. C. P., Paulk, S. e Stevens, L. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **100**, 753-760 (2005).
- 59 Pessoa, G. C. D. Á., Sousa, T. N. d., Sonoda, I. V. e Diotaiuti, L. Assessing the mitochondrial DNA diversity of the Chagas disease vector *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **111**, 322-329 (2016).

- 60 Pavan, M. e Monteiro, F. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Tropical Medicine e International Health* **12**, 751-758 (2007).
- 61 Ridley, M. Evolução. 3ª edição. *Porto Alegre: Artmed* (2006).
- 62 Dujardin, J. P., Panzera, P. e Schofield, C. J. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**, 223-228 (1999).
- 63 Gomez-Palacio, A., Triana, O., Jaramillo, O. N., Dotson, E. M. e Marcet, P. L. Eco-geographical differentiation among Colombian populations of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **20**, 352-361, doi:10.1016/j.meegid.2013.09.003 (2013).
- 64 Schofield, C. J., Diotaiuti, L. e Dujardin, J. P. The process of domestication in Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**, 375-378 (1999).
- 65 Rohlf, F. tpsDig v2. 16. *Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, New York* (2010).
- 66 Klingenberg, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources* **11**, 353-357 (2011).
- 67 Rohlf, F. J. Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification* **16**, 197-223 (1999).
- 68 Hammer, Ø., Harper, D. e Ryan, P. PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. *Paleontological Museum, University of Oslo, Noruega*. (También disponible en línea: <http://folk.uio.no/ohammer/past/index.html>) (2008).

- 69 Lyman, D. F. *et al.*. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **60**, 377-386 (1999).
- 70 Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold spring harbor laboratory press, 1989).
- 71 Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* **32**, 1792-1797 (2004).
- 72 Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. e Rozas, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497 (2003).
- 73 Nei, M. *Molecular evolutionary genetics*. (Columbia university press, 1987).
- 74 Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595 (1989).
- 75 Fu, Y.-X. e Li, W.-H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**, 693-709 (1993).
- 76 Kimura, M. *The neutral theory of molecular evolution*. (Cambridge University Press, 1983).
- 77 fluxus-engineering.com. Network v.5 Disponível em: <http://www.fluxus-engineering.com/sharepub.htm>.
- 78 Bandelt, H.-J., Forster, P. e Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* **16**, 37-48 (1999).
- 79 Kamvar, Z. N., Tabima, J. F. e Grünwald, N. J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* **2**, e281 (2014).

- 80 Team, R. C. R foundation for statistical computing. *Vienna, Austria* **3** (2013).
- 81 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. e Kumar, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* **30**, 2725-2729 (2013).
- 82 Guarneri, A. A., Araujo, R. N., Diotaiuti, L., Gontijo, N. F. e Pereira, M. H. Feeding performance of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) on habitual hosts: *Thrichomys laurentius* (Rodentia: Echimyidae) and humans. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 443-445 (2011).
- 83 Klingenberg, C. P., Leamy, L. J., Routman, E. J. e Cheverud, J. M. Genetic architecture of mandible shape in mice: effects of quantitative trait loci analyzed by geometric morphometrics. *Genetics* **157**, 785-802 (2001).
- 84 Gaspe, M. *et al.*. Microgeographic spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations using wing geometric morphometry in the Argentine Chaco. *Journal of medical entomology* **49**, 504-514 (2012).
- 85 Obara, M. T. *et al.*. Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae) ao inseticida deltametrina, na região Centro-Oeste do Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **44**, 206-212 (2011).
- 86 Schlichting, C. D. e Pigliucci, M. *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. (Sinauer Associates Incorporated, 1998).
- 87 Dujardin, J.-P. in *Genetics and Evolution of Infectious Disease* 473-501 (2011).
- 88 Forattini, O. P., da Rocha, E. O., Ferreira, O. A., Rabello, E. X. e Pattoli, D. G. Aspectos ecológicos da tripanossomose americana: III-Dispersão local

- de triatomíneos, com especial referência ao *Triatoma sordida*. *Revista de Saúde Pública* **5**, 193-205 (1971).
- 89 Diotaiuti, L., Loiola, C., Falcão, P. e Dias, J. C. P. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **35**, 237-245 (1993).
 - 90 Borges, E., Dujardin, J. P., Schofield, C., Romanha, A. J. e Diotaiuti, L. Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *Journal of medical entomology* **37**, 872-877 (2000).
 - 91 Cavassin, F. B. *et al.*. Genetic Variability and Geographical Diversity of the Main Chagas' Disease Vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Triatominae) in Brazil Based on Ribosomal DNA Intergenic Sequences. *Journal of Medical Entomology* **51**, 616-628, doi:10.1603/me13073 (2014).
 - 92 Avise, J. C. *et al.*. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics* **18**, 489-522 (1987).
 - 93 Ricklefs, R. E. in *A economia da natureza* (Guanabara Koogan, 2003).
 - 94 Gorla, D. E., Jurberg, J., Catalá, S. S. e Schofield, C. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **88**, 379-385 (1993).
 - 95 Noireau, F. *et al.*. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the bolivian Chaco. *Tropical Medicine and International Health* **3**, 364-372 (1998).
 - 96 Panzera, F. *et al.*. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Parasit Vectors* **8**, 495, doi:10.1186/s13071-015-1109-6 (2015).

- 97 Vendrami, D. P., Obara, M. T., Gurgel-Goncalves, R., Ceretti-Junior, W. e Marrelli, M. T. Wing geometry of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Brazil. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **49**, 17-20, doi:10.1016/j.meegid.2016.12.031 (2017).
- 98 Blandon-Naranjo, M., Zuriaga, M. A., Azofeifa, G., Zeledon, R. e BARGUES, M. D. Molecular evidence of intraspecific variability in different habitat-related populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Costa Rica. *Parasitol Res* **106**, 895-905, doi:10.1007/s00436-010-1762-9 (2010).
- 99 de la Rua, N., Stevens, L. e Dorn, P. L. High genetic diversity in a single population of *Triatoma sanguisuga* (LeConte, 1855) inferred from two mitochondrial markers: Cytochrome b and 16S ribosomal DNA. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **11**, 671-677, doi:10.1016/j.meegid.2011.02.009 (2011).
- 100 Pessoa, G. Perfil da suscetibilidade a deltametrina em populações de *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) do Estado de Minas Gerais procedentes de áreas com infestação persistente. [tese] *Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais* (2012).
- 101 García, B. A., Manfredi, C., Fichera, L. e Segura, E. L. Variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene* **68**, 692-694 (2003).
- 102 Monteiro, F. A., Jurberg, J. e Lazoski, C. Very low levels of genetic variation in natural peridomestic populations of the Chagas disease vector *Triatoma*

- sordida (Hemiptera: Reduviidae) in Southeastern Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **81**, 223-227 (2009).
- 103 Pfeiler, E., Bitler, B. G., Ramsey, J. M., Palacios-Cardiel, C. e Markow, T. A. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Phylogenet Evol* **41**, 209-221, doi:10.1016/j.ympev.2006.07.001 (2006).
- 104 Almeida, C. E. *et al.*. Inferring from the Cyt B gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **78**, 791-802 (2008).
- 105 Brenière, S. F. *et al.*. Population genetic structure of *Meccus longipennis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vector of Chagas disease in West Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* **12**, 254-262 (2012).
- 106 Futuyma, D. J. e Peterson, S. C. Genetic variation in the use of resources by insects. *Annual review of entomology* **30**, 217-238 (1985).
- 107 Monsalve, Y., Panzera, F., Herrera, L., Triana-Chávez, O. e Gómez-Palacio, A. Population differentiation of the Chagas disease vector *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) from Colombia and Venezuela. *Journal of Vector Ecology* **41**, 72-79 (2016).
- 108 Fitzpatrick, S., Feliciangeli, M. D., Sanchez-Martin, M. J., Monteiro, F. A. e Miles, M. A. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. *PLoS neglected tropical diseases* **2**, e210, doi:10.1371/journal.pntd.0000210 (2008).

- 109 Ribeiro, C. C. M. *Filogeografia de Triatoma sordida* (Stål, 1859) nas ecorregiões do cerrado, caatinga e chaco, [tese] Rio de Janeiro (2014).
- 110 Noireau, F. e Dujardin, J.-P. Biology of triatominae. *American tripanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. First edition. Burligton: Elsevier*, 149-164 (2010).
- 111 Rossi, J. C. N. Fatores associados com a ocorrência de triatomíneos em unidades domiciliares de localidades rurais no município de Posse, Goiás, Brasil, 2013. [dissertação] Brasília. (2014).
- 112 Verano, O. e Galvão, A. B. *Triatoma costalimai* sp., n. *Rev. bras. Malar* **10**, 199-205 (1958).
- 113 Oliveira, A. W. S. d. e Silva, I. G. d. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* **40**, 204-208 (2007).
- 114 Ronquist, F. e Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572-1574 (2003).
- 115 Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. e Posada, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* **9**, 772-772 (2012).
- 116 Benson, D. A. et al.. GenBank. *Nucleic acids research* **41**, D36-D42 (2012).
- 117 Pita, S. et al.. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera-Triatominae). *Infection, Genetics and Evolution* **43**, 225-231 (2016).
- 118 Noireau, F. et al.. 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* **94**, 23-27 (2000).

- 119 Costa, J. *et al.*. Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of *Triatoma brasiliensis* species complex. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **37**, 77-87, doi:10.1016/j.meegid.2015.10.025 (2016).
- 120 Rodriguez, C. S., Crocco, L., Altamirano, A. e Catala, S. Changes related to gender, geographic population and habitat in the antennal phenotype of *Triatoma patagonica* Del Ponte, 1929 (Hemiptera: Reduviidae). *Acta tropica* **125**, 143-149, doi:10.1016/j.actatropica.2012.11.006 (2013).
- 121 Catalá, S. e Torres, M. Similarity of the patterns of sensilla on the antennae of *Triatoma melanosoma* and *Triatoma infestans*. *Annals of Tropical Medicine e Parasitology* **95**, 287-295 (2001).
- 122 Gurgel-Gonçalves, R., Abad-Franch, F., Ferreira, J. B., Santana, D. B. e Cuba, C. A. C. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? *Acta tropica* **107**, 90-98 (2008).
- 123 Gurgel-Goncalves, R., Ferreira, J. B., Rosa, A. F., Bar, M. E. e Galvao, C. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Med Vet Entomol* **25**, 84-93, doi:10.1111/j.1365-2915.2010.00920.x (2011).
- 124 Villacis, A. G. *et al.*. Pioneer study of population genetics of *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae) from the central coast and southern Andean regions of Ecuador. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **53**, 116-127, doi:10.1016/j.meegid.2017.05.019 (2017).

- 125 Dumonteil, E. *et al.*. Assessment of *Triatoma dimidiata* dispersal in the Yucatan Peninsula of Mexico by morphometry and microsatellite markers. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **76**, 930-937 (2007).
- 126 Hernández, M. L., Dujardin, J. P., Gorla, D. E. e Catalá, S. S. Potential sources of *Triatoma infestans* reinfesting peridomestic identified by morphological characterization in Los Llanos, La Rioja, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **108**, 91-97 (2013).
- 127 Monteiro, F. A. *et al.*. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **94**, 229-238 (1999).
- 128 García, B. A., Moriyama, E. N. e Powell, J. R. Mitochondrial DNA Sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic Relationships. *Journal of Medical Entomology* **38**, 675-683, doi:10.1603/0022-2585-38.5.675 (2001).
- 129 Teves, S. C. *et al.*. Mitochondrial Genes Reveal *Triatoma jatai* as a Sister Species to *Triatoma costalimai* (Reduviidae: Triatominae). *The American journal of tropical medicine and hygiene* **94**, 686-688 (2016).
- 130 Justi, S. A. e Galvao, C. The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends Parasitol* **33**, 42-52, doi:10.1016/j.pt.2016.11.002 (2017).
- 131 Gardim, S. *et al.*. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **23**, 74-79, doi:10.1016/j.meegid.2014.01.024 (2014).

- 132 Do Brasil, C.-S. G. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. *Diagnóstico do município de Serra Talhada, estado de Pernambuco. Recife: CPRM/PRODEEM* (2005). [citado em 20 de Julho de 2017]
- 133 Pacheco, R. *et al.*. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. *Parasite* **14**, 231-237 (2007).
- 134 Stapley, J. *et al.*. Adaptation genomics: the next generation. *Trends in ecology e evolution* **25**, 705-712 (2010).
- 135 Schwabl, P. *et al.*. Prediction and prevention of parasitic diseases using a landscape genomics framework. *Trends in parasitology* **33**, 264-275 (2017).