

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Ana Laura Carbajal de la Fuente

Eco-genética comparativa das espécies afins *Triatoma pseudomaculata*
Corrêa & Espínola, 1964 e *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951
(Hemiptera: Triatominae)

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biologia Parasitária.

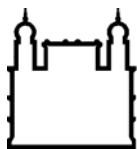
Orientador (es): Dr. François Noireau
Dra. Líléia Diotaiuti

RIO DE JANEIRO
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: Ana Laura Carbajal de la Fuente

Eco-genética comparativa das espécies afins *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 e *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951 (Hemiptera: Triatominae)

ORIENTADOR (ES): Dr. François Noireau
Dra. Liléia Diotaiuti

Aprovada em: 29/ 05/ 2007

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira - Presidente

Prof. Dr. Fernando Abad-Franch (membro titular)

Prof. Dr. Fernando Monteiro (membro titular)

Prof. Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves (membro suplente)

Prof. Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto (membro suplente)

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2007

Los imprescindibles

*Hay hombres que luchan un día
y son buenos.*

*Hay otros que luchan un año
y son mejores.*

*Hay quienes luchan muchos años
y son muy buenos.*

*Pero hay los que luchan toda la vida.
Esos son los imprescindibles.*

Bertoldt Brecht

Os imprescindíveis

*Há homens que lutam um dia,
e são bons*

*Há outros que lutam um ano,
e são melhores.*

*Há aqueles que lutam muitos anos,
e são muito bons.*

*Porém, há aqueles que lutam por toda a vida.
Estes são os imprescindíveis.*

Bertoldt Brecht

Aos imprescindíveis das áreas rurais da América Latina, que acordam e dormem
lutando

A Domingo, lutador exemplar
desde sempre

À María Inés,
que continua sua luta

À María Lia (Marília), símbolo da luta

A meu amor e companheiro Abel,
lutador silencioso,
atenuador das minhas lutas

Aos lutadores forçosamente silenciados

Às imprescindíveis sementes

Agradecimentos

Sem a contribuição de todas as pessoas mencionadas a continuação, e que são muitas, esta tese não estaria hoje em suas mãos.

Sou eternamente grata às pessoas das áreas rurais do Brasil, que abriram as portas das suas casas permitindo obter informações imprescindíveis para este trabalho. Eles, portando quase só suas vestimentas, ofereceram o pouco que tinham, fornecendo o material necessário para esta pesquisa e me tornaram uma pessoa mais completa, mais humana. Além de ser grata por isso, lhes agradeço levar gravado na minha memória, para sempre, as conversas, os risos, e as injustiças que me mostraram. Agradeço a ajuda impagável dos agentes da Fundação Nacional de Saúde, que conhecem cada canto deste Brasil como a palma das suas mãos; sem eles, as portas não haveriam sido abertas tão facilmente, e muitas, nem teriam sido abertas. Também sou grata a Agenor Ferreira, da Secretaria de Saúde de Curaçá, Bahia, por me apresentar um Brasil oculto e me contar histórias emocionantes. Sem Paulo Araújo e Glauber, pessoas conhecedoras da região de Curaçá, e com habilidades destacáveis para o trabalho de campo, não contaríamos com valiosos espécimes. O trabalho de campo na Bahia foi possível graças à logística providenciada por A. Dias-Lima e I. Sherlock, da FIOCRUZ de Salvador, e por J.P. da Silva, C.M. Neves e E. da Rocha das Secretarias de Saúde de Itaberaba e Senhor do Bom Fim, Bahia, e Itaobim, Minas Gerais, respectivamente. O Dr. J.M.S. Barata ajudou na obtenção das autorizações de coleta e logística em São Paulo; também gentilmente nos presenteou com toda sua sabedoria “triatominológica”. O Dr. O. Forattini nos forneceu dados essenciais para encontrar *T. wygodzinskyi*. Giovanni Grande, da Secretaria de Saúde de Poço de Caldas, R. Hoffmann Coordenador do Centro de Controle de Zoonoses de São João da Boa Vista, Antonio, Maurílio e Sargazo, expertos assistentes de campo da SUCEN de São Paulo, e Marcos Obara ofereceram um inestimável apoio nas coletas de *T. wygodzinskyi*. Giovanni e Roberto facilitaram o transporte nessas regiões. O Dr. A. Teixeira proporcionou as iscas para as coletas em Goiás, e pessoal especializado da Secretaria de Saúde de Caldas Novas, nos acompanharam nas buscas. A nossa Catarina M. Lopes participou com tanto entusiasmo de cada viagem, levando no seu “mochete” mágico TODAS as coisas necessárias para solucionar TODOS os imprevistos, até aqueles que vocês não possam imaginar. Se alguma ferramenta, medicamento, opinião, material (até o inacreditável) você precisar, acreditem, ela tem para oferecer, além do seu bom humor e predisposição incansável. Ela é a companheira perfeita para o trabalho e foi fundamental desde minha chegada ao Brasil, sendo meu maior apoio. Catarina, você é uma das imprescindíveis desta tese! Muito obrigada, você faz com que o trabalho no laboratório se torne alegre e isso também é muito importante!

Já que estou falando do laboratório, não posso deixar de agradecer a Nathanielly Rocha, quem com delicada atenção, boa predisposição e bom humor, me ajudou na bancada durante todos estes anos. Muito esforço dela está nesta tese. Sílvia M. dos Santos me ajudou com as isoenzimas, me ofereceu sua amizade e abriu uma janela para outra vida. Há um antes e um depois na minha vida pessoal, refletida nesta tese também, e isso é graças a ela. Elizabeth Rangel e Jacenir R.S. Mallet me abriam as portas do seu laboratório quando pensei que todo acabava, Teresa C.M. Gonçalves e Suzete Araújo de Oliveira brindaram sua ajuda sempre que necessária. Meu querido Rubens Pinto de Mello, ofereceu ABSOLUTAMENTE TODO “seu” Laboratório ao meu dispor, desde lupa, microscópio, pinças, lanternas, até coisas que já não se fabricam. Inclusive tesouros, ele me emprestou! Cuidou-me como um pai a pedido expresso do meu e me deu seu carinho e conhecimento... jamais pronunciou um “não”. William, Shênia, Cristina, Simone(s), Dani, Sandra, Mauricio, Lourdes, Teresa, Wagner, Anthony, Monique, Ricardo, Márcia, Nildimar, Denise, Ademir, Magda, Jerônimo, Esther, Ângela, Simone, Verônica, e todo o pessoal do Departamento de Entomologia, me presentearam sempre com um cáldo sorriso. Agradeço a J. Jurberg, C. Galvão, V. Cunha, G. Godoy, C. Godoy, L. Fonseca e C. Magalhães do Laboratório Nacional e Internacional em Taxonomia de Triatomíneos pela ajuda sempre que necessária e por disponibilizar a coleção de triatomíneos toda vez que precisei. Carlos E. Almeida e Jane Costa entregaram material importante da Paraíba. Alexandre Peixoto do Depto. de Biologia Molecular, imediatamente que precisei um freezer para manter as amostras logo que o nosso foi danificado, ofereceu sua ajuda, assim como Márcia Gonçalves do Depto. de Entomologia e Ana Jansen do Depto. de Protozoologia.

Sou grata a todos os membros do curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitaria, que me receberam sempre calorosamente e resolveram todos os inconvenientes. Fico igualmente agradecida a Rose Silva da Coordenação Geral da Pós-graduação pelas perguntas respondidas e os problemas sempre resolvidos de maneira eficiente. Dona Vera da Casa Amarela foi muito amável na minha recepção no Instituto.

Muitas colaborações dentro e fora do Brasil foram realizadas para concluir esta tese. Quero ressaltar que essas pessoas, sempre acolheram minhas perguntas e dúvidas com todo o agrado e assim fizeram-me sentir; responderam os e-mails imediatamente e foram sempre bem dispostas para me ajudar. Agradeço o tempo de cada uma delas e a entusiástica dedicação. Silvia Catalá do “Centro Regional de Investigaciones Científicas y Tecnologías de La Rioja”, Argentina, colaborou nas análises do fenótipo antenal. Foi ela quem, em 1996, me acolheu no seu laboratório, junto a Liliana Crocco. Ela é responsável pelo meu interesse pelos triatomíneos e por grande parte da minha formação. Sou muito grata a David Gorla, diretor dessa Instituição, quem “gentil-obrigatoriamente”, me fez aprender estatística na Faculdade. Essa gentil-imposição antidemocrática tem-me sido útil desde então! Estou “significativamente” ($p < 0.0001$) agradecida por isso!!! O trabalho de

variáveis ambientais foi possível pelo seu esforço em me ensinar um mundo maravilhoso e cheio de novidades. Ximena Porcasi também ajudou com o trabalho de GIS envolvido na tese. Marcelo Scavuzzo e Mario Lamfri do Instituto Gulich dependente da “Comisión Nacional de Actividades Espaciales de Córdoba”, Argentina, disponibilizaram infra-estrutura essencial para baixar imagens de satélite. Agradeço a Jean P. Dujardin do IRD, França quem junto a Ricardo Gürtler e Judith Schachter-Broide do Laboratório de Eco-epidemiologia da Universidad de Buenos Aires, Argentina, me ofereceram as primeiras ferramentas teóricas na morfometria geométrica. Posteriormente tive a imensa sorte de conhecer a Nicolás Jaramillo do Instituto de Biología, da “Universidad de Antioquia”, Colômbia, quem com infinita paciência e altos dotes didáticos, fortaleceu meus conhecimentos e me ofereceu incondicionalmente todo seu apoio e seu tempo, com discussões fascinantes sobre esse tema. Rita de Cássia do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR) também me ajudou nos primeiros passos pela morfometria. Carlota Belisário do CPqRR socorreu meus pedidos de barbeiros de Ceará e Roraima e me ofereceu sua amizade e sua família. Marcelo Lorenzo da mesma Instituição, junto a Claudio Lazzari e Sebastián Minoli da “Université François Rabelais”, França, participaram no trabalho de dispersão ativa de *T. pseudomaculata*. Maria Anice M. Sallum, Curadora da Coleção Entomológica da Universidade de São Paulo, colocou à nossa disposição a valiosíssima coleção de barbeiros desta instituição. Rosemere Duarte da Escola Nacional de Saúde Pública da FIOCRUZ me ensinou um mundo de pipetas e tubos, novo para mim, me apresentando o ELISA e me contagiando com sua delicadeza. Fernando Monteiro do Depto de Medicina Tropical me fez mergulhar no invisível mundo das moléculas, além de responder as minhas perguntas com total dedicação e Márcio, Jonas e Silvia, me ajudaram na bancada e me ensinaram os “jeitinhos” fundamentais! Fico muito grata ao Dr. Adriano BRILHANTE Kury pela tradução do resumo e por atender, as minhas urgentes demandas. Outro salvador foi Vinicius, que árdua e repetidas vezes lutou contra o Bill Gates para manter a minha tranquilidade cibernética. Finalmente, quero agradecer ao Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, por ter aceitado ser o relator desta tese e fazer um grande esforço para revisá-la em tempo recorde e a todos os membros da banca que aportaram uma discussão frutífera e revisaram com total dedicação este trabalho.

Todo este trabalho foi possível graças ao financiamento do “Institut de Recherche pour le Développement”, França, a bolsa de doutorado oferecida pela CAPES e varios financiamentos outorgados pela FIOCRUZ, Brasil. Agradeço a María E. Protto, secretaria do Setor Cultural da Embaixada do Brasil em Buenos Aires, quem cordialmente estabeleceu os contatos com a CAPES, a través do convênio PEC-PG, responsável pela minha manutenção. Minha primeira viagem para trabalhar com D. Gorla, foi graças à bolsa do CDIA-EC (Chagas Disease Intervention Activities -European Community).

Bem, chegou um momento muito especial que é o agradecimento (em ordem cronológico) para os meus orientadores. Liléia é responsável de me resgatar do primeiro mundo e me trazer de volta para este “meu mundo”, dando-me a possibilidade de fazer este trabalho no Brasil. Isso será um reconhecimento eterno; estabeleceu os primeiros contatos com François e me ofereceu além do seu profundo conhecimento sobre os barbeiros, sua dedicação, sua amizade e doçura. Quando precisei, ela deu o apoio necessário. Muito obrigada Liléia! Agora lhe toca a François... ele é, simplesmente, pilar fundamental desta tese sem ele... tampouco este documento estaria nas suas mãos. Quero destacar que tem sido o orientador que todo estudante gostaria ter. Ofereceu-me toda sua experiência no trabalho de campo, tornando-me capaz para enfrentá-lo... é admirável como conhece o exato instante em que uma sutil brincadeira pode ajudar a esquecer o terrível, intenso e fatigante trabalho no sertão! Deu-me a possibilidade de viajar pelo e fora do Brasil, enriquecendo-me com todos os conhecimentos extra-tese que isso representou. Deu-me sua confiança para tentar materializar minhas idéias, apoiou as minhas propostas e respeitou meus critérios, sem me deixar sozinha, sempre com o seu apoio mesmo a distância. Ensinou-me também, a trabalhar tranqüila, em um ambiente de respeito, contente, sem medos, feliz; por isso François, serei sempre grata. Merci!.

Finalmente, um momento carregado de emoção pessoal. Meus pais forjaram a pessoa que sou; seus ensinamentos ficarão em mim até o final e sou profunda e conscientemente grata pelo apoio incondicional, mesmo com as dificuldades e a distância. Minha irmã tem sido sempre apoio importantíssimo durante minha ausência, motivo de imenso agradecimento, de admiração e respeito. Grito milhões de “**muchas gracias**” para vocês. Na metade deste trabalho, chegou à minha vida, Abel, meu esposo, quem desde então, batalhou do meu lado, cotovelo a cotovelo, “codo a codo”, cada parte desta tese no tempo que restava da sua, e posteriormente a sua defesa postergou sua vida para me ajudar. Sem dúvida, seu amor, sua alegria e sua tranqüilidade, me trouxeram a força necessária para culminar esta tese. Flavia Krsticevic me presenteou com sua amizade e proporcionou literatura importante no campo molecular e presentes argentinos que foram sempre bem-vindos, despertando saudades! Pedri Dorta e Ratri García ajudaram na correção do inglês e fizeram os domingos mais agradáveis, mesmo através da internet. Agradeço aos velhos e novos amigos Adrián, Gastón, Eli, Tati, Sole, Sergio, Alessandro, Denis e Simone, sempre rondando por perto e fazendo-me sentir querida. Obrigada Vera, Nelie, Isa, Felipe, Tatiana, Rogério, Ana Paula e Ângela pelas reflexões semanais que tornaram os dias desta tese, mais simples.

Saibam desculpar se omiti algum nome, naturalmente, tem sido produto só do cansaço final. Sou grata a todos. **Muchísimas gracias!**

Informe clínico

No estalla como las bombas, ni suena como los tiros.

Como el hambre, mata callando.

Como el hambre, mata a los callados: a los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido.

Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende. El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que interese a los políticos ni a los periodistas.

Elige a sus víctimas en el pabrerío. Las muerde y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas. Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen. Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren

Relatório clínico

Não estoura como as bombas, nem soa como os tiros.

Como a fome, mata calando.

Como a fome, mata aos calados: aos que vivem condenados ao silêncio e morrem condenados ao esquecimento.

Tragédia que não soa, doentes que não pagam, doença que na vende. O mal de Chagas não é negocio que atraia a indústria farmacêutica nem é tema que interesse a políticos nem a jornalistas.

Escolhe suas vítimas entre os pobres. As morde e lentamente, pouco a pouco vai acabando com elas. Suas vítimas não têm direitos, nem dinheiro para comprar os direitos que não tem. Nem sequer têm direito de saber do que morrem.

Eduardo Galeano, escritor uruguaio nascido em 1941, autor da reconhecida obra “As veias abertas da América Latina”, 1971. Tomado do livro “Chagas, uma tragédia silenciosa” da organização Médicos sem Fronteiras, 2005. Tradução ao português Nélie Sá Pereira.

INDICE	Pag.
Folha de Rosto	ii
Folha de Aprovação	iii
Folha de Dedicatória	iv
Folha de Agradecimentos	v
Folha de Epígrafe	ix
Resumo	xiii
Abstract	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>A doença de Chagas</i>	1
1.1.1. <i>Biologia e transmissão do T. cruzi</i>	3
1.2. <i>Os vetores: Triatominae</i>	4
1.3. <i>O “complexo Triatoma maculata” e espécies afins</i>	5
1.3.1. <i>Caracteres morfológicos de diferenciação taxonomica</i>	8
1.3.2. <i>Biologia e ecologia</i>	10
2. PROBLEMÁTICA	16
3. OBJETIVOS	18
3.1. <i>Objetivo geral</i>	18
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. <i>Áreas de estudo</i>	19
4.2. <i>Captura de triatomíneos</i>	19
4.2.1. <i>Populações sinantrópicas</i>	19
4.2.2. <i>Populações silvestres</i>	19
4.3. <i>Processamento geral</i>	21
4.4. <i>Escolha das técnicas de caracterização</i>	23
5. RESULTADOS	27
5.1. <i>Primeiro manuscrito: Misidentification of two Brazilian Triatomines</i>	27
5.2. <i>Segundo manuscrito: Relationship revisited by geometric morphometry</i>	45
5.3. <i>Terceiro manuscrito: Inferences about the antennal phenotype</i>	63
5.4. <i>Quarto manuscrito: Distribution of two Chagas disease vectors</i>	80
5.5. <i>Quinto manuscrito: Flight dispersal of Chagas disease vectors</i>	100
5.6. <i>Sexto manuscrito: Behavioural Plasticity of Triatominae</i>	110
5.7. <i>Manuscrito em preparação: Biologia comparativa de T. pseudomaculata e T. wygodzinskyi</i>	129
5.7.1. <i>Metodologia</i>	129
5.7.1.1. <i>Origem das amostras</i>	129

5.7.1.2. <i>Ciclo biológico</i>	129
5.7.1.3. <i>Ingestão sanguínea</i>	130
5.7.1.4. <i>Mortalidade</i>	130
5.7.1.5. <i>Análise estatística</i>	130
5.7.2. <i>Resultados e Discussão</i>	130
5.7.2.1. <i>Ciclo biológico</i>	130
5.7.2.2. <i>Ingestão sanguínea</i>	134
5.7.2.3. <i>Mortalidade</i>	136
5.8. <i>Manuscrito em preparação: Estado alimentar de populações silvestres e peridomésticas de T. pseudomaculata e T. wygodzinskyi</i>	138
5.8.1. <i>Metodologia</i>	138
5.8.1.1. <i>Área de estudo</i>	138
5.8.1.2. <i>Coleta dos triatomíneos</i>	139
5.8.1.3. <i>Processamento dos triatomíneos</i>	139
5.8.1.4. <i>Análise dos dados</i>	140
5.8.2. <i>Resultados</i>	140
5.8.2.1. <i>Populações silvestres vs. peridomésticas</i>	140
5.8.2.2. <i>Variação estacional</i>	142
5.8.2.3. <i>Fontes de alimentação</i>	142
5.9. <i>Manuscrito em preparação: Relações filogenéticas entre T. pseudomaculata, T. wygodzinskyi e T. maculata baseadas em seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase I</i>	145
5.9.1. <i>Metodologia</i>	145
5.9.1.1. <i>Extração do DNA</i>	145
5.9.1.2. <i>Amplificação e seqüenciamento do DNA</i>	145
5.9.1.3. <i>Alinhamento e análises filogenéticas</i>	146
5.9.2. <i>Resultados e Discussão</i>	147
5.10. <i>Outros resultados</i>	153
5.10.1. <i>Taxa infecção com Trypanosoma cruzi</i>	153
5.10.2. <i>Dispersão de T. wygodzinskyi mediante o vôo</i>	153
6. <i>DISCUSSÃO GERAL</i>	154
6.1. <i>Taxonomia</i>	154
6.1.1. <i>O status específico das espécies é válido?</i>	154
6.1.2. <i>Existiram e continuam existindo erros de identificação na literatura?</i>	154
6.2. <i>Sistemática</i>	156
6.2.1. <i>Existe alguma evidencia que suporte um grupo natural conformado por T. maculata e T. pseudomaculata?</i>	156
6.3. <i>Aspectos ecológicos, biológicos e epidemiológicos</i>	157

6.3.1. <i>A distribuição geográfica das espécies que compõem o “grupo wygodzinskyi” pode ser predita?</i>	157
6.3.2. <i>T. pseudomaculata pode se dispersar através do vôo?</i>	158
6.3.3. <i>Qual é o estado alimentar de T. pseudomaculata e T. wygodzinskyi em ambientes silvestre e peridoméstico?</i>	159
6.3.4. <i>Apresenta T. pseudomaculata uma plasticidade comportamental em relação ao seu habitat, quando se muda do ambiente silvestre para o peridomicílio?</i>	161
6.3.5. <i>T. pseudomaculata e T. wygodzinskyi apresentam taxa de infecção natural elevadas pelo T. cruzi?</i>	161
7. CONCLUSÕES	163
8. REFERÊNCIAS	165
ANEXO I	181
ANEXO II	188

RESUMO

Triatoma pseudomaculata, *T. wygodzinskyi*, *T. arthurneivai* e *T. maculata* (Hemiptera: Triatominae) são vetores da doença de Chagas com distintos graus de importância epidemiológica. As três primeiras são exclusivamente brasileiras e a última ocorre ao norte da América do Sul (no Brasil, restrita ao estado de Roraima). Segundo vários autores, *T. pseudomaculata* e *T. maculata* compõem o "complexo *T. maculata*" devido às suas semelhanças morfológicas. Porém, existem indícios de que este agrupamento não seja natural, pois há o indício de que *T. pseudomaculata* seja mais relacionada com *T. wygodzinskyi*. Além deste problema sistemático existe um déficit de informação sobre aspectos morfológicos, biológicos, ecológicos e genéticos dessas espécies. Por serem *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata* espécies irmãs, onde a primeira é estritamente silvestre e a segunda encontra-se em processo de domiciliação, estas constituem um excelente modelo para se entender o papel desempenhado pela plasticidade morfológica e comportamental e a divergência ecológica e genética no processo de adaptação aos ambientes antrópicos.

As ferramentas utilizadas para diferenciar as espécies foram o fenótipo antenal, a morfometria geométrica das asas e o seqüenciamento de um gene mitocondrial. Todas essas técnicas mostram que *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. arthurneivai* e *T. wygodzinskyi* são taxa bem definidos independentemente das suas similitudes externas. Foram detectados erros de identificação para *T. arthurneivai*, postulando-se que os registros desta espécie fora da Serra do Espinhaço correspondem a *T. wygodzinskyi*. A criação do "complexo *T. wygodzinskyi*" formado por *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata*, e a desconsideração do "complexo *T. maculata*" estão sendo propostas baseadas em evidências filogenéticas e fenotípicas. *T. arthurneivai* s.s. apresenta semelhanças fenotípicas com *T. wygodzinskyi*, sendo um forte candidato a integrar o novo complexo.

Dados obtidos sobre diferentes aspectos da biologia destas espécies reforçam tais evidências filogenéticas. A duração dos ciclos de vida e o comportamento de ingestão de sangue de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* são próximos entre si e diferentes aos de *T. maculata*. A distribuição geográfica conhecida de *T. pseudomaculata* é coerente com os modelos de distribuição preditivos obtidos a partir do sensoriamento remoto, ficando associada às províncias biogeográficas de caatinga e cerrado. Entretanto, para *T. wygodzinskyi*, o modelo prediz uma

distribuição mais ampla que a conhecida, estendendo-se pelas províncias biogeográficas do Bosque Paranaense e Bosque de *Araucaria angustifolia*.

Do ponto de vista ecológico, foi constatado que as populações silvestres de *T. wygodzinskyi* são estritamente rupícolas e as de *T. pseudomaculata* arborícolas, podendo ser encontradas em ocos de árvore e em ninhos de aves e tocas de roedores localizadas nas árvores. Ambas as espécies possuem uma notável amplitude trófica, podendo alimentar-se tanto de sangue de vários tipos de vertebrados quanto da hemolinfa de artrópodes, caracterizando assim uma hemolinfagia residual. Populações silvestres de *T. pseudomaculata* apresentam um déficit nutricional marcado quando comparadas com populações peridomésticas. Este déficit nutricional, associado à plasticidade comportamental (fontes de sangue, eleição do habitat) e à capacidade constatada de dispersão pelo vôo, poderia favorecer a invasão e colonização das construções antrópicas. Embora esta espécie apresente ampla capacidade para invadir esses ambientes, não possui uma significativa habilidade para colonizar o domicílio. Porém, a presença de populações silvestres garante uma re-colonização continuada dos ambientes peridomésticos. Por tal motivo, é indispensável não se descuidar vigilância e controle entomológico em áreas infestadas.

ABSTRACT

Triatoma pseudomaculata, *T. wygodzinskyi*, *T. arthurneivai* and *T. maculata* (Hemiptera: Triatominae) are Chagas disease vectors with different epidemiological importance. The first three species are exclusively Brazilian, while the last one occurs in the northern part of South America (in Brazil, it is restricted to the state of Roraima). According to various authors, *T. pseudomaculata* and *T. maculata*, which share many morphologic and chromatic characteristics, form the *T. maculata* complex. Evidence exists, however, to support that this group might be invalidated and that *T. pseudomaculata* could be more closely related with *T. wygodzinskyi*. Besides this systematic problem, there is a deficit of information on morphological, biological, ecological and genetic aspects of these triatomine species. Because *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* would be closely related species, the first being strictly silvatic and the second in domestication process, these constitute a good model for understanding the influence of morphological and behavioural plasticity, and ecological and genetic divergences, on the process of adaptation to anthropic environments.

Antennal phenotype, geometric morphometry of the wings and sequences of a mitochondrial gene were the tools used to differentiate the species. All these techniques show that *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. arthurneivai*, and *T. wygodzinskyi* are well defined taxa, independently of their external similarities. Misidentifications were detected for *T. arthurneivai*, being postulated that the records of this species out of the Serra do Espinhaço would correspond to *T. wygodzinskyi*. The creation of the *T. wygodzinskyi* complex, formed by *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata*, and the removal of the *maculata* group are being proposed based on phylogenetic and phenotypic evidence. *T. arthurneivai* s.s, which presents strong phenotypic similarities with *T. wygodzinskyi*, would be a candidate to integrate the new group.

Data obtained on different aspects of the biology of these species reinforce such phylogenetic evidence. The life cycle and blood ingestion pattern of *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* are closer to each others that to *T. maculata*. The known geographical distribution of *T. pseudomaculata* is coherent with the predictive models of distribution obtained from remote sensors, being associated to the biogeographic provinces of the Cerrado (savanna) and Caatinga (steppe).

However, for *T. wygodzinskyi*, they predict a wider distribution, extending to biogeographic provinces of the Paraná Forest and the *Araucaria angustifolia* Forest. From an ecological point of view, it was verified that wild populations of *T. wygodzinskyi* are strictly rupicolous while those of *T. pseudomaculata* are arboreal, being found in hollow trees and bird nests. Both species have a wide trophic amplitude, being able to feed on many vertebrate hosts and on arthropods, exhibiting a residual hemolymphagy. Wild *T. pseudomaculata* populations show a marked nutritional deficit when compared with peridomestic populations. This nutritional deficit, associated to a behavioral and trophic plasticity and the confirmed flight dispersal, could favor the invasion and colonization of anthropic structures. Although *T. pseudomaculata* presents a high capacity to invade peridomestic structures, it does not have a significant ability to colonize the houses. However, the existence of wild populations favors a continuous recolonization of the peridomestic environments. For this reason, it is indispensable not to neglect the surveillance tasks and entomological control.

1. INTRODUÇÃO

Esta tese encontra-se dividida em oito capítulos. O primeiro capítulo, (**Introdução**), tem como objetivo inserir ao leitor em aspectos gerais da doença de Chagas e seus vetores, para finalmente aprofundar sobre as espécies estudadas. O segundo capítulo (**Problemática**), explica os motivos que levaram à realização deste estudo e o terceiro capítulo (**Objetivos**) os detalha. No capítulo dedicado à metodologia (**Material e Métodos**), o leitor encontrará uma descrição geral dos métodos abordados, sem constar descrições completas, as quais são tratadas particularmente em cada artigo. Assim, o quinto capítulo (**Resultados**) é apresentado na forma de manuscritos, sendo um deles publicado, dois no prelo, três submetidos (os seis em periódicos científicos indexados) e três em preparação. Além da discussão realizada dentro de cada artigo, que envolve unicamente o tema abordado nele, é apresentado o capítulo destinado a debater o tema de estudo completo (**Discussão**), para uma melhor compreensão global. Já as conclusões são proporcionadas no sétimo capítulo (**Conclusões**). O oitavo capítulo (**Referências**) lista a bibliografia citada no primeiro, segundo, terceiro e quarto capítulo. Finalmente, o **Anexo I** oferece cópia do artigo publicado e o **Anexo II** mostra outros dois artigos em co-autoria, relacionados com a tese, mas que não forma parte dela.

1.1. A doença de Chagas

Entre 1909 e 1912, o médico brasileiro Carlos Chagas revelou à comunidade científica um descobrimento inédito na medicina mundial, apresentando uma nova enfermidade, seu agente etiológico, seus reservatórios naturais e o seu transmissor (Chagas, 1909; 1912). Por ter proporcionado tamanha proeza, essa doença levou seu nome em sua homenagem. Em 1907, o jovem médico de 28 anos tinha sido enviado para o estado de Minas Gerais devido à existência de um surto de malária que afetava aos operários da Estrada de Ferro Central do Brasil. Depois de haver controlado o problema, resolveu investigar os quadros de difícil interpretação que acometiam os habitantes da região. Encontrou um inseto com flagelados no seu intestino que enviou para o médico sanitário Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, pedindo-lhe que o alimentara sobre *sagüis* (*Callithrix penicillata* Saint-Hilaire, 1812) livres de infecção. Logo depois de umas semanas,

esses sagüis encontraram-se infectados com um flagelado. Posteriormente, realizou inúmeros exames de sangue nos habitantes da região e encontrou, finalmente, uma menina e um gato infectado com formas circulantes de um parasita idêntico ao visto no sangue dos sagüis supracitados, que denominou *Schizotrypanum cruzi*.

Uma vez descoberta, e até a atualidade, a doença de Chagas tem representado um problema de saúde pública que se estendeu para toda América Latina. Porém, dados de paleopatologia demonstram a existência da infecção em humanos desde os anos 7000 AC no deserto de Atacama (Norte do Chile e sul do Peru) onde múmias fossilizadas afetadas pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) apresentaram lesões típicas da doença (Rothhammer et al., 1985; Fornaciari et al., 1992; Aufderheide et al., 2004). Dados fornecidos pelos últimos autores para múmias dessa mesma região mostram que durante o Holoceno a prevalência dessa enfermidade alcançou até um 41%.

Os últimos dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde indicam que existem aproximadamente 16 a 18 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* na América Latina e cerca de 50.000 mortes devido a doença de Chagas ocorrem cada ano (WHO, 2006). Já o “Center for Disease Control and Prevention” dos EUA, informa que existem 11 milhões de pessoas infectadas (CDC, 2006). Recentemente, Schofield et al. (2006), baseados na última estimativa do “Disease Control Priorities Project of the NIH” e do Banco Mundial, sugerem haver uma prevalência total de 9,8 milhões. É evidente que o panorama ameaçador prévio a 1991, tem sido modificado. À reunião denominada Iniciativa do Cone Sul realizada nesse ano, convocaram-se cientistas e representantes dos governos da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, para unir esforços no intuito de diminuir a transmissão, principalmente vetorial, da doença. Em junho de 2006, a Comissão Intergovernamental da Iniciativa do Cone Sul declarou o Brasil formalmente livre da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Schofield et al., 2006). Contudo, existem cerca de 3000 municípios que apresentam algum grau de infestação triatomínica que, na sua grande maioria, corresponde a espécies nativas secundárias que invadem as habitações humanas. Existem atualmente entre dois e quatro milhões de pessoas portadoras do *T. cruzi* no Brasil (Dias, 2006).

1.1.1. *Biologia e transmissão do T. cruzi*

O *T. cruzi* é um flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, caracterizado pela presença de um flagelo, membrana ondulante e mitocôndria única situada no cinetoplasto. Morfologicamente é semelhante a *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), protozoário considerado não patogênico para hospedeiros vertebrados que são infectados pela picada do vetor, principalmente por triatomíneos do gênero *Rhodnius* (Dujardin et al. 2000). Diferentemente deste parasita, o *T. cruzi* é transmitido para os seus hospedeiros, entre eles o homem, através das dejeções dos seus vetores triatomíneos. Os insetos contraem a infecção ao se alimentar do sangue de mamíferos infectados, normalmente conservando a infecção pelo resto da sua vida. Tanto anfíbios e répteis, quanto aves são refratários a este parasita.

Os flagelados depositados durante a dejeção do vetor penetram na pele do hospedeiro através do orifício deixado pelo aparelho bucal do inseto, pelas mucosas ou por qualquer outra ferida. A multiplicação do parasito no local de penetração precede à parasitemia sanguínea e à proliferação intracelular em vários tecidos, principalmente os músculos cardíaco e liso, o sistema nervoso autônomo e os fagócitos mononucleares.

O parasita experimentará várias mudanças morfológicas durante seu desenvolvimento, dentre as quais mudanças de tamanho, forma e posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. Assim, o estágio amastigota (ou micromastigote) é arredondado, sem flagelo aparente ao microscópio ótico, e é intracelular. Multiplica-se dentro dos macrófagos e outras células dos tecidos supracitados. O estágio epimastigota é extracelular encontrando-se no intestino médio do vetor. Finalmente, o estágio tripomastigota representa uma forma parasitária em interno movimento, que quando está na corrente sanguínea do vertebrado (tripomastigota sanguíneo), pode invadir as células do paciente, infectar o vetor durante a hematofagia ou deixar o intestino do triatomíneo e sair nos dejetos e invadir o tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado (tripomastigota metacíclico) até ser capturado pelos macrófagos (Dujardin et al., 2000; Coura, 2005). Segundo Dujardin et al. (2000), este flagelado se hospeda na fauna sul, norte e centro-americana do nosso continente, portanto é ilusório tentar erradicá-lo a partir de um reservatório animal, mesmo que seja este doméstico.

Embora a via de transmissão vetorial seja a mais relevante (dependendo do país), existem outras vias que vêm recebendo atenção. Entre elas acha-se a transmissão por transfusão de sangue, que tem sido reduzida amplamente através das iniciativas intergovernamentais, com dados que apontam 100% de cobertura e 0.61% de soro-positividade em transfusões feitas no Brasil (Schofield et al., 2006). A transmissão congênita pode ser outra via de veiculação do parasita e estima-se que exista atualmente 1% de risco de transmissão entre as mulheres grávidas brasileiras infectadas (Dias, 2006). A via oral pode ser um modo de aquisição de *T. cruzi* por mamíferos que ingerem insetos (Arganaraz et al., 2001; Coura, 2005), ou que têm o hábito de limpar-se com a língua, lambendo, eventualmente, a pele contaminada pelo excremento de um triatomíneo. Nos humanos, a ingestão oral do *T. cruzi* com suco de açaí, patauá, buriti, bacaba, vinho de palmeira, entre outros; pode ocasionar micro-epidemias graves e importantes com certo impacto social (Nery-Guimarães et al., 1968; Shikanai-Yasuda et al., 1991; Valente et al., 2001; Ianni & Mady, 2005; Pérez-Gutiérrez et al., 2006). Outras vias de transmissão, tais como transplante de órgãos e acidentes de laboratório, são menos freqüentes e correspondem a <1% de incidência total (Schofield, 1994; WHO, 2002).

1.2. Os vetores: *Triatominae*

Os primeiros relatos sobre os triatomíneos surgiram em 1590, em uma viagem de inspeção a conventos peruanos e chilenos realizada pelo Frei Reginaldo de Lizárraga (Lent & Wygodzinsky, 1979). Posteriormente, outros naturalistas e viajantes relataram o encontro desses hematófagos na América do Sul, entre eles os feitos por Charles Darwin (Darwin, 1871). Mas foi depois de se conhecer a importância epidemiológica destes insetos, em 1909, que se ampliaram os interesses em estudá-los.

Os triatomíneos pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Esta se constitui de 138 espécies agrupadas em seis tribos: Rhodniini Pinto, 1926; Triatomini Jeannel, 1919; Cavernicolini Usinger, 1944; Bolboderini Usinger, 1944; Alberproseniini Martinez & Carcavallo, 1997 e Linshcosteini Carcavallo, Jurberg, Lent, Noireau & Galvão, 2000 (Galvão et al., 2003; Costa & Felix, 2007).

A subfamília Triatominae foi descrita originalmente preconizando o conceito de hematofagia obrigatória (Jeannel, 1919; Usinger, 1943). Porém, observações de

alimentação sobre a hemolinfa de outros insetos (hemolinfagia) têm sido relatadas esporadicamente (Lent & Wygodzinsky, 1979; Dujardin et al., 2000). Segundo Schofield et al. (2000a), os triatomíneos haveriam evoluído de outros reduvídeos predadores ou fitófagos, manifestando uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, comportamentais e demográficas que se deveriam principalmente à utilização do sangue de vertebrados como fonte de alimentação, à adaptação ao ambiente do hospedeiro e a dependência progressiva dele para se dispersar passivamente.

Atualmente, a origem dos Triatominae encontra-se em discussão. Inicialmente Lent & Wygodzinsky (1979) propuseram uma origem monofilética para o grupo, baseada no hábito estritamente hematófago, presença da conexão membranosa entre o segundo e terceiro segmento do rostro e ausência de glândulas abdominais dorsais nas ninfas. Posteriormente, Schofield (1988) sugeriu a origem polifilética a partir de informações ecológicas e biogeográficas. Vários estudos corroboraram essa hipótese baseada em diferenças morfológicas e moleculares entre as duas tribos mais importantes, os Rhodniini e os Triatomini (Schofield & Dolling, 1993; Carcavallo et al., 1998a; Gorla et al., 1997; Garcia et al., 1998; Schofield & Dujardin, 1999; Barges et al., 2000; Schofield, 2000b). Porém, segundo Schaefer (2003), essas diferenças poderiam não necessariamente indicar origens distintas e sim uma diferenciação entre esses grupos. Hypša et al. (2002), apresentaram um abrangente estudo filogenético de Rhodniini, Triatomini e Linshcosteini, utilizando dentre outras análises seqüências de DNA mitocondrial (DNAmt), sugerindo novamente a origem monofilética do grupo. Com as mesmas seqüências de DNA de espécies de Rhodniini e Triatomini, mas realizando uma análise cladística na que haveria mais reduvídeos predadores como grupos externos que os utilizados por Hypša et al. (2002), Paula et al. (2005) voltaram a sugerir a origem polifilética dos triatomíneos. Essas controvérsias sugerem que ainda são necessários estudos adicionais para estabelecer a origem dos Triatominae, já que dependendo das metodologias, resultados conflitantes têm sido obtidos.

1.3. O “complexo *T. maculata*” e espécies afins

O conceito de “complexo de espécies” para os Triatominae foi estabelecido por Usinger et al. (1966), e posteriormente desenvolvido por Lent & Wygodzinsky (1979), Carcavallo et al. (2000) e finalmente por Dujardin et al. (2000). Baseados em

caracteres morfológicos e qualitativos, Dujardin et al. (2000) reconhecem dois grupos de triatomíneos que abrangem dois subgrupos, nove complexos e seis subcomplexos. Assim, estabeleceram o grupo *Protracta*, constituído pelos complexos *lecticularia* e *protracta*, os quais contem somente 13 das 138 espécies descritas de Triatominae. Já o grupo *Rubrofasciata*, inclui a maioria das espécies destes insetos, incluídas nos subgrupos *Infestans* e *Rubrofasciata*. O primeiro subgrupo (*Infestans*) é formado por três complexos: *circummaculata*, *dispar* e *infestans*. Por sua vez, este último complexo é constituído por seis subcomplexos agrupando a maioria das espécies, entre elas *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, as quais foram agrupadas no subcomplexo *maculata*. O segundo subgrupo (*Rubrofasciata*) inclui os complexos *flavida*, *phyllosoma*, *rubrofasciata* e *spinolai*. Carcavallo et al. (2000) propuseram paralelamente uma denominação diferente, incluindo *T. maculata* e *T. pseudomaculata* no "complexo *Triatoma maculata*", sem considerar categorias hierárquicas superiores de grupo.

Devido às suas semelhanças *T. pseudomaculata* foi confundida por muitos anos com *T. maculata*, uma espécie encontrada no Brasil (Estado de Roraima), Venezuela, Colômbia, Suriname, Guiana, Guiana Francesa e algumas ilhas do Caribe (Carcavallo et al., 1998b). Entretanto, *T. pseudomaculata* foi formalmente descrita a partir de espécimes coletados na localidade de Sobral, Ceará, e com distribuição geográfica posteriormente reconhecida como sendo restrita ao nordeste brasileiro (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Segundo a hipótese atual, *T. maculata* e *T. pseudomaculata* poderiam ser o resultado da evolução de duas populações geográficas derivadas de um antepassado comum (Schofield, 1988). Nos últimos anos, este grupo e a hipótese da sua origem vêm sendo questionados por estudos genéticos, morfológicos e de hibridizações (Hypša et al., 2002; Belisário et al., 2007; Santos et al., 2007). Outros dois triatomíneos silvestres brasileiros, *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940 e *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951, exibem semelhanças morfológicas com *T. pseudomaculata* (Lent & Wygodzinsky, 1979; Carcavallo et al., 1998c) e com *T. maculata* (Fig. 1.1). Ambas também foram incluídas inicialmente no grupo *infestans* por Lent & Wygodzinsky (1979), mas Carcavallo et al. (2000) consideraram que não existe informação suficiente para situá-las em um grupo já reconhecido. Portanto, suas relações com outros triatomíneos necessitam ser investigadas.

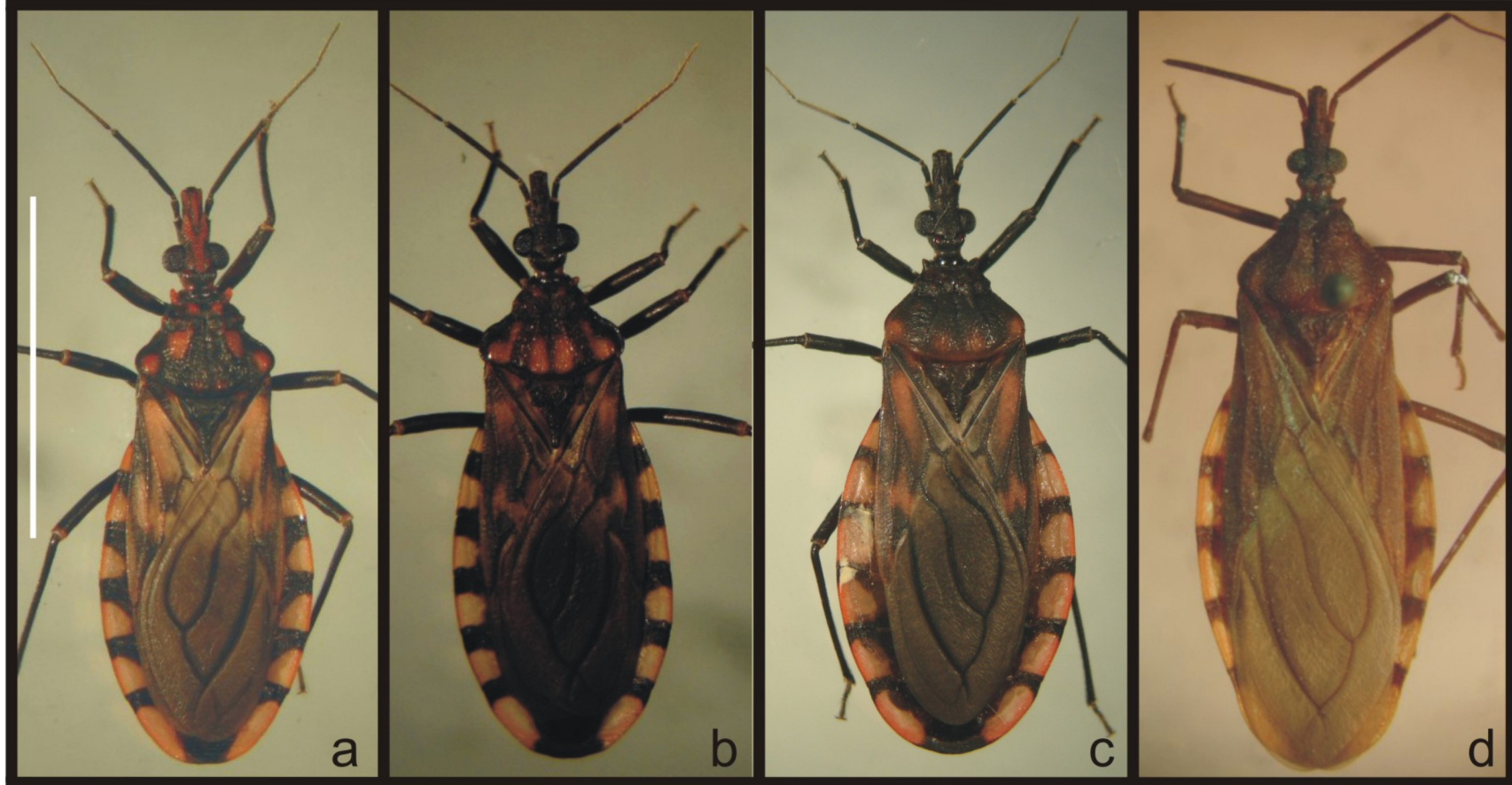


Fig. 1.1: Fotografia apresentando as espécies estudadas: a) *Triatoma maculata* (Erichson, 1848); b) *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964; c) *T. wygodzinskyi* Lent, 1951; d) *T. arthurneivai* Lent & Wygodzinsky, 1940. Escala= 10 mm. Fotos A. Pérez González.

1.3.1. Caracteres morfológicos de diferenciação taxonômica

Galvão (1973) descreve diferenças de caracteres cromáticos entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata*. A primeira espécie apresenta o colorido geral com áreas claras mais extensas e em maior quantidade em relação à *T. pseudomaculata*, a qual não apresenta manchas na face dorsal da cabeça, o que é observado em *T. maculata*. O pronoto de *T. pseudomaculata* possui 3+3 áreas claras maiores e 1+1 áreas claras menores; em *T. maculata* são observadas 4+4 áreas claras maiores e 2+2 áreas claras menores. *T. maculata* apresenta o processo do escutelo mais longo que a base desta estrutura sendo do mesmo tamanho da base em *T. pseudomaculata*. Quanto às medidas do corpo, *T. maculata* as apresenta maiores com exceção da região pós-ocular e do pescoço, que são iguais às atribuídas à *T. pseudomaculata*. A estrutura da genitália externa masculina de *T. maculata* possui o processo do endosoma melânico, enquanto *T. pseudomaculata* apresenta-o claro (Galvão, 1973). *T. wygodzinskyi* é uma espécie muito semelhante à *T. maculata* e à *T. arthurneivai* (Lent & Wygodzinsky, 1979). Segundo Lent (1951), *T. maculata* é muito próxima de *T. wygodzinskyi*. Diferenciam-se porque *T. wygodzinskyi* tem os tubérculos discais e laterais do pronoto ausentes; o ápice do escutelo menor e existem diferenças cromáticas, principalmente no pronoto; além de seus olhos serem menos largos (Lent, 1951).

Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), *T. arthurneivai* e *T. wygodzinskyi* são espécies que não são facilmente distinguíveis por estruturas externas, mas podem ser diferenciadas pela análise do processo do endosoma (Fig. 1.2). Segundo estes autores, *T. wygodzinskyi* possui o pronoto escuro, com 1+1 manchas avermelhadas nítidas nos ângulos humerais e, em alguns espécimes, há uma larga mancha avermelhada entre as carenas, perto do bordo posterior; cório dos hemelitos com manchas avermelhadas grandes e confluentes; processos do endosoma fracamente esclerosados, com não mais da metade do comprimento do falosoma e somente com cerca de 20 dentículos apicais. Já *T. arthurneivai* apresenta o pronoto de colorido escuro uniforme; cório dos hemelitos quase totalmente escuro, com a metade apical do clavo e parte da célula corial adjacente a ela enfumaçadas como a membrana; processos do endosoma do macho fortemente esclerosado, correspondendo a mais da metade do falosoma (de comprimento) e com cerca de 100 dentículos no ápice.

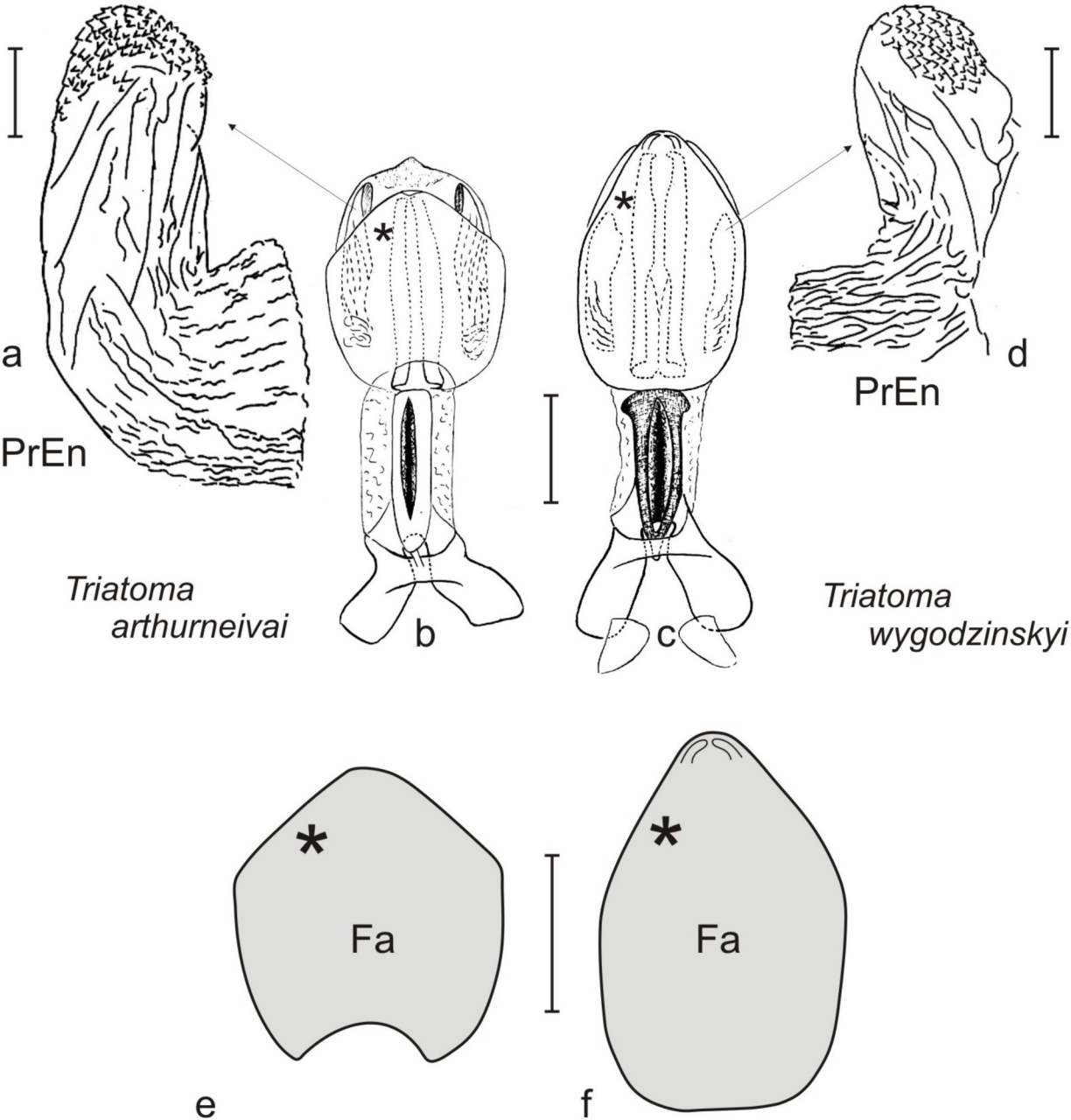


Fig. 1.2: Genitália masculina de *Triatoma arthurneivai* (a, b) e *T. wygodzinskyi* (c, d). Falos: b,c; Processo do endosoma (PrEn): a,d; Falosoma (Fa): e,f. Segundo Lent & Jurberg, 1980 (modificado). Escala: a,d= 0,3 mm; e,f= 0,5 mm.

1.3.2. *Biologia e ecologia*

Na região nordeste do Brasil, *T. pseudomaculata* é um vetor potencial que se encontra atualmente em rápido processo sinantrópico (Dias et al., 2000, Diotaiuti et al., 2000). Está distribuída exclusivamente no Brasil, nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Tocantins e Sergipe e no Distrito Federal (Carcavallo et al., 1998b; Gonçalves et al., 2006). Representa o terceiro triatomíneo mais capturado pelos serviços de controle da doença de Chagas, apenas ultrapassado por *Triatoma sordida* (Stål, 1859) e *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Dias, 2002). *T. pseudomaculata* invade as construções e outros ambientes peridomésticos, mas não dispõe de uma significativa habilidade para colonizar o intradomicílio. Porém, algumas colônias têm sido reportadas em áreas urbanas de Sobral, Ceará (Souza et al., 1999), e Berilo, Minas Gerais (Machado de Assis et al., 2006). No peridomicílio, *T. pseudomaculata* é frequentemente encontrada em galinheiros, currais e estábulos, pilhas de telhas, tijolos, poleiros, palha e madeiras (Carcavallo et al., 1998d; Costa et al., 1998; Oliveira-Lima et al., 2000; Sarquis et al., 2006) (Fig. 1.3).

Relatos sobre o hábitat silvestre e a ecologia desta espécie são escassos. Barretto (1967) descreveu sua ocorrência em fendas de árvores e cavidades de rochas, alimentando-se de roedores e marsupiais. Posteriormente, Diotaiuti et al. (1993) registraram outro encontro de *T. pseudomaculata* num oco de árvore no ambiente silvestre. Dias-Lima et al. (2003) reportaram a coleta de exemplares em cascas, ocos de árvores e ninhos de aves (Fig. 1.4). Atualmente, as fontes de alimentação conhecidas são vertebrados, principalmente galinhas, cabras, cães, coelhos, vacas, cavalos e humanos (Lent & Wygodzinsky, 1979; Carcavallo et al., 1998d).

T. maculata possui uma distribuição geográfica ampla, ocorrendo, além do estado brasileiro de Roraima, nas Antilhas Holandesas, Colômbia, Guianas, Suriname e Venezuela (Lent & Wygodzinsky 1979; Carcavallo et al., 1998b). Encontra-se no ambiente silvestre, em palmeiras do gênero *Attalea*, associada a gambás (*Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758), tamanduás (*Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758), aves e morcegos (Carcavallo et al., 1998b). No Brasil, é comumente encontrada em galinheiros e ocasionalmente em casas,

podendo estar infectada com *T. cruzi* (Lent & Wygodzinsky, 1979; Luitgards-Moura et al., 2005; 2006). Na Venezuela é considerada o segundo principal vetor da doença de Chagas (Feliciangeli et al., 2003; Sanchez-Martin et al., 2006).

T. arthurneivai foi descrita originalmente com base em exemplares provenientes da Serra do Cipó, Minas Gerais (Lent & Martins, 1940). Previamente, acreditava-se que essa espécie também se distribuía nos estados de São Paulo, Bahia e Piauí (Lent & Wygodzinsky 1979; Carcavallo et al., 1998b). Os principais dados sobre sua biologia e ecologia provêm do estado de São Paulo, sendo capturado nas anfractuosidades de rochas no ambiente silvestre e em muros de pedras soltas no peridomicílio (Martins, 1941; Pellegrino, 1948, 1950, 1951; Corrêa et al., 1962, 1965; Pinto Alves & Noda, 1964; Barretto, 1966; Forattini et al., 1968; Juarez et al., 1970; Forattini et al., 1972; Barretto et al., 1975; Lent & Wygodzinsky, 1979; Barretto & Ribeiro 1981) (Fig. 1.5). Carcavallo et al. (1998d) assinalam com dúvida a possibilidade desse inseto se alimentar em roedores e lagartos. Exemplares capturados por Barretto & Ribeiro (1981) encontraram-se naturalmente infectados com *T. cruzi*.

De *T. wygodzinskyi* conheciam-se unicamente dados sobre caracteres morfológicos externos (Lent, 1951; Lent & Wygodzinsky, 1979) e da genitália (Lent & Jurberg, 1980), obtidos a partir de apenas cinco espécimes capturados na localidade-tipo Santa Rita de Caldas, sul do estado de Minas Gerais (Carcavallo et al., 1998b) (Fig. 1.6).



Fig. 1.3: Ambiente peridoméstico de *Triatoma pseudomaculata* no estado da Bahia. A, b) currais; c) telhas; d) tijolos. Barra da escala= 10 mm. Fotos a-d por A. Walter.



Fig. 1.4: Ambiente silvestre de *Triatoma pseudomaculata* no estado da Bahia.
a) buraco em árvore, b) ninho de Furnariidae, c) troncos caídos e cascas de árvores.
Barra da escala= 10 mm. Fotos a-c por C.M. Lopes.



Fig.1.5: Ambiente silvestre e peridomestico de *Triatoma arthurneivai*. a) Localidade tipo: Fazenda Alto Palácio, Município de Feira de Santana, Serra do Cipó, Minas Gerais; b) muro de pedras; c, d) Paisagem do “campo rupestre” característico da Serra do Cipó. Barra da escala= 10 mm. Fotos a, b, d) por A. Pérez González; c) por C.M. Lopes.



Fig. 1.6: Ambiente silvestre de *Triatoma wygodzinskyi* a-c) fendas rochosas, Sertãozinho, Santa Rita de Caldas, Minas Gerais. Barra da escala= 10 mm. Fotos a-c por F. Noireau.

2. PROBLEMÁTICA

Embora a campanha de eliminação do principal vetor da doença de Chagas, *T. infestans*, tenha sido um sucesso no Brasil (Schofield et al., 2006; PAHO, 2006), existem espécies autóctones de triatomíneos consideradas vetores secundários que apresentam registros históricos de colonização de ambientes antrópicos (Dias et al., 2000; Dias, 2006). Particularmente duas situações têm causado alerta ao respeito destas espécies. A primeira é que espécies nativas possuem populações bem estabelecidas em ecótopos silvestres, o que faz com que a re-infestação de domicílios tratados seja possível (Silveira, 2000; Pereira et al., 2006). A segunda é que a eliminação de *T. infestans*, espécie com potencial biológico muito competitivo, e a liberação concomitante de nichos ecológicos, poderiam facilitar o processo de colonização domiciliar desses vetores secundários em algumas localidades do Brasil. Situações dessa natureza são mais complexas e seu controle requer vigilância continuada das próprias comunidades e re-tratamento de qualquer novo foco doméstico que venha a ser detectado (Dias, 2000; Dias et al. 2002; Schofield et al., 2006). *T. pseudomaculata* é um desses vetores secundários, constituindo a segunda espécie mais capturada no peridomicílio na região da caatinga, ficando atrás somente de *T. brasiliensis* (Silveira & Vinhaes, 1998). Diferentemente da última, no entanto, *T. pseudomaculata* tem recebido menor atenção por parte da comunidade científica. Essa espécie tem sido alvo de controvérsias com respeito a sua taxonomia e relacionamento filogenético com espécies afins.

Tendo em vista que a correta identificação taxonômica dos vetores é o primeiro passo para que estudos entomológicos sejam realizados de maneira a contribuir com a elaboração de estratégias de controle mais eficientes (Miles et al., 2003; Abad-Franch & Monteiro 2005), a primeira parte desta tese visa à caracterização filogenética e morfológica com o intuito de validar o status taxonômico de *T. pseudomaculata* e espécies afins, e a determinar seu grau de inter-relacionamento, testando a validade sistemática do “complexo *T. maculata*”. Por outro lado, devido a que os conhecimentos atuais sobre a ecologia e biologia dos triatomíneos nos seus habitats naturais são fragmentários (principalmente porque a captura de espécimes é laboriosa e longa), procurou-se realizar um estudo em diferentes escalas. A um nível macro-ecológico foi realizado um

estudo de modelos preditivos de distribuição geográfica a partir de variáveis ambientais, para *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*. A uma escala intermédia, foi analisada a capacidade de se dispersar através do vôo de *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis*, duas espécies que se encontram em simpatria no nordeste brasileiro. Por sua vez, para ambas as espécies também foi avaliada a plasticidade comportamental. Finalmente a uma escala menor, foi realizado um estudo comparativo de aspectos biológicos em *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* como bionômia, estado alimentar e das fontes alimentares, todas elas, características reconhecidas por terem um papel importante na dispersão e na instalação dos triatomíneos em construções artificiais.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Entender o papel desempenhado pela a) plasticidade morfológica, b) divergências ecológicas e c) genéticas, no processo de especiação e antropização de um grupo de triatomíneos brasileiros composto por *T. pseudomaculata*, *T. arthurneivai* e *T. wygodzinskyi*.

3.2. *Objetivos específicos*

1- Avaliar a posição taxonômica dessas espécies, analisando diferentes populações coletadas ao longo de um cline norte-sul passando nos estados de Ceará, Paraíba, Bahia, Tocantins, Minas Gerais e São Paulo, com base na morfologia (fenótipo antenal e morfometria geométrica) e seqüenciamento de DNA mitocondrial.

2- Estabelecer uma hipótese de relação filogenética entre essas espécies através da análise de seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase I.

3- Testar, de pontos de vista morfológico e filogenético, a validade do conceito atual do “complexo *T. maculata*”.

4- Adquirir novos conhecimentos sobre a morfologia, biologia e ecologia das diferentes espécies a partir de um estudo comparativo.

5- Formular modelos preditivos de distribuição geográfica para *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* através da utilização de variáveis ambientais e sensoriamento remoto (GIS/RS).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Áreas de estudo

O trabalho de campo foi desenvolvido nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil, onde existia registro prévio de ocorrência das espécies de interesse. Em relação a *T. pseudomaculata*, *T. arthurneivai* e *T. wygodzinskyi*, realizou-se um transecto em sentido norte-sul compreendendo os estados do Ceará, Paraíba, Bahia, Tocantins, Minas Gerais e São Paulo. Entretanto, os espécimes de *T. maculata* pertenceram à primeira geração de laboratório estabelecida a partir de exemplares de uma colônia silvestre originária de Mucajaí, estado de Roraima (Fig. 4.1).

4.2. Captura de triatomíneos

4.2.1. Populações sinantrópicas

A coleta dos triatomíneos nas estruturas artificiais foi realizada com a colaboração dos Agentes de saúde da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Foram realizados inquéritos entomológicos nas habitações humanas e nas estruturas peridomésticas através de busca ativa. Registrou-se a flora e fauna associada aos ecótopos positivos e os locais de captura foram geo-referenciados com um GPS Garmin™ Legend.

4.2.2. Populações silvestres

As capturas foram efetuadas em áreas naturais pelos três seguintes métodos:

a) Pesquisa direta em ecótopos potenciais tais como troncos secos, ocos de árvores, ninhos de aves ou roedores localizados nas árvores e frestas nas rochas (Fig. 4.2 a-c, f). Uma vez retirados os troncos secos ou ninhos com ajuda de machado, os mesmos foram colocados sobre um tecido branco para a melhor visualização dos triatomíneos.

b) Captura com armadilha com isca animal

O modelo padrão de armadilha descrito por Noireau et al. (1999) é constituído por um frasco plástico com 10 cm de altura por 5 cm de largura. No interior é colocado um camundongo como isca. A boca do frasco é fechada com uma malha metálica de 2 mm. Em volta do frasco, é colocada fita adesiva dupla face de 5 cm de largura com uma das extremidades voltada para cima da tela (Fig. 4.2d). As armadilhas foram colocadas ao entardecer, em ecótopos potenciais tais como ocos de árvores e tocas de animais, e retiradas na manhã seguinte.

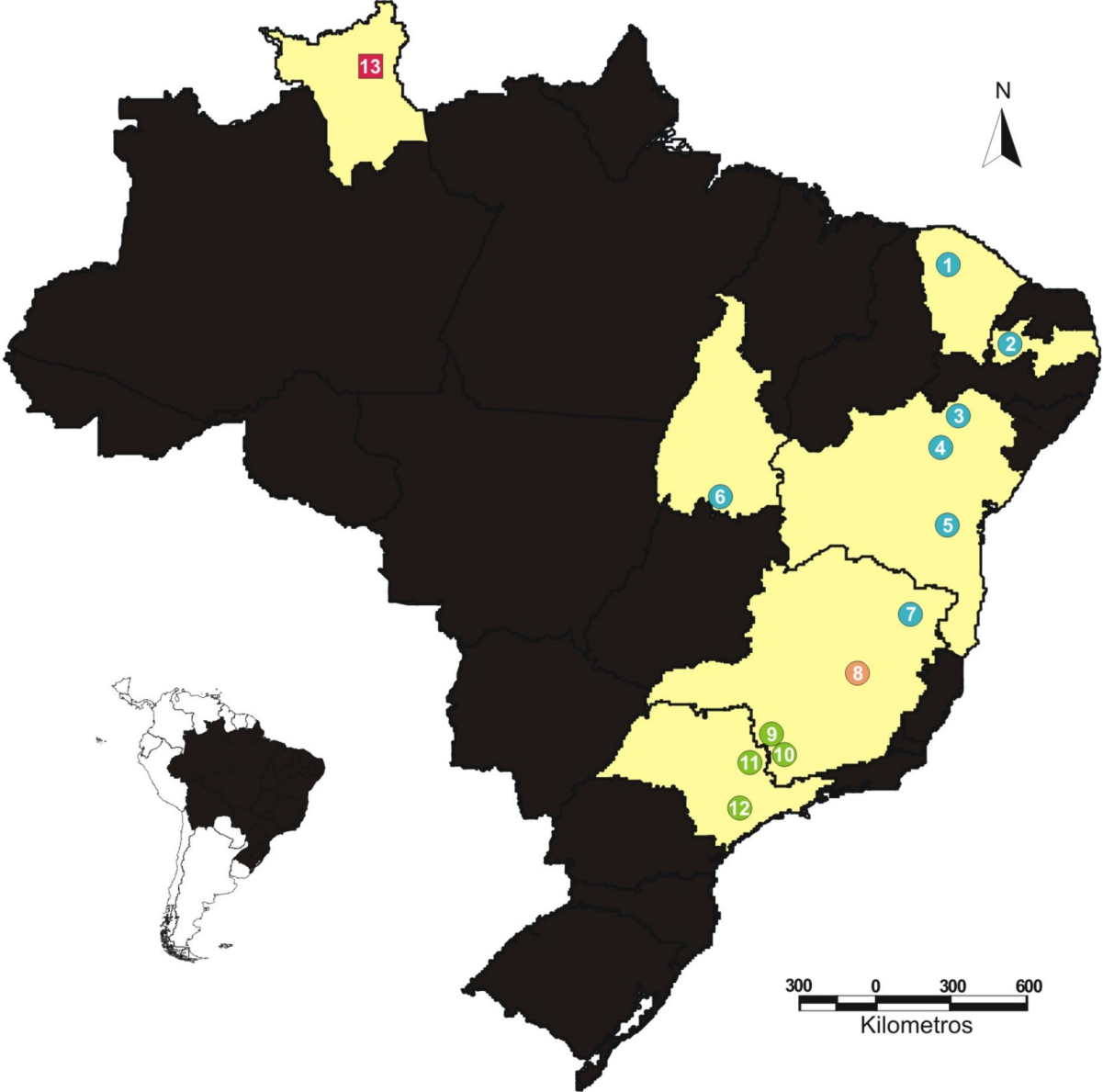


Fig. 4.1: Triatomíneos utilizados durante a presente tese: *Triatoma pseudomaculata* (círculos azuis), *T. arthurneivai* (círculo vermelho), *T. wygodzinskyi* (círculos verdes) e *T. maculata* (quadrado vermelho). Localidades de coleta: 1 (Sobral, CE); 2 (Bom Jesús, PB); 3 (Curaçá, BA), 4 (Senhor do Bom Fim, BA), 5 (Itaberaba, BA), 6 (Peixe, TO), 7 (Itaobim, MG), 8 (Serra do Cipó, MG), 9 (Pião, MG), 10 (Sertãozinho, Santa Rita de Caldas, MG), 11 (Vargem Grande do Sul, SP), 12 (Ituparanga, SP) e 13 (Mucajaí, RR).

c) Captura com armadilha luminosa

A armadilha luminosa é alimentada por gerador portátil e constituída de uma fonte de luz branca de 150 W refletida em um tecido branco. Foi ligada entre 17 e 22 h por um período de 3-4 dias consecutivos nos locais de interesse (Fig. 4.2e).

Os dois primeiros métodos permitiram apreciar a variedade dos ecótopos silvestres, a freqüências dos vetores e sua estrutura populacional. Os métodos de captura com pesquisa direta e com armadilha permitiram obter informação sobre o estado nutricional das populações silvestres. Com efeito, o método de captura por armadilha com isca animal demonstra maior eficiência na captura de barbeiros em jejum. A armadilha luminosa avaliou a capacidade das espécies de se dispersarem ativamente através do vôo.

4.3. Processamento geral

Os triatomíneos provenientes de cada coleta foram guardados no Núcleo de Ultraestrutura e Morfologia de Vetores, do Laboratório de Leshmaniose do Instituto Oswaldo Cruz. Uma identificação preliminar foi realizada usando os critérios taxonômicos preconizados por Lent & Wygodzinsky (1979). Depois, as diferentes populações foram caracterizadas através de métodos morfológicos (fenótipo antenal e morfometria geométrica) e moleculares (DNAmt). A metodologia aplicada em cada técnica, dependendo do motivo da análise, encontra-se detalhada em cada artigo, a exceção das metodologias referidas a estado nutricional, fontes alimentares e DNAmt que se encontram junto aos seus respectivos resultados para facilitar a leitura.

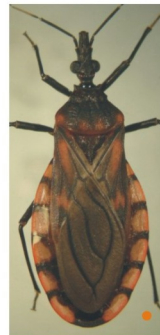
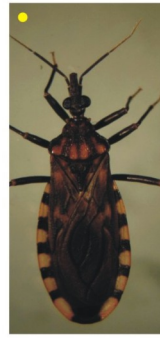


Fig. 4.2: Métodos de captura das populações silvestres de *Triatoma pseudomaculata* (a-d) e *T. wygodzinskyi* (d-f). Busca ativa (a-c, f); busca com armadilha Noireau (d); busca com armadilha luminosa (e). Pontos indicam os métodos usados para capturar *T. pseudomaculata* (amarelos) e para coletas de *T. wygodzinskyi* (laranjas). Fotos por C.M. Lopes (a-d, f) e por F. Noireau (e). *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* fotografadas por A. Pérez González.

4.4. Escolha das técnicas de caracterização

As ferramentas utilizadas em cada tipo de análise encontram-se detalhadas na Tabela 1. Mais abaixo fazemos uma introdução rápida para quatro delas:

- *Seqüenciamento de DNA mitocondrial (DNAmt)*: É considerado o meio mais direto para medir a diversidade genética, determinando seqüências de bases no DNA. O seqüenciamento de genes, particularmente mitocondriais, é uma excelente técnica para resolver problemas taxonômicos (Frankham et al., 2002). As mitocôndrias contêm moléculas de DNA circular que são herdadas maternamente na maioria das espécies (Chesser, 1998). As regiões de interesse de um gene são amplificadas por PCR (reação em cadeia da polimerase) e os seus produtos são posteriormente seqüenciados.

Recentes estudos realizados em Triatominae têm demonstrado que o seqüenciamento de DNAmt é uma ferramenta poderosa para avaliar estudos de populações e inferir relações entre espécies relacionadas e morfologicamente semelhantes (García et al., 2003; Monteiro et al., 2003, 2004; Martinez et al., 2006). Análises de seqüências de genes de DNAmt também têm sido utilizadas para inferir relações filogenéticas entre os mais amplos grupos de triatomíneos (Lyman et al., 1999; García et al., 2001; Hypša et al., 2002; Abad-Franch et al., 2003; Sainz et al., 2004; Paula et al., 2005, 2006; Pfeiler et al., 2006) e para o estudo de variabilidade genética intra-populacional (Giordano et al., 2005).

- *Fenótipo antenal*: O processo de adaptação dos triatomíneos à habitação humana resulta de particular interesse para os órgãos de saúde pública, os quais estão dando atenção especial à evolução de espécies silvestres ou peridomésticas que vão a caminho da domiciliação (SVS, 2005). Schofield (1988) postulou que a adaptação dos triatomíneos a habitats estáveis incluiria uma serie de simplificações morfológicas e comportamentais que poderiam oferecer pautas sobre a probabilidade que cada espécie tem de colonizar o domicílio. Essa teoria tem sido apoiada por vários estudos (Catalá, 1996; 1997a,b; Gracco & Catalá, 1997), demonstrando que espécies adaptadas a uma gama estreita de habitats, como *T. infestans* domiciliado, possuem um número menor de quimiorreceptores antenais que espécies adaptadas a viver em diversos habitats, como *T. sordida*.

Como em outras espécies, o comportamento dos triatomíneos requer mecanismos precisos que assegurem uma elevada probabilidade de sucesso, já que de isso dependerá a sobrevivência da espécie. A visão e os sentidos químicos estão envolvidos na orientação do inseto para o encontro de hospedeiros que se situam a grandes distâncias. No caso de distâncias curtas, além dos sentidos mencionados, a temperatura possui um papel fundamental. Neste

aspecto, as *sensilla* são componentes chaves do sistema nervoso para receptar estímulos envolvidos nas atividades de cada espécie e, por isso, suspeita-se que possam refletir pressões seletivas e evidenciar caminhos evolutivos. As *sensilla* são estruturas cuticulares que se encontram associadas a neurônios bipolares na hipodermis e que estão presentes principalmente nas antenas e rosto, mas também em distintas partes do corpo. Têm sob sua responsabilidade a recepção da maior parte da entrada sensorial não visual dos triatomíneos (Catalá, 1996). O padrão de *sensilla* antenal é constituído pelo número de *sensilla* de tipos diferentes e a sua distribuição sobre as antenas.

A utilização destas características marcantes do fenótipo antenal tem sido proposta como uma ferramenta útil e de baixo custo na resolução de problemas taxonômicos (Catalá, 1996; Catalá & Torres, 2001). Tem-se também demonstrado que é um excelente indicador de habitats em várias espécies de Triatominae (Catalá & Dujardin, 2001; Carbajal de la Fuente & Catalá, 2002). Por outro lado, tem sido útil como marcador de dimorfismo sexual (Catalá & Dujardin, 2001; Carbajal de la Fuente & Catalá, 2002; Catalá et al., 2005; Moreno et al., 2005), e para estabelecer mudanças fenotípicas em populações mantidas em laboratório (Catalá et al. 2004).

- *Morfometria geométrica*: É uma ferramenta matemática baseada em fundamentos biológicos que estuda a co-variação de tamanho e conformação de objetos biológicos com seus fatores causais, mediante exclusão das diferenças devidas à (i) escala (todas as configurações originais são levadas a um tamanho uniforme); (ii) superposição dos centróides e (iii) rotação (método de Procrustes), sendo posteriormente analisados através de estatística multivariada (Klingenberg, 2002). Tem demonstrado ser muito efetiva para descompor a variação resultante da fisiologia dos indivíduos (variação de tamanho) daquela mais estável e produto, provavelmente, do componente genético (variação da forma). Não utiliza longitudes para medir diferenças (ou semelhanças), mas sim coordenadas representadas em um espaço cartesiano que permitem visualizar diferenças de conformação entre grupos ou indivíduos (Jaramillo, 2004).

Esta técnica proporciona um eficiente método alternativo de baixo custo para resolver problemas taxonômicos em Triatominae (Matías et al., 2001; Villegas et al., 2002), que além de distinguir espécimes criados em laboratório dos coletados no campo (Jaramillo et al., 2002), possibilita também avaliar variação cromática (Gumiel et al., 2003), estudar estruturação espacial (Schachter-Broide et al., 2005), caracterizar a dinâmica das interações entre populações silvestres, peridomésticas e domésticas (Borges et al., 2005) e finalmente conhecer estratégias de controle entomológico (Dujardin et al., 2007).

- *Sensoriamento remoto - GIS*: Foi Pavlovsky, na década dos 30, quem começou a se interessar no desenvolvimento da epidemiologia espacial preconizando três observações básicas. Primeiro, as doenças podem ser limitadas geograficamente; segundo, esta variação espacial surge da variação subjacente nas condições físicas e/ou biológicas que apóiam o patógeno e seus vetores e reservatórios; terceiro, se essas condições bióticas e abióticas podem ser delimitadas em mapas, então ambos os riscos contemporâneos e futuros podem ser previsíveis (Ostfeld et al., 2005).

As variáveis ambientais têm influência direta sobre a distribuição de uma espécie, muitas delas podendo ser estimadas a partir de dados obtidos por sensores remotos situados a bordo de satélites espaciais. A identificação de áreas similares baseia-se na informação espectral que alguns sensores são capazes de registrar. Os elementos do terreno refletem longitudes de onda no espectro eletromagnético que são diferentes. Essas diferenças podem ser classificadas e identificadas segundo áreas com comportamento espectral similar. Atualmente, encontram-se disponíveis para o planeta Terra, series temporais que permitem realizar análises utilizando o método de Fourier que, por sua vez, permite extrair informação sobre a dinâmica temporal em ciclos menores ou maiores a um ano para as variáveis de interesse.

Sendo uma metodologia moderna e recente, são poucos os estudos aplicados neste campo para analisar problemas de distribuição geográfica de triatomíneos. Porém, estudos para *T. infestans* (Gorla, 2002a) e *T. brasiliensis* (Gorla, 2002b) demonstram que esta é uma excelente e poderosa ferramenta para estudar potenciais distribuições geográficas. Peterson et al. (2002) estudaram os limites de distribuição geográfica das espécies que integram o complexo *T. protracta* (Uhler, 1894) através da modelagem do nicho ecológico. Dumonteil & Gourbière (2004) realizaram modelos preditivos de distribuição para *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) e elaboraram mapas de risco da doença de Chagas na península de Yucatán. Existem também análises espaço-temporais de reinfestação de *T. infestans* logo a seguir da aplicação de inseticidas, que utilizam uma metodologia similar (Cecere et al., 2004). Finalmente, Guhl et al. (2007) utilizaram esta ferramenta para estudar a distribuição dos triatomíneos colombianos.

Tabela 4.1: Procedência de exemplares de triatomíneos examinados, segundo hábitat e técnica empregada para sua análise.

Espécie	Localidade	Estado	Latitude/ Longitude	Hábitat*	Técnica empregada**
<i>T. pseudomaculata</i>	Sobral	Ceará	-4,04/ -39,99	P	A, M, mt, GIS
	Bom Jesús	Paraíba	-6,96/ -38,18	P	M, mt, GIS
	Curaçá	Bahia	-9,11/ -39,85	P, S	A, M, mt [†] , GIS, FA
	Senhor do Bom Fim	Bahia	-10,39/ -40,26	P	GIS
	Itaberaba	Bahia	-12,75/ -40,23	P	A, M, mt, GIS
	Itaobim	Minas Gerais	-16,58/ -41,40	P	A, M, mt, GIS
	Peixe	Tocantis	-12,56/ -48,31	P	GIS
<i>T. wygodzinskyi</i>	Santa Rita de Caldas	Minas Gerais	-22,02/ -46,37	S	A, M, mt, GIS, FA
	Piã	Minas Gerais	-22,12/ -46,36	S	FA, GIS
	Vargem Grande do Sul	São Paulo	-21,79/ -46,84	S	A, M, mt, GIS, FA
	Espírito Santo do Pinhal	São Paulo	-22,06/ -46,40	S	FA
	Sorocaba	São Paulo	-23,75/ -47,75	S	GIS
	Ituparanga	São Paulo	-23,75/ -47,75	S	M
<i>T. arthurneivai</i>	Serra do Cipó	Minas Gerais	-19,27/ -43,54	P	M
<i>T. maculata</i>	Mucajá	Roraima	-2,25/ -61,01	P	A, M, mt,

*P=peridomicílio, S=silvestre; ** A= fenótipo antenal, M= morfometria geométrica, mt= DNAm, GIS= sensoriamento remoto, FA= fonte alimentar; [†] Triatomíneos do peridomicílio.

5. RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados na forma de “manuscritos”, um deles publicado (Manuscrito N° 5) e os restantes submetidos em periódicos científicos indexados.

5.1. Primeiro manuscrito

Title: Misidentification of two Brazilian Triatomines, *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae), detected by geometric morphometrics

Short title: MISIDENTIFICATION DETECTED BY MORPHOMETRY

A. L. Carbajal de la Fuente¹✉, N. Jaramillo², J. M. S. Barata³, F. Noireau^{4, 5}, L. Diotaiuti⁶

¹ *Depto. Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.*

² *Grupo de Chagas, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.*

³ *Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.*

⁴ *Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Montpellier, France.*

⁵ *Facultad de Medicina, Universidad Mayor San Simón, Cochabamba, Bolivia.*

⁶ *Lab. de Triatomíneos e epidemiologia da doença de Chagas. Instituto René Rachou. FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brazil.*

✉ Corresponding author:

Ana Laura Carbajal de la Fuente, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz. Avenida Brasil 4365 CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ. Brazil.

e-mail: carbajal@ioc.fiocruz.br, Tel.: +55 21 – 25 98 43 20. Fax: +55 21 – 25 73 44

68

Abstract

Triatoma arthurneivai Lent & Martins, 1940 and *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) are two Brazilian species found in the sylvatic environment. Several authors could have committed misidentification of *T. arthurneivai*, and consequently, originated publications with missed information. In this work, we attempt to use geometric morphometrics of wings to differentiate *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi*, in order to detect possible misidentifications occurred in the past. We used collected triatomines from Minas Gerais and São Paulo States, and from laboratory collections. Our results show a clear differentiation between *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi*. On the other hand, they reveal that the *T. arthurneivai* populations from São Paulo State were misidentifications and pertain to *T. wygodzinskyi*. We postulate that *T. arthurneivai* would be an endemic species from Serra do Cipó, Minas Gerais State, an area of endemism.

Key words *Triatoma arthurneivai*, *Triatoma wygodzinskyi*, geometric morphometrics, sylvatic triatomines, Brazil.

Introduction

During the last decades, the Minas Gerais State (MG) was pioneer in research on Triatominae and numerous collection campaigns were carried out for epidemiological studies. During those, two rupicolous wild species, *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940 and *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951, were described but they received scarce attention due to their little epidemiological importance.

Triatoma arthurneivai was described from one female collected in Serra do Cipó, MG (Lent & Martins, 1940). Ten years later, Pellegrino (1950) recorded this species from Santa Rita de Caldas, in the south of MG. The five specimens collected by Pellegrino were sent to the entomologist Herman Lent, in order to confirm the identification. Lent (1951) noticed that the Pellegrino's specimens belonged to a new species and described them under the name of *T. wygodzinskyi*. The Lent's paper was subsequently overlooked by several authors (Corrêa *et al.*, 1962; Pinto Alves & Noda, 1964; Corrêa *et al.*, 1965; Forattini *et al.*, 1968, 1972; Juarez *et al.*, 1970; Barretto & Ribeiro, 1981; Rosa *et al.*, 2005) who identified the triatomines collected from different localities of Southern MG and São Paulo State as *T. arthurneivai*.

The taxonomy followed then the traditional concepts established by Lent & Wygodzinsky (1979) and mainly based on morphological characters. Both species are very similar in their external features, sharing many morphological and chromatic traits (Fig.1) making highly probable misidentifications as result of superficial analyses. The examination of male genitalia characters was considered as the most reliable method to make a right identification (Lent & Wygodzinsky, 1979; Lent & Jurberg, 1980) (Fig. 2). Currently, other techniques can be used to solve taxonomic problems in Triatominae. Among them, the geometric morphometrics, which was successfully applied by Matias *et al.* (2001), Villegas *et al.* (2002), and Gumiel *et al.* (2003). This technique was also applied to distinguish conspecific populations and assess their spatial structuring (Jaramillo *et al.*, 2002; Schachter-Broide *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2005). Finally, geometric morphometrics can be used for entomological surveillance (Dujardin *et al.*, 2007). Recently, Santos *et al.* (2007) alerted on a possible taxonomic problem involving *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi*. The classic morphometrics of head and thorax was applied to *T. arthurneivai* specimens from Serra do Cipó, MG, and Espírito Santo do Pinhal, São Paulo State, and to *T. wygodzinskyi* specimens from Santa Rita de Caldas, MG (n=3). Finally, they showed that *T. arthurneivai* from Serra do Cipó formed an isolated group. Their results also supported the hypothesis that *T. arthurneivai* from Espírito Santo do Pinhal and *T. wygodzinskyi* belonged to the same species.

In this work, we attempted to use the geometric morphometrics of wings to differentiate *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi* and put forward possible misidentifications occurred in the past. In comparison with the work of Santos *et al.* (2007), we have analyzed a larger number of specimens of four populations two being considered as *T. arthurneivai* and two as *T. wygodzinskyi*.

Material and methods

Insects - *T. arthurneivai* from two localities were included in the study: i) type specimens from Serra do Cipó, Minas Gerais (TarSC) deposited in Entomological Collection of Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ; ii) specimens from Ituparanga, São Paulo State (TarIT), characterized as *T. arthurneivai* by O. Forattini and deposited in the Entomological Collection of the “Laboratorio de Taxonomia da Faculdade de Saúde Pública”, São Paulo University. As *T. wygodzinskyi*, we used topotype specimens collected by the authors in Santa Rita de Caldas, Minas Gerais (TwySR), and specimens collected in Vargem Grande do Sul, São Paulo State (TwyVG).

Wings of selected specimens were photographed. Left and right wings were not averaged by individual but used separately as individual units. Data on populations and number of wings studied are summarized in Table 1.

Metric Data - Wings of field specimens were extirpated with forceps and mounted between microscope slides and cover-slips using alcohol 70%. Black and white pictures were taken of each pair of wings at 10x magnification using digital camera (SONY® Cyber-shot DSC-V3) coupled manually on the ocular of a stereo-microscope Leica® MZ 12. Wings from specimens conserved in collection were not extirpated. They were photographed at the same magnification, watching to obtain in the specimens the higher horizontal position as possible. We identified a total of 10 “type I” landmarks (venation intersections), according to Bookstein (1991) (Fig. 3). The geometric coordinates of each landmark were digitized using *tpsDig2* version 2.09 (Rohlf, 1999a).

Size Variation - For comparison of overall wing size between populations and species, we used the isometric estimator know as “centroid size” derived from coordinates data. Centroid size is defined as the square root of the sum of the squared distances between the center of the configuration of landmarks and each individual landmark (Bookstein, 1991). The centroid size was extracted from each matrix using the program *tpsRegr* version 1.18 (Rohlf, 1999b).

Shape Variation - Shape variables (partial warps plus uniform components) were obtained using the Generalized Procrustes Analysis superimposition algorithm (Rohlf, 1996) performed with *MOGwin* version 0.77 (Dujardin, 2003). The method is based in the superimposition of each individual using least-square criterion, eliminating effects of scale, orientation and position of the objects. The shape variables define the positional changes at each landmark in relation to a consensus shape.

Statistical Analysis - Kruskal-Wallis tests corrected by the Bonferroni method were used to analyze the isometric size at intra- and inter-specific level. The shape proximity between the populations and species was analyzed using the Mahalanobis distances. Those were derived from shape variables and their statistical significance was computed by permutation tests (1000 runs each) and after Bonferroni correction. The distances were used in a UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with

Arithmetic Average) cluster analysis to produce a dendrogram. In order to detect allometry, that is to say if variation in shape was affected by variation in size, the shape variables were regressed on the centroid-size by multivariate regression analysis. Once detected allometry, it was explored if the variation in shape within the populations and species has the same relationship with the variation in size (if they have an allometric common slope) by means of a multivariate analysis of covariance (Mancova). If yes, it was of interest to test for shape differences among groups with the size covariate (centroid-size) held constant. If not, the same analyses were performed by pairs of populations or removing one population each time in order to see if the remaining populations have homogeneous slopes. Kruskal-Wallis tests, multivariate regression analysis and Mancova were made with the aid of JMP v 6.0.0 (SAS Institute Inc., 2005). Relative warps analysis was performed with the aid of tpsRelw version 1.42 (Rohlf, 2005). The Mahalanobis distances were computed with PADwin version 81a (Dujardin, 2003) and UPGMA dendrogram was performed with Phylip v. 3.6 (Felsenstein, 2001) through PADwin.

Results

Size Variation - Comparing all the populations, Kruskal Wallis tests were significant (Chi-square approx = 64.85, df = 3, $p < 0.01$) except for TwyVG vs TwySR (Fig. 4). TarSC and TarIT exhibited the largest size, while TwyVG and TwySR the smallest.

Shape Variation - The Mahalanobis distances showed significant differences between all the groups analyzed (Table 2). *T. arthurneivai* types exhibited the higher distances with the remaining populations. The UPGMA tree derived from Mahalanobis distances showed a group of two populations (TwySR and TwyVG) clustered with TarIT, and separately TarSC (Fig. 5).

Allometry - A multivariate regression analysis of shape variables on size variable showed a significant effect (Wilks' Lambda 0.4673, Approx. $F = 12.4686$, df_num = 16, df_den = 175, $p < 0.0001$). But, Mancova revealed that there is not a common relationship between shape and size (Wilks' Lambda 0.6567, Approx. $F = 1.5932$, df_num = 48, df_den = 503.44, $p = 0.0087$). The same analyses removing one group each time or analyzing by pairs of populations showed in most of them allometry and an allometric common slope. But, when the size covariate was held constant, significant shape differences were seen in all the analyses ($p < 0.001$). The pair

TarSC - TarIT did not show allometry between them. The pair TwyMG - TwySP did not show an allometric common slope.

Discussion

Morphometrics is the analysis of variation in shape and covariation with other variables (Adams *et al.*, 2004). Because the statistical analyses of genetic variability expressed by morphological characters are a good measure of population differentiation (Patterson *et al.*, 2001), the morphometrics is an efficient alternative method for taxonomy studies of Triatominae (Dujardin *et al.*, 1999; Matias *et al.*, 2001; Jaramillo *et al.*, 2002; Villegas *et al.*, 2002; Gumiel *et al.*, 2003, Lehmann *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006; Feliciangeli *et al.*, 2007).

The shape analyses showed that TwyVG and TwyMG populations can be assigned to *T. wygodzinskyi*, while TarSC clearly differs from them, in agreement with its status of being *T. arthurneivai* type specimens from Serra do Cipó. On the other hand, TarIT is very different of TarSC and looks more similar to both *T. wygodzinskyi* populations. These results reinforce the idea that *T. arthurneivai* would be an endemic species occurring in the Serra do Cipó, and TarIT a geographic variant of *T. wygodzinskyi*. This hypothesis is supported by the fact that the Serra do Cipó is an area of high endemism for the fauna and flora. The Serra do Cipó is located in the Espinhaço Range of mountains (Cadeia do Espinhaço), which extends from Minas Gerais State into Bahia State. Several authors, considered Serra do Cipó as an area where the speciation and radiation phenomenon would come from the specificity of habitats and climatic conditions (Fernandes & Price, 1988, 1992). Likewise, Giuletti & Pirani (1987) postulate that special climatic, relief and soil characteristics, which are not found in any other part of Brazil, offer the conditions for a typical flora. According to Giuletti & Pirani (1997), endemism can be extremely high in the groups with a primary or important centre of diversity in this region. So, several bird species are restricted to Serra do Cipó (Giuletti *et al.*, 1997). Vertebrate groups such as Amphibia, Diptera insects and vascular plants also show high endemism in this region (Lara & Fernandes, 1996; Giuletti & Pirani, 1997; Eterovick & Sazima, 2004). A study showed that 90% of Diptera pertaining to the family Cecidomyiidae are exclusively endemic of this region (Lara & Fernandes, 1996). A study referred to 84 species of Eriocaulacea family, find that 68.7% are endemic to Espinhaço Range and 32.5% restrict to Serra do Cipó Giuletti & Pirani. (1997).

Our results suggest that the *T. "arthurneivai"* records out of the Serra do Cipó could be misidentifications. It is probably the case of *T. "arthurneivai"* from Ituparanga (TarIT), used by Forattini *et al.* (1968) to study the biology of *T. arthurneivai* and deposited in the USP collection. So, TarIT exhibits the greatest shape differences precisely with *T. arthurneivai* from Serra do Cipó, including the holotype. Probably this could be the same case for the other records originating from São Paulo State (Corrêa *et al.*, 1962, 1965; Pinto Alves & Noda, 1964; Forattini *et al.*, 1968, 1972; Juarez *et al.*, 1970; Barretto & Ribeiro, 1981) where triatomines considered as *T. arthurneivai* were collected in localities near to Ituparanga.

A careful examination of the classic taxonomic characters also supports our result. Even when Lent & Wygodzinsky (1979) hypothesized the useless of chromatic characters because the occurrence of coloration patterns intermediary between both species, these still remained broadly used in taxonomical keys (Lent & Wygodzinsky, 1979; Carcavallo *et al.*, 1997). According to these authors, two chromatic differences are useful to segregate the species: the pronotum and the corium coloration. Theoretically *T. arthurneivai* exhibits a dark uniform pronotum (Fig. 1d) while *T. wygodzinskyi* has a pronotum with reddish humeral angles (Fig. 1b). Examining a large series of specimens collected in the type locality, we observed a broad variation in the pronotum coloration: the usual coloration was observed in most part of individuals (Fig. 6b,c) but extreme variations from dark uniform to wide posterior reddish band were also observed (Fig. 6a,d,e). Therefore, the color pattern of pronotum is taxonomically useless to separate these species. On the other hand, the corium coloration pattern seems to be more constant. All the type series of *T. arthurneivai* exhibit a dark coloration (Fig. 1d) and all *T. wygodzinskyi* specimens have large reddish areas (Fig. 1a-c). The fact that the *T. "arthurneivai"* specimens from Ituparanga (TarIT) exhibit large reddish areas in the corium is congruent with our proposition that they belong to *T. wygodzinskyi*.

According to Lent & Jurberg (1980) and Corrêa *et al.* (1965), the male genitalia would exhibit a high discriminatory powerful. The main differences between both species are found in the phallus (Fig. 2). Lent & Wygodzinsky (1979) consider that the differences observed in the endosomal process are enough to separate the species where *T. arthurneivai* have the endosomal processes much over half as long as phallosoma, heavily sclerotized and their apices with close to 100 denticles and *T. wygodzinskyi* with the endosomal processes not over half as long as phallosoma, weakly sclerotized, their apices with about 20 denticles (Fig. 2 a, d). Lent & Jurberg

(1980) increased the taxonomical validity of male genital structures incorporating the description of the phallosome (Fig 2 b, c, e, f). The only available illustration of male genitalia from São Paulo State *T. "arthurneivai"* was provided by Corrêa *et al.* (1965) (Fig. 2 g). The drawing is very rudimentary and important structures are not illustrated (in particular the endosomal process). Nevertheless, we clearly observe one large ovoid phallosome similar to *T. wygodzinskyi* (Fig. 2 c, f, g). This similarity also points the São Paulo State *T. arthurneivai* records as a misidentification of *T. wygodzinskyi*. The taxonomical value of the phallosome shape was also observed in triatomines of genera *Rhodnius* (Lent & Jurberg, 1969).

In spite of the significant allometric effects among species and populations, it could be demonstrated that an important fraction of the variation in shape did not simply arose from variation in size. In most of the analyses, an allometric common slope was shown. Nevertheless, the Mancova which kept the size covariate constant, shows significant differences in shape between pairs of populations. The pair TarSC and TarIT shows differences in shape but not allometric effects, and the pair TwyMG and TwySP exhibits different allometric patterns. All these results may be interpreted as that each of the populations and species examined had its own way of morphological development, what is expected for different groups that have had independent evolutionary trajectories (Klingenberg, 1998).

The population originated from Vargem Grande do Sul (São Paulo State) and used in our work is closer to *T. wygodzinskyi* than to *T. arthurneivai*. In the studies of Hypša *et al.* (2002), Paula *et al.* (2005) and Santos *et al.* (2007), bugs identified as *T. arthurneivai* came from a neighbouring locality (E.S. do Pinhal) situated 40km from Vargem Grande do Sul. Santos *et al.* (2007) noted an identification problem with regard to these specimens and questioned their pertaining to the *T. arthurneivai* species. We agree with this position and, moreover, suggest that they belong to *T. wygodzinskyi* by the great similarity of wing size and shape.

In conclusion, specimens from São Paulo State are more similar to *T. wygodzinskyi* than *T. arthurneivai*. Their initial identification as *arthurneivai* was erroneous and they probably represent geographic variants of *T. wygodzinskyi*. Consequently, the populations from São Paulo State studied by Corrêa *et al.* (1962); Pinto Alves & Noda (1964); Corrêa *et al.* (1965); Forattini *et al.* (1968); Juarez *et al.* (1970); Forattini *et al.* (1972); Barretto & Ribeiro (1981); Hypša *et al.* (2002); Paula *et al.* (2005); Rosa *et al.* (2005) and Santos *et al.* (2007) correspond to *T. wygodzinskyi*.

Finally, this work also confirms the high discriminating capacity of geometric morphometric analysis.

Acknowledgements

Specials thanks to C.M Lopes, N.L. Rocha, R. Hoffmann, G.A. Grande, M. Obara, M. Lorenzo and Technicians of SUCEN for their fundamental help in the fieldwork. To M.A. Mureb Sallum and W. Ceretti Junior from São Paulo Collection, and J. Jurberg and C. Galvão from Oswaldo Cruz Institute who kindly put collections to our disposition. To J.S. Mallet for the financial support to visited the São Paulo collection. To A. Pérez González for his suggestions to an early version of the manuscript and the pictures of triatomines. This investigation received financial support from the IRD (France) and FIOCRUZ and the Ph.D. scholarship from the program CAPES/ CNPq- IEL Nacional, Brazil (to A.L.C.F).

References

- Adams, D.C., Rohlf, J.F. & Slice, D.E. (2004) Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the 'Revolution'. *Italian Journal of Zoology*, **71**, 5–16.
- Barretto, M.P. & Ribeiro, R.D. (1981) Estudo sôbre reservatórios o vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXXVII. Observações sobre a ecologia do *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **41**, 317–320.
- Borges, E.C., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Romanha, A.J. & Diotaiuti, L. (2005) Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceara State, Northeastern Brazil. *Acta Tropica*, **93** (1), 119–26.
- Bookstein, F.L. 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. 1-435 pp, Cambridge University Press, New York.
- Carcavallo, R.U., Galindez Girón, I., Jurberg, J., Galvão, C. & Lent, H. (1997) Keys for Tribes, Genera and Species for the Subfamily Triatominae. In: Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, Vol. I (R.U. Carcavallo, I. Galindez Girón, J. Jurberg & H. Lent, eds.), pp 107–244. FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- Corrêa, R.R., Pinto Alves, U. & Pascale, G. (1962) Presença do *Triatoma arthurneivai* em Sorocaba (Hemiptera: Reduviidae). *Revista Paulista de Medicina*, **60** (3),267.

- Corrêa, R.R., Alves, U.P., Noda, J. (1965) Nota sobre o *Triatoma arthurneivai*. Seu criadouro extradomiciliar (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, **17**, 217–232.
- Dujardin, J.P. (2003) Softwares for morphometrics analyze (MOG and PADwin). Available on–line at <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics/>.
- Dujardin, J.P., Beard, C.B. & Ryckman, R. (2007) The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Infection Genetics and Evolution*, **7**(2), 161–167
- Dujardin, J.P., Chavez, T., Moreno, J.M., Machane, M., Noireau, F. & Schofield, C.J. (1999) Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera : Reduviidae : Triatominae). *Journal of Medical Entomology*, **36**(6), 653–659.
- Eterovick, P.C. & Sazima, I. (2004) Anfíbios da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Vol. 1, 1-150 pp. Editora PUC, Minas Gerais, Brasil.
- Feliciangeli, D.M., Sanchez–Martin, M., Marrero, R., Davies, C. & Dujardin, J.P. (2007) 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.
- Felsenstein, W.M. (2001) Phylip v. 3.6. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fernandes, G.W. & Price, P.W. (1988) Biogeographical gradients in galling species richness–tests of hypotheses. *Oecologia*, **76**, 161–167.
- Fernandes, G.W. & Price, P.W. (1992) The adaptive significance of insect gall distribution: survivorship of species in xeric and mesic habitats. *Oecologia*, **90**, 14–20.
- Forattini, O.P., Juarez, E. & Rabello, E.X. (1968) Dados sobre a biologia do *Triatoma arthurneivai* no sudeste do Estado de São Paulo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Saúde Pública*, **2**, 186–193.
- Forattini, O.P., Rabello, E.X. & Pattoli, D.B. (1972) Aspectos ecológicos da tripanossomose Americana. IV– Mobilidade de *Triatoma arthurneivai* em seus ecótopos naturais. *Revista de Saúde Pública*, **6**, 183–187.
- Giulietti, A.M. & Pirani, J.R. (1987) Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. *Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências*, 39–69.

- Giulietti, A. M. & Pirani, J. R. (1997) Espinhaco Range Region: Eastern Brazil. In: Centres of Plant Diversity: A Guide and Strategy for their Conservation (Davis, S. D., V. H. Heywood, O. Herrera-Macbride, J. Villa-Lobos, & A. C. Hamilton, eds.). 397-404 pp. Information Press, Oxford, U.K.
- Gumiel, M., Catalá, S., Noireau, F., Rojas de Arias, A., García, A. & Dujardin, J.P. (2003) Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Systematic Entomology*, **28**, 173–179.
- Hypša, V., Tietz, D.F., Zrzavý, J., Rego, R.O.M., Galvão, C. & Jurberg, J. (2002) 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.
- Jaramillo, N., Castillo, D. & Wolff, M.E. (2002) Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**(5), 667–673.
- Juarez, E. (1970) Observações sobre o ciclo evolutivo do *Triatoma arthurneivai* em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Saúde Pública*, **4**, 13–18.
- Klingenberg, C.P. (1998) Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews*, **73**, 79–123.
- Lara, A.C.F. & Fernandes, G.W. (1996) The highest diversity of galling insects: Serra do Cipó, Brazil. *Biodiversity Letters*, **3**, 111–114.
- Lent, H. (1951) Novo *Triatoma* no Estado de Minas Gerais (Brasil) (Hemiptera: Reduviidae). *Revista de Entomologia*, **22** (1–3), 349–353.
- Lent, H. & V. Martins. 1940. Estudos sobre os triatomíneos do Estado de Minas Gerais, com descrição de uma nova espécie. *Revista de Entomologia*, **2**(3), 877–886.
- Lent, H. & Jurberg, J. (1969) O Genero *Rhodnius* Stal, 1859 com um estudo sobre a genitalia das espécies. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Brasileira de Biologia*, **29** (4), 487–560.
- Lent, H. & Jurberg, J. (1980) Comentários sobre a genitália externa masculina em *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera, Reduviidae). *Revista Brasileira de Biologia*, **40** (3), 611–627.

- Lent, H. & Wygodzinsky, P. (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of American Museum of Natural History*, **163**, 127–520.
- Lehmann, P., Ordonez, R., Ojeda–Baranda, R., Mendez de Lira, J., Hidalgo–Sosa, L., Monroy, C. & Ramsey, J.M. (2005). Morphometric analysis of *Triatoma dimidiata* populations (Reduviidae:Triatominae) from Mexico and Northern Guatemala. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**(5), 477–82.
- Matias, A., de la Riva, J.X., Torrez, M. & Dujardin, J.P. (2001) *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by wings. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**, 947–950.
- Patterson, J.S., Schofield, C.J., Dujardin, J.P. & Miles, M.A. (2001) Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with Old World species of *Triatoma*: evidence of New World ancestry. *Medical & Veterinary Entomology*, **15**(4),443–451.
- Paula, A.S., Diotaiuti, L. & Schofield, C.J. (2005) Testing the sister–group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **35**,712–718.
- Pellegrino, J. (1950) Novos dados sobre a distribuição de triatomídeos e sua infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* no estado de Minas Gerais (Brasil). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **48**,639–667.
- Pinto Alves, U. & Noda, J. (1964) Os transmissores da doença de Chagas da região de Sorocaba no Estado de São Paulo, Brasil. *Arquivos de Higiene e Saúde Pública*, **29** (101), 141–157.
- Rosa, J.A., Medeiros, M.P., Cilense, M. & Barata, J.M.S. (2005) Morphological study of the thorax of the five nymphal instars of *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Revista Brasileira de Entomologia*, **49** (3), 289–293.
- Rohlf, F.J. (1996) Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. In: Advances in Morphometrics (L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor, & D. Slice, eds.). pp 117–129. *Proceedings of the 1993 NATO Advanced Studies Institute on Morphometrics in Il Ciocco, Italy*. Plenum Publishing Corp., New York.
- Rohlf, F.J. (1999a) TPSDIG2. Version 2.09 Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. Website: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.

- Rohlf, F.J. (1999b) *tpsRegr*. Version 1.18 Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. Website: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Rohlf, F.J. (2005) *tpsRe/w*. Version 1.42 Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. Website: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Santos, S., Lopes, C.M., Dujardin, J.P., Panzera, F., Pérez, R., Carbajal de la Fuente, A.L., Pacheco, R. & Noireau, F. (in press, 2007). Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infection Genetics and Evolution*. Available online since February 3, 2007.
- Schachter–Broide, J., Dujardin, J.P., Kitron, U. & Gurtler, R.E. (2004) Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *Journal of Medical Entomology*, **41** (4), 643–9.
- Vargas, E., Espitia C., Patino C., Pinto N., Aguilera G., Jaramillo C., BARGUES M.D. & Guhl F. (2006). Genetic structure of *Triatoma venosa* (Hemiptera: Reduviidae): molecular and morphometric evidence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101** (1), 39–45.
- Villegas, J.M., Feliciangeli, D. & Dujardin, J.P. (2002) Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infection Genetics and Evolution*, **2**, 121–128.

Table 1: Material examined. Minas Gerais State (MG) and São Paulo State (SP).

Specie	Locality	Latitude/ Longitude	Code	No. of wings
<i>T. arthurneivai</i>	Serra do Cipó, MG	-19.27/ -43.54	TarSC	7
<i>T. "arthurneivai"</i>	Ituparanga, SP	-23.75/ -47.75	TarIT	24
<i>T. wygodzinskyi</i>	Santa Rita de Caldas, MG	-22.02/ -46.37	TwySR	86
<i>T. wygodzinskyi</i>	Vargem Grande do Sul, SP	-21.79/ -46.84	TwyVG	75

T. arthurneivai= TarSC (Serra do Cipó, MG); TarIT (Ituparanga, SP); *T. wygodzinskyi*= TwySR (Santa Rita de Caldas, MG) and TwyVG (Vargem Grande do Sul, SP).

Table 2: Mahalanobis distances obtained from shape variables. *Significant differences ($P < 0.05$) computed by permutation tests (1000 runs each) after Bonferroni correction.

Species	Mahalanobis distances			
	TarSC	TarIT	TwySR	TwyVG
TarSC	0.00			
TarIT	4.28*	0.00		
TwySR	3.92*	3.81*	0.00	
TwyVG	4.29*	2.03*	4.19*	0.00

T. arthurneivai = TarSC (Serra do Cipó, MG); TarIT (Ituparanga, SP); *T. wygodzinskyi* = TwySR (Santa Rita de Caldas, MG) and TwyVG (Vargem Grande do Sul, SP).

Figure captions

Fig. 1: Habitus dorsal showing the individual variability of coloration in *Triatoma wygodzinskyi* and the typical coloration in *T. arthurneivai*. *T. wygodzinskyi*: a) pronotum with wide posterior reddish band, b) typical pronotum with reddish humeral angles and two paramedial reddish spots, c) dark uniform pronotum. *T. arthurneivai*: d) typical uniform dark pronotum. The pictures of *T. wygodzinskyi* were taken on topotypical specimens and *T. arthurneivai* is an exemplar from the type series. Scale bar 10 mm.

Fig. 2: Morphological characteristics male genitalia of *Triatoma arthurneivai* (a, b, e) and *T. wygodzinskyi* (c, d, f, g). Phallus: b, c; endosomal process (EnPr): a, d; phallosome (Ph and asterisk): e-g. Drawings a-d from Lent & Jurberg, 1980; e-f modified from Lent & Jurberg, 1980 and g from Corrêa et al., 1965. Scale bars: a, d= 0.3 mm; b, c, e, f= 0.5mm.

Fig. 3: Landmarks measured as coordinates of wings of the analyzed triatomines. Numbering on the points denote the arrangement followed in order to obtain the coordinates.

Fig. 4: Variation of size among species. Box plot indicate median of group as a line in the middle of quartiles (25 and 75 closed the box; and 10 and 90 as lines in the extremes of each box). Line dot denotes the grand mean; the points at center of the boxes show the distribution of specimens. CS= Centroid size; *T. arthurneivai*= TarSC (Serra do Cipó, MG), TarIT (Ituparanga, SP); *T. wygodzinskyi*= TwyVG (Vargem Grande do Sul, SP) and TwySR (Santa Rita de Caldas, MG).

Fig. 5: The UPGMA dendrogram derived from Mahalanobis distances. The number between brackets is the sample size for each population.

Fig. 6: Frequency of specimens with different color pattern in the pronotum of *Triatoma wygodzinskyi*. All the specimens were captured in the type locality (topotypes). a) dark uniform pronotum, b) reddish humeral angles, c) reddish humeral angles and two paramedial reddish spot, d) narrow posterior reddish band, e) wide posterior reddish band. (N= 47).

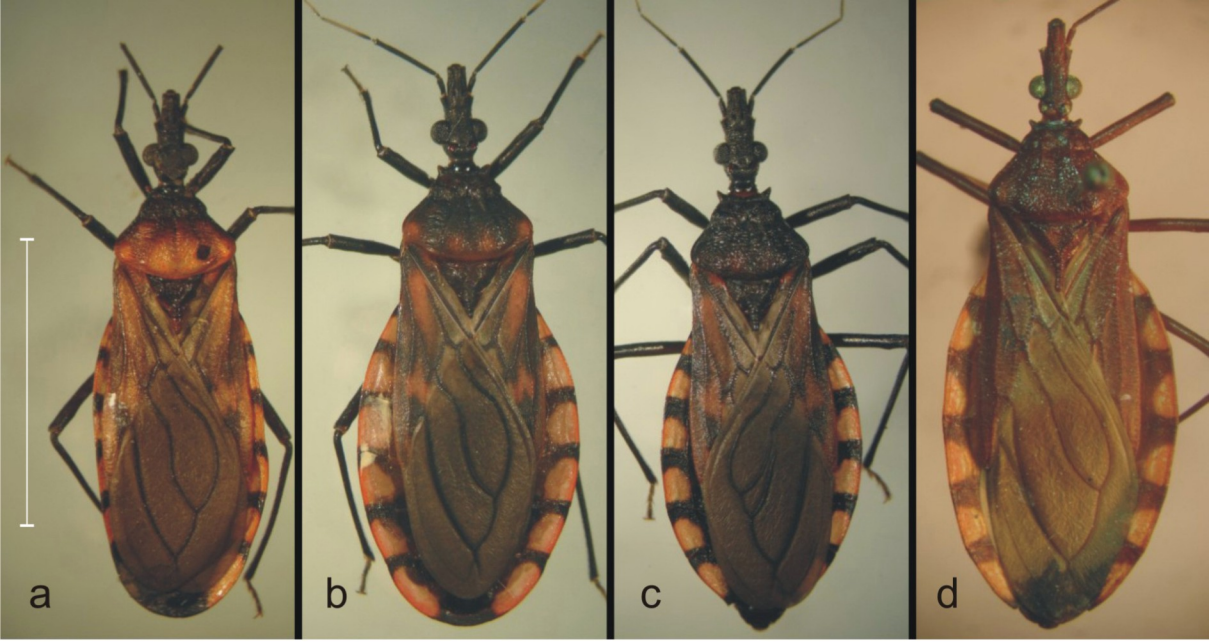


Fig. 1

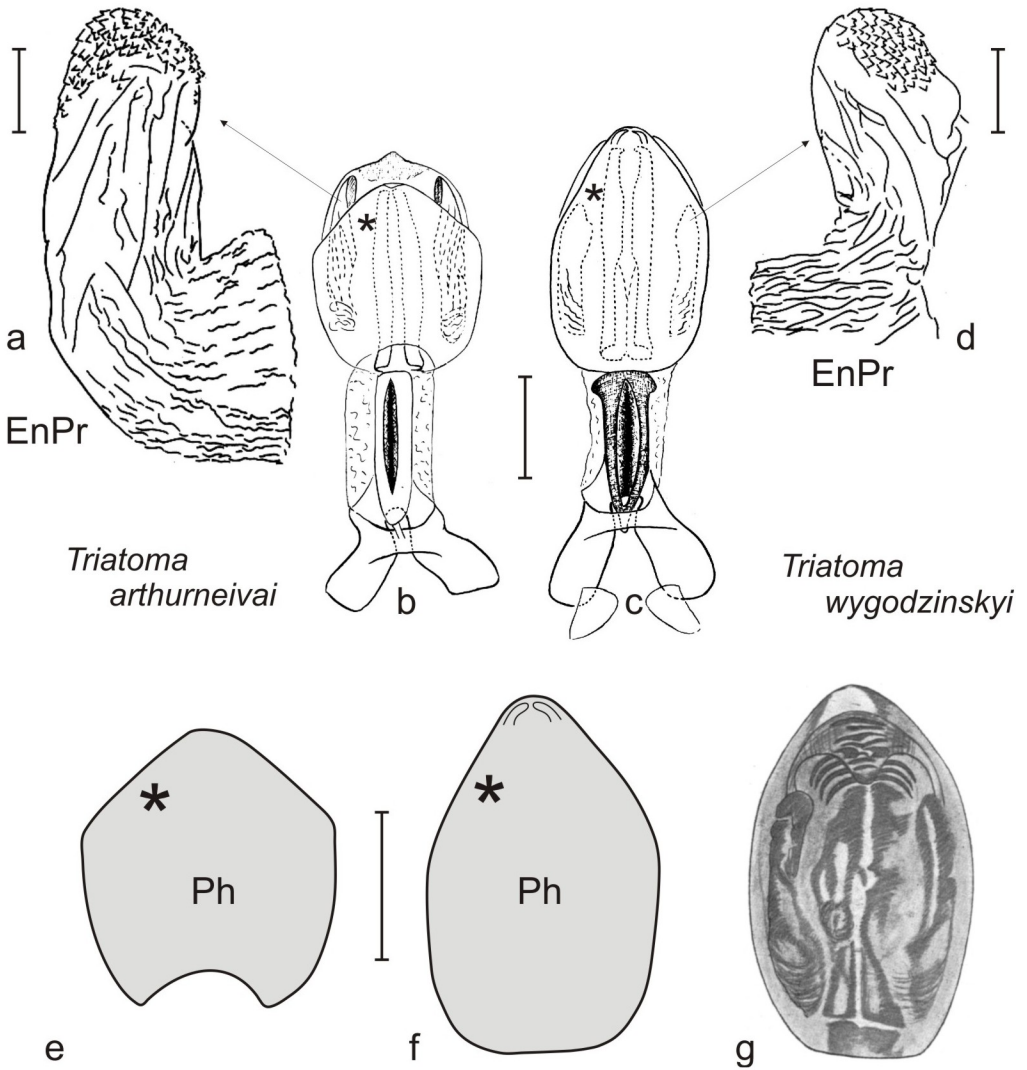


Fig. 2

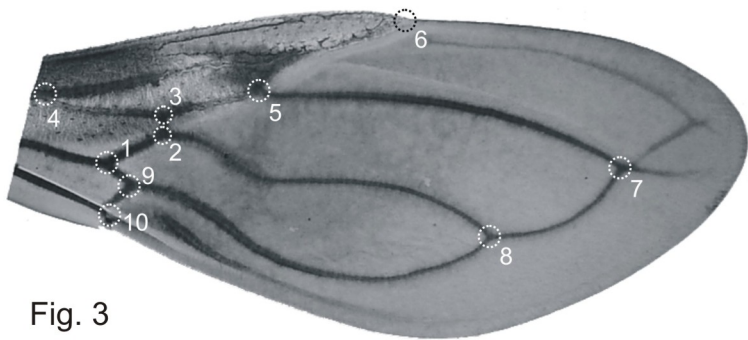


Fig. 3

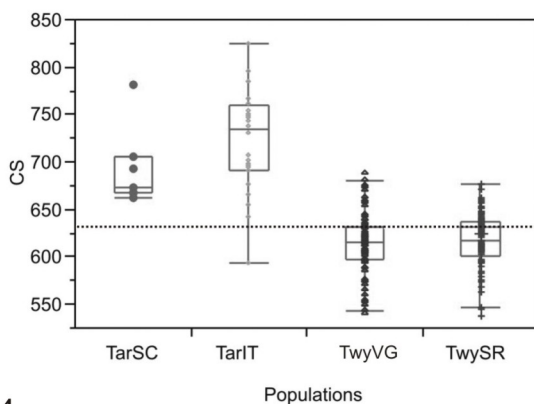


Fig. 4

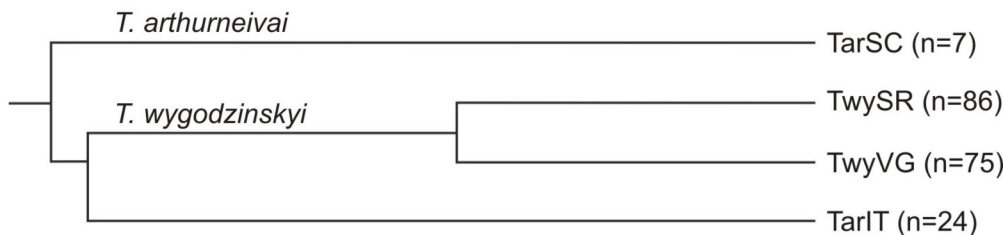


Fig. 5

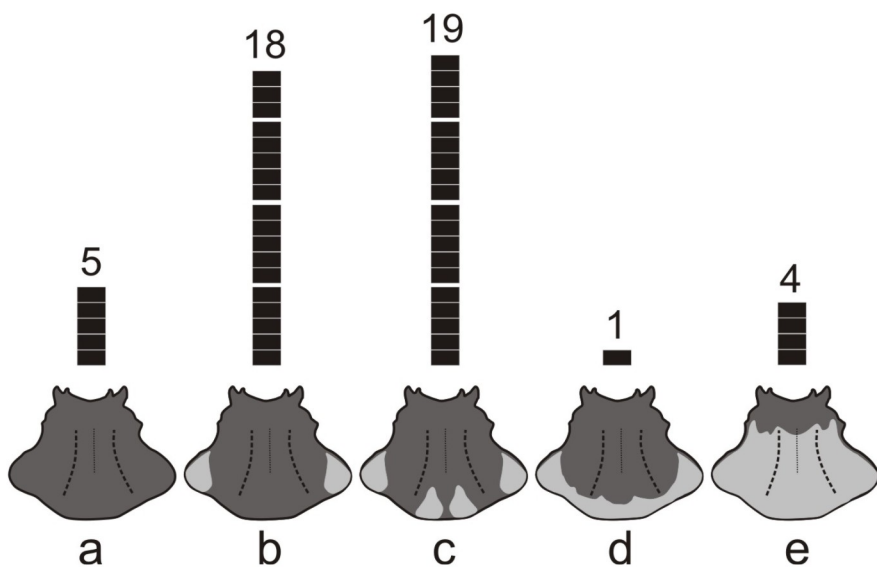


Fig. 6

5.2. Segundo manuscrito

Title: Relationship between *Triatoma maculata*, *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (Hemiptera: Triatominae) revisited by geometric morphometrics

Carbajal de la Fuente, Ana Laura¹✉; Diotaiuti, Liléia²; Noireau, François^{3,4}; and Jaramillo, Nicolás⁵

¹ Depto Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil.

² Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, Brazil.

³ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Av. Agropolis, BP.64501, 34394 Montpellier, France.

⁴ Facultad de Medicina, Universidad Mayor San Simón, Av. Aniceto Arce N° 371, Cochabamba, Bolivia.

⁵ Grupo de Chagas, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.

✉ Corresponding author:

Ana Laura Carbajal de la Fuente, Depto. Entomologia. Instituto Oswaldo Cruz. FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, CEP 21045-900. RJ, Rio de Janeiro, Brazil.

e-mail: carbajal@ioc.fiocruz.br, Tel/ Fax: +55 21 2598 - 4320/ 2573 - 4468

Abstract

Triatoma pseudomaculata, *T. wygodzinskyi* and *T. maculata* (Hemiptera: Triatominae) are vectors of Chagas disease. The first and second species are Brazilian vectors and the last is an important vector in the southern of South-America. Currently, *T. pseudomaculata* and *T. maculata* are included in the “*Triatoma maculata* complex” due to their morphological similarities. However, recent morphological and genetics data show a phylogenetic proximity between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*. In order to clarify their systematic status and infer evolutionary relationships among these triatomines, we performed an inter- and intra-specific comparative study using geometric morphometrics of wings. Our results show a close similarity between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*, and significant differences with *T. maculata*. These results confirm previous data obtained with other techniques, and this definitively reject the concept of the *T. maculata* complex.

Key words: *Triatoma maculata* complex; *Triatoma pseudomaculata*; *Triatoma maculata*; *Triatoma wygodzinskyi*; geometric morphometrics.

Introduction

Triatominae are vectors of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), the causative agent of Chagas disease which is ranked as one important parasitic diseases for Latin America (WHO, 2006). In Brazil, as in other countries of the Southern Cone, the elimination program focused on *Triatoma infestans* (Klug, 1834) had as consequence the occurrence in dwellings of new potential triatomine vectors originally restricted to the sylvatic environment (Dias et al. 2002; Dias 2006). In the northeast of Brazil, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espinola, 1964 is one potential vector, which has exhibited a quick synanthropic process (Dias et al. 2000; Diotaiuti et al. 2000; Dias et al. 2002; Noireau et al. 2005). With the elimination of the highly competitive *T. infestans*, the invasion of artificial structures by *T. pseudomaculata* was favored (Pojo de Rego et al. 2006). Because of their similar morphologic and chromatic characteristics, *T. pseudomaculata* was misidentified for many years as *T. maculata* (Erichson, 1848), a species found in Roraima State of Brazil, Venezuela, Colombia, Surinam, Guyana, French Guiana, and some Caribbean islands (Carcavallo et al. 1997a). Because *T. maculata* is commonly found indoors and infected with *T. cruzi*, it is considered the second most important Chagas disease vector in Venezuela (Lent

and Wygodzinsky, 1979; Feliciangeli et al. 2003; Sanchez-Martin et al. 2006). *T. pseudomaculata* was formally described in 1964 from specimens collected in Sobral, in the Northeastern Brazilian State of Ceará. According to the current hypothesis about their origin, *T. maculata* and *T. pseudomaculata* would be the result of the evolution of two geographic populations derived from a common ancestor by passive dispersion of nymphs associated to migratory birds (Schofield, 1988).

T. pseudomaculata and *T. maculata* were grouping in the same species complex, due to their morphological similarities. The species complex concept for Triatominae was established by Usinger et al. (1966) and lately developed by Lent & Wygodzinsky (1979), Carcavallo et al. (2000) and Dujardin et al. (2000a). *T. maculata* and *T. pseudomaculata* were initially grouped together by Lent & Wygodzinsky (1979), and allocated in the *T. infestans* complex. Later, Carcavallo et al. (2000) split the “*T. infestans* complex” for creating the “*T. maculata* complex”, which include *T. pseudomaculata* and *T. maculata*. Dujardin et al. (2000) grouped these species in the “*maculata* subcomplex”. In the last years, this complex was questioned by morphologic, genetic and hybridization studies (Hypša et al. 2002; Belisário, 2006; Santos et al. 2007).

Another Brazilian sylvatic triatomine, *T. wygodzinskyi* Lent, 1951, exhibits close morphological similarities with *T. pseudomaculata* (Carcavallo et al. 1997b). This species was described, in one overlooked paper, from a small number of specimens collected in the south of Minas Gerais State (Lent, 1951), and it is likely that many works carried out in São Paulo State and dedicated to *T. arthurneivai* (Pinto Alves and Noda 1964; Corrêa et al. 1965; Forattini et al. 1968, 1972; Juarez, 1970; Barretto and Ribeiro 1981) involved, in reality, this species (Santos et al. 2007). *T. wygodzinskyi* was initially included in the *sordida* complex by Lent & Wygodzinsky (1979). However, Carcavallo et al. (2000) considered that there is not enough information on *T. wygodzinskyi* to allow its location in any recognized complex. Finally, its current status still remains uncertain and its relationships with other(s) triatomine(s) needs to be investigated. In the present work, we studied the evolutionary relationships among *T. pseudomaculata*, *T. wygodzinskyi* and *T. maculata* using a geometric morphometry approach. This technique, based on statistical analyzes of size and shape partitioning has become an efficient alternative method for the taxonomy, spatial structuring and entomological surveillance of Triatominae (Matias et al. 2001; Jaramillo et al. 2002; Villegas et al. 2002; Gumiel et al. 2003; Borges et al. 2005; Schachter-Broide et al. 2005; Dujardin et al. 2007). Our

work hypothesis was that *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* were more related between them than with *T. maculata*. To confirm this assumption, we carried out an inter- and intra-specific comparative study among these three species, using the geometric morphometrics comparison of wings.

Material and methods

Insects - Except for *T. pseudomaculata* from Sobral and *T. maculata* specimens which provided by a first laboratory generation, all triatomines samples analyzed were originated from field collections (Table 1). A total of 457 wings were examined: 158 of *T. wygodzinskyi*, 261 of *T. pseudomaculata* and 38 of *T. maculata* (Table 1). Left and right wings were not averaged by individual but used separately as individual units.

Metric data - wings were extirpated with forceps and mounted among microscope slides and cover-slips with 70% ethanol. Photographs of each pair of wings were taken using digital camera (SONY® Cyber-shot DSC-V3) coupled manually on the ocular of a stereomicroscope Leica® MZ 12. Black and white pictures with 3.0 megapixel resolutions were taken of each pair of wings at 10x magnification. On the membranous part of the hemelytra, we identified 10 “type I” landmarks (venation intersections) (Fig. 1). The geometric coordinates of each landmark were digitalized using the program *tpsDig2* version 2.09 (Rohlf, 1999a).

Size and shape variation - For comparison of overall wing size between populations and species, we used the isometric estimator know as “centroid size” derived from coordinates data. Centroid size is defined as the square root of the sum of the squared distances between the center of the configuration of landmarks and each individual landmark (Bookstein, 1990). The centroid size was extracted from each matrix using the program *tpsRegr* version 1.18 (Rohlf, 1999b). Shape variables (partial warps plus uniform components) were obtained using the Generalized Procrustes Analysis superimposition algorithm (Rohlf, 1996) performed with *MOGwin* version 0.77 (Dujardin, 2003). The method is based in the superimposition of each individual using least-square, eliminating effects of scale, orientation and position of the objects. The shape variables define the positional changes at each landmark in relation to a consensus shape.

Statistical analysis - Kruskal-Wallis tests corrected by Bonferroni method were used to analyze the isometric size at intra and inter-specific level. The Mahalanobis distances derived from shape variables were used to explore the shape proximity between populations and species. Their statistical significance was computed by permutation tests (1000 runs each), and corrected by Bonferroni method. These distances were used in UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average) cluster analyses to produce dendrograms. Discriminant analysis was performed to evaluate the existence of significant differences to intra and interspecific levels; to order the populations and species in the shape space formed by the first and second canonical factors and to reclassify the individuals using the discriminant functions and Mahalanobis distances. The Kappa statistics, which is a measure of agreement estimated between observed and expected classification, was calculated. The result is scaled from 0 to 1 (Landis and Koch 1977). The residual relationship between shape and size variables (allometry) was explored by multivariate regression analysis. Because allometry was detected, it was of interest to test whether the relationships between size and shape are the same for different groups. For this a multivariate analysis of covariance, MANCOVA, was performed with shape variables as dependent variables, and taxa and centroid-size as independent variables. Analyses of size were performed with JMP v 6.0.0 (SAS Institute Inc., 2005). Dendrogram and reclassification were examined using the *PADwin* (version 81a; Dujardin, 2003) and JMP v 6.0.0 (SAS Institute Inc., 2005). Multivariate regression analysis and MANCOVA were performed with JMP v 6.0.0 (SAS Institute Inc., 2005).

Results

Size variation - Comparing the wing sizes between the species, the Kruskal-Wallis tests showed a significant difference (Chi-square approx= 9.82, df= 2, $p < 0.01$) between *T. maculata* and the other two species, whereas *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* did not show size differences between them (Fig. 2). The UPGMA dendrogram based on average centroid size by species showed *T. pseudomaculata* clustering with *T. wygodzinskyi* (Fig. 3). The intra-specific analysis showed size variability between *T. pseudomaculata* populations (Fig. 4). Significant differences were found between TpsCE and TpsPB, which exhibited the smallest and largest sizes, respectively (Chi-square approx= 49.28, df= 1, $p < 0.001$), and between them and the remaining *T. pseudomaculata* populations ($p = 0.002$) (Fig. 4). The Kruskal-

Wallis test did not show significant size differences after Bonferroni correction between the *T. pseudomaculata* populations from Minas Gerais and Bahía neither between the *T. wygodzinskyi* populations.

Shape variation - A canonical variates analyses (CVA) displayed significant differences (Wilks' Lambda = 0.0213, Approx. F= 20.45, df_num= 112, df_den= 2815.6, $p < 0.001$) on the shape of wings among the groups. The individuals projected onto the two first canonical factors show three well defined and separated groups, corresponding to the three species (Fig. 5). Permutation test corrected by Bonferroni show that all the populations exhibited significant differences in the Mahalanobis distances ($p = 0.0018$; Table 4). The derived UPGMA dendrogram showed a clear separation between species and closer proximity between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* than between *T. pseudomaculata* and *T. maculata* (Fig. 6). *T. maculata* and *T. wygodzinskyi* populations showed good reclassification rates varying between 79.5 and 94.7%. Populations of *T. pseudomaculata* exhibited the wider reclassification spectrum, from medium (51.7%) to high (89.2) values (Table 2). The agreement in the re-classification was substantial (Kappa= 0.7066).

Allometry - A multivariate analysis of regression of shape variables on size variables showed a significant effect of size on the shape (Wilks' Lambda 0.7922, Approx. F= 5.98, df_num= 16, df_den= 365, $p < 0.0001$) (Table 3). However, the MANCOVA revealed that there is not a common relationship between shape and size (Wilks' Lambda 0.4540, Approx. F= 3.12, df_num= 96, df_den= 2006.7, $p < 0.0001$). The same analysis by pairs showed allometry between each pair but did not show a common allometric effect between any pair of species (Table 3).

Discussion

Molecular and enzymatic data presented by Hypša et al. (2002) and Santos et al. (2007) questioned the existence of the “*T. maculata* complex” and suggested a higher genetic proximity between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* than between *T. maculata* and *T. pseudomaculata*. Our results fit with this hypothesis. The wing size does not allow to differentiate field populations of *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*. On the other hand, the laboratory colonies of *T. pseudomaculata* (TpsCE) and *T. maculata* exhibited smaller wings. Several authors have reported changes in the phenotype in laboratory triatomines associated with different rearing

conditions. These have included changes in size and shape of the head, wings and pronotum (Dujardin et al. 1998; Galíndez Girón et al. 1999, Jaramillo et al. 2002). Dujardin et al. (1998) proposed that the reduction in body size may reflect the higher population density of bugs maintained in the laboratory. The antennal phenotype of field collected *T. infestans*, *R. prolixus* and *R. pallescens* showed strong distinctions from laboratory reared specimens (Catalá et al. 2004). Jaramillo et al. (2002) analyzed the morphological and morphometric differences between a wild *Panstrongylus geniculatus* population and its laboratory descendants. The analyses over five generations showed differences in size but not in shape neither in sexual dimorphism. They concluded that size changes may have a physiological origin in response to a change of ecotopes (sylvan – laboratory), but more than five generations may be required for the expression of shape changes. Stable differences among species and populations are of shape not of size, because it is more affected by environment (Dujardin, 2000b). Nevertheless the size difference observed between the laboratory *T. pseudomaculata* from Ceará (TpsCE) and the other conespecific populations examined herein correspond to natural populational characteristic and not laboratory culture effect. These arguments are also valid for *T. maculata*. The insect used were an F1, then the possible laboratory maintenance effect was minimum (only one generation). Additionally, a molecular study based on mtDNA revealed TpsCE as a population of *T. pseudomaculata* with a perceptible genetic differentiation (Carbajal de la Fuente et al., unpublished data).

The shape showed significant differences among species and populations. The three species are clearly differenced in the space of shape formed by the two first canonical factors. But the dendrogram calculated by the UPGMA method from Mahalanobis distances showed all populations of *T. pseudomaculata* closer to the two populations of *T. wygodzinskyi* than to *T. maculata* (Fig. 3, 6). This strongly supports the hypothesis that *T. maculata* is not monophyletic with *T. pseudomaculata*.

There is an important allometric effect among species and populations that was detected by the significant relationship between shape and size. But the variation in shape within the species did not have the same relationship with the variation in size. Because of this, pairwise multivariate regression analyses were done looking for the species with different slope; that is to say, looking for the species which experience different allometric effect. Again, each pair shows allometry but not a common slope. This may be interpreted as each species having a different way to

grow, what is expected for different groups that have had independent evolutionary trajectories by a long time (Klingenberg, 1998).

Geometric morphometrics is a powerful technical which has been applied in several works to resolve taxonomic problems related to Chagas Disease vectors (e.g. Matias et al. 2001, Villegas et al. 2002, Gumiel et al. 2003). The present study supports other results derived from antennal phenotype (Carbajal de la Fuente et al., unpublished data), isoenzymes and cytogenetics (Santos et al. 2007) and clearly shows that exists a close morphological and genetic affinity between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*. Finally, it confirms the rejection of the concept of “*T. maculata* complex” sustained by Carcavallo et al. (2000) and Dujardin et al. (2000a).

Acknowledgements

We are indebted with C.M. Lopes, A. Dias Lima, P. Araújo, A. Ferreira, J.M.S. Barata, R. Hoffman, G. Grande, C.M. Neves and E. Rocha for their fundamental help in the fieldwork. Specials thanks to C.J. Belisário and C.E. Almeida for the specimens of *T. pseudomaculata* from Ceará and Paraíba and *T. maculata*. To A. Pérez González for the suggestions to an early version of the manuscript. This study received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (Grant A00206), IRD, FIOCRUZ and the Ph.D. scholarship from the program CAPES/ CNPq- IEL Nacional (to A.L.C.F).

References

- Barretto, M.P. and Ribeiro, R.D.; 1981. Estudo sobre reservatórios o vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXXVII. Observações sobre a ecologia do *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940 (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Bras. Zool. 41, 317-320.
- Belisário, C.J.; 2006. Caracterização morfológica e molecular de híbridos do cruzamento entre *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). M.Sc. Theses, Insituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil.
- Borges, E.C., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Romanha, A.J. and Diotaiuti, L.; 2005. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceara State, Northeastern Brazil. Acta Trop. 93 (1),119-26.

- Bookstein, F.L.; 1990. Introduction to methods for landmark data. In: F. J. Rohlf, and F. L. Bookstein (Eds), Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop, The University of Michigan Museum of Zoology, Special Publication No.2, Ann Arbor, Michigan, pp 216–225.
- Carcavallo, R.U., Curto de Casas, S.I., Sherlock, I.A., Galíndez Girón, I., Jurberg, J., Galvão, C., Mena-Segura, C.A. and Noireau F.; 1997a. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. In: Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas. R.U. Carcavallo, I. Galindez Girón, J. Jurberg and H. Lent (Eds), Vol. 2, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp 561-600.
- Carcavallo, R.U., Galindez Girón, I., Jurberg, J., Galvão, C. and Lent, H.; 1997b. Pictorial keys for tribes, genera and species for the subfamily Triatominae. In: Carcavallo, R.U., Galindez Girón, I., Jurberg, J. and Lent, H. (Eds). Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, Fiocruz, Vol.I, Rio de Janeiro, Brazil, pp 107-244.
- Carcavallo, R.U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., Galvão, C.; 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. Entomol. Vect. 7, 1-99.
- Catalá, S.S., Maida, D., Caro-Riaño, H., Jaramillo, N., Moreno, J.; 2004. Changes Associated with Laboratory Rearing in Antennal Sensilla Patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 99 (1), 25-30.
- Corrêa, R.R., Alves, U.P. and Noda, J.; 1965. Nota sobre o *Triatoma arthurneivai*. Seu criadouro extradomiciliar (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Bras. Malar. Doenças Trop. 17, 217-232.
- Dias, J.C.P. 2006. Descentralización y enfermedad de Chagas, Brasil, 2005. In: Yadón Z. (Ed). Descentralização e gestão do controle das enfermidades transmissíveis na América Latina, Buenos Aires, Argentina OPS, 320 pp.
- Dias, J.C.P., Machado, E.M.M., Fernandes, A.L. and Vinhaes, M.C.; 2000. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. Cad. Saúde Pública. 16, 13-34.
- Dias, J.C.P., Silveira, A.C. and Schofield, C.J.; 2002. The impact of Chagas disease control in Latin América. A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97, 603-612.
- Diotaiuti, L., Faria Filho, O., Carneiro, F., Pinto Dias, J.C., Pires, H. and Schofield, C.; 2000. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saúde Pública. 16, 61-67.

- Dujardin, J.P.; 2000b. Manual electrónico de introducción a la morfometría con énfasis en Triatominae y Phlebotominae. Available on-line: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Dujardin, J.P.; 2003 Softwares for morphometrics analyze (MOG and PADwin) available on-line: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Dujardin, J.P., Beard, C.B. and Ryckman, R.; 2007. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Infect. Gen. Evol.* 7(2), 161-167.
- Dujardin, J.P., Forgues, G., Torrez, M., Martinez, E., Córdoba, C., Gianella, A.; 1998. Morphometrics of domestic *Pastronylus rufotuberculatus* in Bolivia. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92, 219-228.
- Dujardin, J.P., Schofield, C.J. and Panzera, F; 2000a. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, Classe des Sciences Naturelles et Médicales, NS 24, 1-162.
- Feliciangeli, M.D., Campbell-Lendrum, D., Martinez, C., Gonzalez, D., Coleman, P. and Davies, C.; 2003. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. *Trends Parasitol.* 19, 44-49.
- Forattini, O.P., Juarez, E. and Rabello, E.X.; 1968. Dados sobre a biologia do *Triatoma arthurneivai* no sudeste do Estado de São Paulo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Saúde Públ.* 2, 186-193.
- Forattini, O.P., Rabello, E.X. and Pattoli, D.B.G.; 1972. Aspectos ecológicos da tripanossomose Americana. IV- Mobilidade de *Triatoma arthurneivai* em seus ecótopos naturais. *Rev. Saúde Públ.* 6, 183-187.
- Galíndez-Girón, I., Torres, E., Galvão, C., Magalhães dos Santos, C., Lizano, E., Barazarte, R., Márquez, J.; 1999. Influência da manutenção em laboratório sobre o fenótipo de *Rhodnius robustus*, Larrouse 1927 Hemiptera, Reduviidae, Triatominae. *Entomol. Vect.* 6, 677-703.
- Gumiel, M., S. Catalá, F. Noireau, A. Rojas de Arias, A. García and Dujardin J.P.; 2003. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Syst. Entomol.* 28, 173-179.
- Hypša, V., Tietz, D.F., Zrzavý, J., Rego, R.O.M., Galvão, C. and Jurberg, J.; 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae):

- molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol. Phyl. Evol.* 23, 447-457.
- Jaramillo, N., Castillo D. and Wolff M.E.; 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97(5), 667-673.
- Juarez, E.; 1970. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Triatoma arthurneivai* em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae). *Rev. Saúde Públ.* 4, 13-18.
- Klingenberg, C.P.; 1998. Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Rev.* 73, 79–123.
- Landis J. R. and Koch G.G.; 1977. The measurements of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33,159-174.
- Lent, H.; 1951. Novo *Triatoma* no Estado de Minas Gerais (Brasil) (Hemiptera: Reduviidae). *Rev. de Entomol.* 22(1-3), 349-353.
- Lent, H. and Wygodzinsky, P.; 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 163, 127-520.
- Matias, A., de la Riva, J.X., Torrez, M. and Dujardin J.P.; 2001. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by wings. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96, 947-950.
- Noireau, F., Carbajal de la Fuente, A. L., Lopes, C.M. and Diotaiuti, L.; 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 1-6.
- Pinto Alves, U. and Noda, J.; 1964. Os transmissores da doença de Chagas da região de Sorocaba no Estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Hig. Saúde Publ.* 29, 141-157.
- Pojo de Rego I., Walter A., Ferreira A.J., Rangel M., Girard-Ferreira E. and Noireau F; 2006. Peridomestic Structure, Farming Activity and Triatomine Infestation. *Parasite* 13, 237-243.
- Usinger, R.L., Wygodzinsky, P. and Ryckman, R.E.; 1966. The biosystematics of Triatominae. *Ann. Rev. Entomol.* 11, 309-330.
- Rohlf, F.J.; 1996. Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations, pp 117-129. In L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor, and D. Slice (eds.), *Advances in Morphometrics NATO ASI, Series A, Life Sciences*, Plenum Publication, New York.

- Rohlf, F.J.; 1999a. *tpsDig2*. Version 2.09 Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. Website: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Rohlf, F.J.; 1999b. *TpsRegr*. Version 1.18 Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY. Website: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>.
- Sanchez-Martin, M.J., Feliciangeli, M.D., Campbell-Lendrum, D., Davies, C.R.; 2006. Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised by reinvasion of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations?. *Trop. Med. Int. Health.*, 11(10),1585-93.
- Santos S.M., Lopes, C.M., Dujardin, J.P., Panzera, F., Pérez, R., Carbajal de la Fuente, A.L., Pacheco, R.S. and Noireau F.; 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infect. Gen. Evol.* (*in press*).
- Schachter-Broide, J., Dujardin, J.P., Kitron, U., Gurtler, R.E.; 2005. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J. Med. Entomol.* 41(4), 643-9.
- Schofield, C.J.; 1988. Biosystematics of the Triatominae. In: *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Clarendon Press, Oxford, UK, 37, 284-312.
- Usinger, R.L., Wygodzinsky, P., Ryckman, R.E.; 1966. The biosystematics of Triatominae. *Ann. Rev. Entomol.* 11, 309-330.
- Villegas, J., Feliciangeli, M.D. and Dujardin J.P.; 2002. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infect. Gen. Evol.* 2, 121-128.
- WHO 2006: (<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>).

Table 1: Material examined

Specie	Locality	State	Code	Habitat	No. of wings
<i>T. pseudomaculata</i>	Curaçá	Bahía	TpsCBA	Peridomestic	79
	Itaberaba	Bahía	TpsIBA	Peridomestic	75
	Itaobim	Minas Gerais	TpsMG	Peridomestic	31
	Bom Jesús	Paraíba	TpsPB	Peridomestic	39
	Sobral	Ceará	TpsCE	Peridomestic	37
<i>T. wygodzinskyi</i>	Vargem Grande do Sul	São Paulo	TwySP	Rocks	75
	Santa Rita de Caldas	Minas Gerais	TwyMG	Rocks	83
<i>T. maculata</i>	Mucajaí	Roraima	TmaRR	Palms	38
Total					457

Table 2: Re-classification of individuals according to Mahalanobis distances (of each individual to the centroid of each group). Number of wing units (above) and percentage of grouped cases correctly classified (under). Kappa statistic= 0.6077. *T. maculata* from Roraima State (TmaRR); *T. pseudomaculata* from Curaçá (TpsCBA), Itaberaba (TpsIBA) Bahia State; from Sobral (TpsCE) Ceará State, from Itaobim (TpsMG) Minas Gerais State and Bom Jesús (TpsPB) Paraíba State; *T. wygodzinskyi* from Vargem Grande do Sul (TwySP) São Paulo State and Santa Rita de Caldas (TwyMG) Minas Gerais State.

	TmaRR	TpsCBA	TpsCE	TpsIBA	TpsMG	TpsPB	TwySP	TwyMG	Total
TmaRR	36 94.7	0 0.0	1 2.6	1 2.6	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	38
TpsCBA	0 0.0	41 51.9	7 8.9	13 16.5	7 8.9	10 12.7	0 0.0	1 1.3	79
TpsCE	2 5.4	1 2.7	33 89.2	0 0.0	0 0.0	1 2.7	0 0.0	0 0.0	37
TpsIBA	1 1.3	4 5.3	3 4.0	47 62.7	10 13.3	9 12.0	1 1.3	0 0.0	75
TpsMG	1 3.2	2 6.5	1 2.6	4 12.9	20 64.5	3 9.7	0 0.0	0 0.0	31
TpsPB	0 0.0	5 12.8	0 0.0	1 2.6	2 5.1	31 79.5	0 0.0	0 0.0	39
TwySP	0 0.0	3 4.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	67 89.3	5 6.7	75
TwyMG	0 0.0	1 1.2	3 3.6	0 0.0	0 0.0	0 0.0	13 15.7	66 79.5	83
Total	40	57	48	66	39	54	81	72	457

Table 3: Comparison of the size allometric effect on the shape among *T. pseudomaculata*, *T. wygodzinskyi* and *T. maculata*.

Pair species*	Allometry?			Common slope?		
	Wilks' Lambda	p	Interpretation	Wilks' Lambda	p	Interpretation
Tps vs Twy	0.8286	<0.0001	Yes	0.8686	<0.0001	No
Twy vs Tma	0.7325	<0.0001	Yes	0.7811	0.0001	No
Tps vs Tma	0.6749	<0.0001	Yes	0.8444	<0.0001	No

* The 5 *T. pseudomaculata* and 2 *T. wygodzinskyi* were pooled, respectively.

Table 4: Mahalanobis distances for populations and species analyzed.

Specie	Code	TwyMG	TwySP	TpsCBA	TpsCE	TpsIBA	TpsIMG	TpsPB	TmaRR
<i>T. wygodzinskyi</i>	TwyMG	0.00							
	TwySP	1.96	0.00						
	TpsCBA	3.93	4.21	0.00					
	TpsCE	4.11	4.47	3.04	0.00				
<i>T. pseudomaculata</i>	TpsIBA	4.84	5.21	1.76	3.43	0.00			
	TpsIMG	4.75	5.16	2.07	3.61	2.32	0.00		
	TpsPB	5.28	5.34	2.11	3.73	2.36	2.43	0.00	
<i>T. maculata</i>	TmaRR	4.87	5.15	4.64	4.88	4.68	4.84	5.14	0.00

All distances were significant at $p < 0.0018$ after Bonferroni correction.

Figure captions

Fig. 1: Landmarks measured as coordinates of wings of the analyzed triatomines. Numbering on the points denote the arrangement followed in order to obtain the coordinates.

Fig. 2: Variation of size among species. Box plot indicate median of group as a line in the middle of quartiles (25 and 75 closed the box; and 10 and 90 as lines in the extremes of each box). Line dot denotes the grand mean; the point at center of the boxes shows the distribution of specimens. CS= Centroid size; Tma= *T. maculata*; Tps= *T. pseudomaculata*; Twy= *T. wygodzinskyi*.

Fig. 3: UPGMA dendrogram derived from Mahalanobis distances showing the species similarity based on the wings size.

Fig. 4: Variation of size among populations and species. Box plot indicate median of group as a line in the middle of quantiles (25 and 75 closed the box; and 10 and 90 as lines in the extremes of each box). Line dote denotes the grand mean; the point at center of the boxes shows the distribution of specimens. CS= Centroid size, TmaRR, TpsCBA, TpsCE, TpsIBA, TpsMG, TpsPB, TwySP and TwyMG see Table1.

Fig. 5: Canonical variate analysis of *T. pseudomaculata* (TpsCBA, TpsIBA, TpsMG, TpsCE and TpsPB), *T. wygodzinskyi* (TwyMG and TwySP) and *T. maculata* (TmaRR) populations (see Table 1). The Fig. shows the centroid distribution (multivariate mean) on canonical factors 1 (CF1) and 2 (CF2). The circles around centroids represent confidence intervals of 95%, and the polygons the dispersion of points corresponding to each population. The CF1 explained 59% of the variance while the CF2 explained 19%.

Fig. 6: UPGMA dendrogram derived from Mahalanobis distances based on wings shape. TwyMG and TwySP= *T. wygodzinskyi* from Santa Rita de Caldas and Vargem Grande do Sul; TpsCBA, TpsIBA, TpsMG, TpsPB and TpsCE= *T. pseudomaculata* from Curaçá, Itaberaba, Itaobim, Bom Jesus and Sobral, finally TmaRR= *T. maculata* from Mucajaí.

Fig. 1

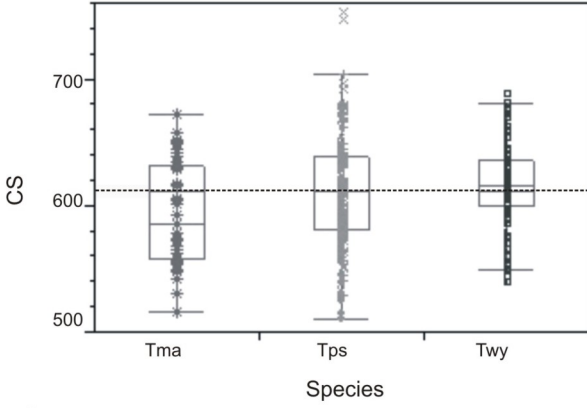
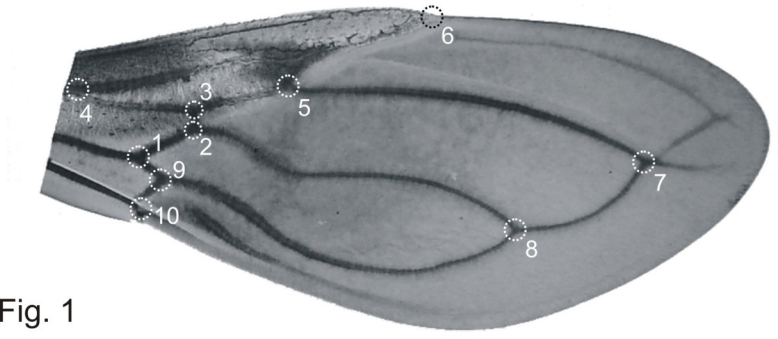


Fig. 2

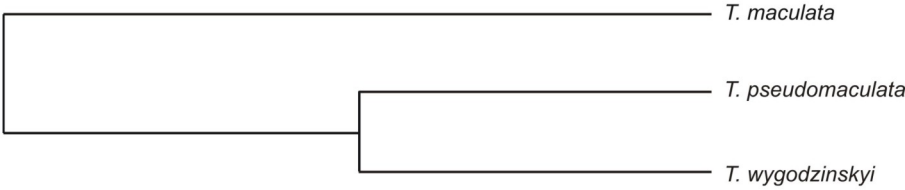


Fig. 3

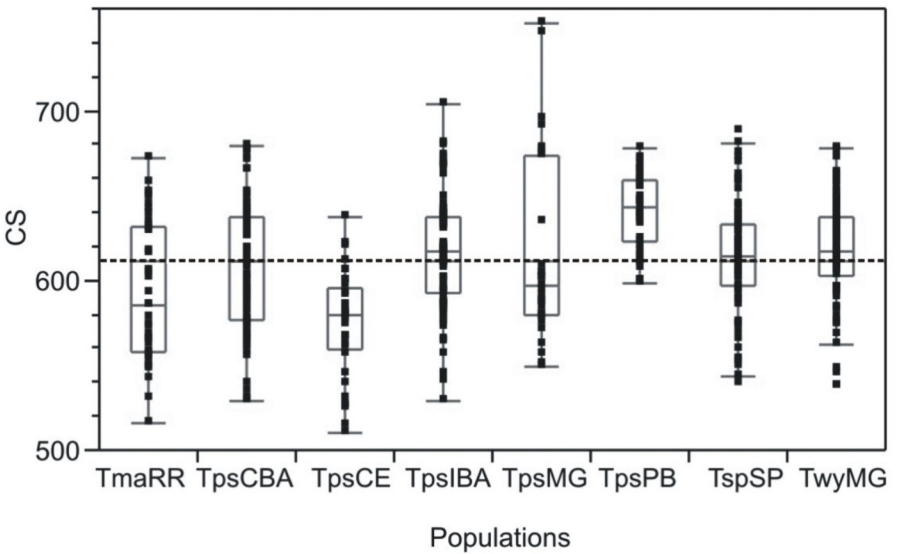


Fig. 4

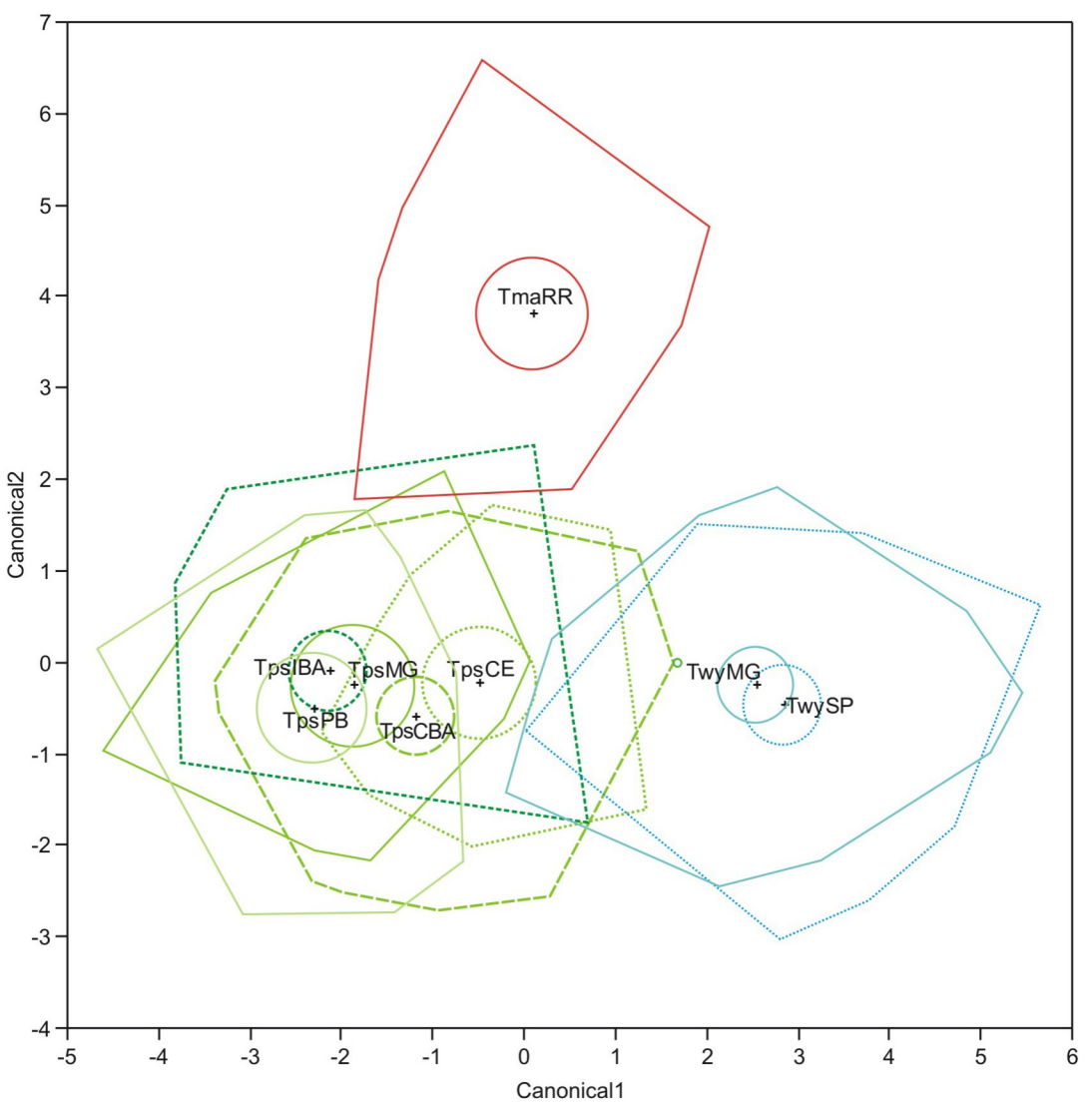


Fig. 5

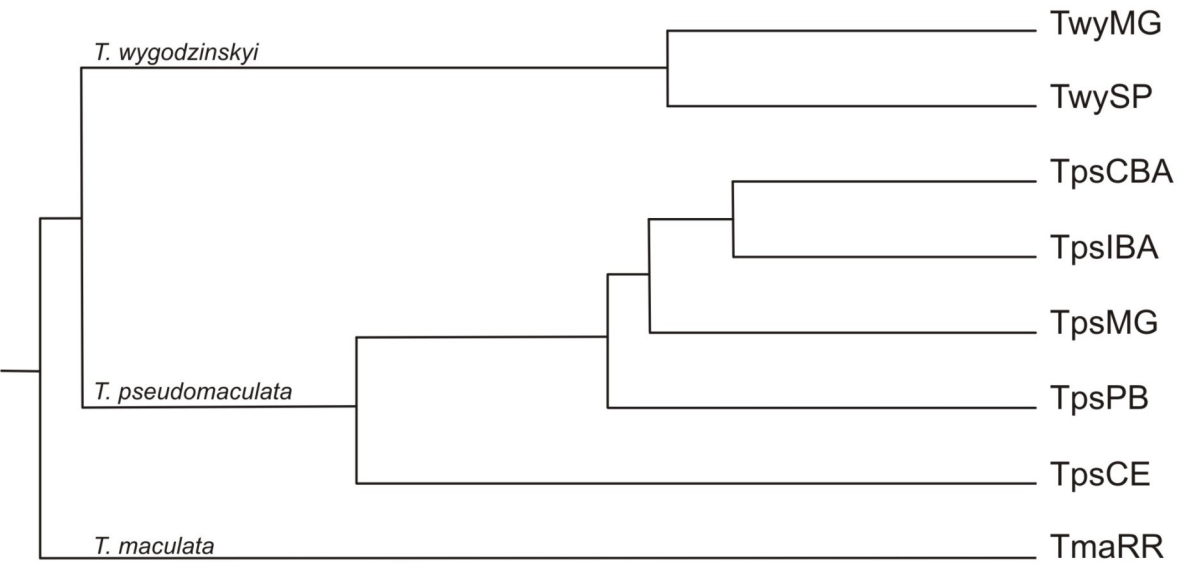


Fig. 6

5.3. Terceiro manuscrito

Title: Inferences about antennal phenotype: is the “*Triatoma maculata* complex” (Hemiptera: Reduviidae) valid?

Carbajal de la Fuente, Ana L.¹✉; Noireau, François² and Catalá, Silvia S.³

¹ Depto Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz. FIOCRUZ. Av. Brasil 4365. CEP 21045-900 Rio de Janeiro. Brasil.

² Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Av. Agropolis, BP.64501, 34394 Montpellier, France.

³ CRILAR, Entre Rios y Mendoza s/n. CP 5301, Anillaco, La Rioja. Argentina.

✉ Corresponding author:

Ana Laura Carbajal de la Fuente, Depto Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, CEP 21045-900, RJ, Rio de Janeiro, Brazil.

e-mail: carbajal@ioc.fiocruz.br, Tel/ Fax: +55 21 2598-4320/ +55 21 2573-4468.

Abstract

The “*Triatoma maculata* complex” is presently formed by two epidemiologically important species of Triatominae, *Triatoma maculata* and *Triatoma pseudomaculata*, which share morphologic and chromatic characteristics. In order to clarify the systematic status and infer the evolutionary relationships of these vectors of Chagas disease, we performed a comparative analysis of their antennal phenotype, taking also into account *Triatoma wygodzinskyi*, a possible sister species. The comparison was based on *sensilla* arrays on the three distal segments of the antenna. Our results show a close similarity between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* antennal phenotypes, and significant differences with *T. maculata*. The inter-populations study reinforces the idea that *T. pseudomaculata* (arboricolous species) and *T. wygodzinskyi* (rupicolous species) would originate from a common ancestor. This work confirms the high discriminating capacity of the antennal phenotype in the systematic of Triatominae.

Key words: *Triatoma maculata* complex; *Triatoma pseudomaculata*; *Triatoma maculata*; *Triatoma wygodzinskyi*; antennal phenotype; *sensilla*; Brazil.

Introduction

Triatominae are the vectors of Chagas disease, which is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) and is ranked as one important parasitic disease for Latin America (WHO, 2006). In Brazil, the eradication program focused on *Triatoma infestans* (Klug, 1834), had as consequence the occurrence in dwellings of new potential vectors originally restricted to the sylvatic environment (Dias et al. 2002). In the northeast of Brazil, *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, one of these potential vectors, is exhibiting a quick synanthropic process (Dias et al. 2000; Diotaiuti et al. 2000; Noireau et al. 2005). Because of their similar morphologic and chromatic characteristics, *T. pseudomaculata* was misidentified for many years as *Triatoma maculata* (Erichson, 1848), a species found in the Roraima State of Brazil, Venezuela, Colombia, Surinam, Guyana, French Guiana, and some Caribbean islands (Carcavallo et al. 1998a, Carcavallo et al. 2000). Finally, *T. pseudomaculata* was formally described in 1964 from specimens collected in Sobral, Ceará State. According to the Schofield (1988) hypothesis about their origin, *T. maculata* and *T. pseudomaculata* would be

the result of the evolution of two geographic populations issuing from a common ancestor by passive dispersion of nymphs associated to migratory birds.

Because they share many morphologic and chromatic characteristics, both species form the “*T. maculata* complex” (Carcavallo et al. 2000) or “*maculata* subcomplex” (Dujardin et al. 2000). A third Brazilian species, *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951, exhibits close morphological similarities with *T. pseudomaculata* (Carcavallo et al. 2000). *T. wygodzinskyi* has been described from a small number of specimens (5) obtained from a single sampling in the south of Minas Gerais State, Brazil.

T. maculata is commonly found in the wild environment in palm trees, associated with birds, bats, rodents and marsupials (Carcavallo et al. 1998b), but exhibits epidemiological importance when it colonizes synanthropic structures (Feliciangeli et al. 2003; Luitgards-Moura et al. 2005). *T. pseudomaculata* is about all found in hollow trees but also in rodent, marsupial and “armadillo” shelters (Lent and Wygodzinsky, 1979; Espínola, 1985; Dias-Lima et al. 2003). It is currently reported to be colonizing artificial structures (Silveira and Vinhaes, 1998) and may be considered as a synanthropic vector candidate. Finally, *T. wygodzinskyi* occurs exclusively in the cracks of stone located in southern Minas Gerais and northern São Paulo (Lent and Wygodzinsky, 1979; Carbajal de la Fuente, unpublished data).

According to Hypša et al. (2002) and Santos et al. (2007), *T. maculata* and *T. pseudomaculata* would pertain to distinct evolutionary lineages whereas *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* would be closely related species. In order to confirm this hypothesis and to clarify the systematic status, we carried out an inter- and intra-specific comparative study of the antennal phenotype observed for *T. maculata*, *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*. We also explored the existence of sexual dimorphism in the antenna of these species.

Material and methods

Insects: Brazilian populations of three species were compared: *T. maculata* (one population from Mucajaí, Roraima State); *T. pseudomaculata* (three populations from Itaobim, Minas Gerais; Curaçá, Bahía; and Sobral, Ceará) and *T. wygodzinskyi* (two population from Santa Rita de Caldas, Minas Gerais, and Vargem Grande do Sul, São Paulo) (Table 1). The insects analyzed were field specimens, except for *T. maculata* and the Sobral population of *T. pseudomaculata*, which originated from a first generation, obtained from the insectary of the Laboratório de Triatomíneos e

Epidemiologia da Doença de Chagas, Instituto Rene Rachou, FIOCRUZ, Brazil. We currently consider that the triatomine populations from São Paulo State characterized as *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940, and studied by Hypša et al. (2002) and Paula et al. (2005) pertained in reality to the species *T. wygodzinskyi* (Santos et al. 2007). Unfortunately, we could not include specimens of *T. arthurneivai* in this analysis. The antennas of all the collection type specimens were damaged and recent collecting efforts in Serra do Cipó, Minas Gerais State, were unsuccessful.

Antennal preparations: One antenna per individual was removed using fine forceps, stored in 70% ethanol and diafanized in sodium hydroxide (10%). After neutralization with acetic acid (10%), each antenna was mounted on a slide in glycerine. *Sensilla* identification and counting were made on the ventral side of the three distal segments of the antenna: pedicel (P), flagellum first segment (F1), and flagellum second segment (F2), using optical microscopy (400x) and a drawing chamber (Carbajal de la Fuente and Catalá, 2002). *Sensilla* were classified in Bristles (BR), thin walled trichoids (TH), thick walled trichoids (TK) and basiconica (BAS) according to Catalá and Schofield (1994).

Data analysis: Means and standard deviations were calculated for each type of *sensilla* in each one of the antennal segments. Levene's test was used to check the homogeneity of variances. Variables were analyzed using ANOVA and mean values were contrasted using the LSD (least significant difference) test. Variables with significant differences were used for discriminant analysis between species using PADWIN software, version 81a (J.P. Dujardin, www.mpl.ird.fr/morphometrics). For population analysis, Mahalanobis distances and their statistical significance were calculated by permutation tests (1000 runs each) after Bonferroni correction. Cluster analysis based on Euclidean distances was used to build an UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average) phenogram. This analysis was carried out with 12 variables using PAST software version 1.44 (www.folk.uio.no/ohammer/past).

Results

Analysis by species: *T. maculata* and *T. pseudomaculata* presented the four types of *sensilla* distributed on their pedicel and antennal segments. *T. wygodzinskyi* presented a low quantity (TwySP) or did not present (TwyMG) the P-TK *sensilla* type (Table 2). Interspecific univariate analysis (variables log transformed) showed

significant differences in pedicel mechanoreceptor (P-BR) and chemoreceptor (P-TH, P-TK, P-BAS, F2-TH and F2-BAS) densities. The LSD test revealed that P-TH and F2-TH could separate the three species, and P-TK, P-BAS and F2-BAS separated *T. maculata* to the remaining species ($P < 0.01$). P-TK, P-BAS and F2-BAS did not exhibit significant differences between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*. For discriminant analysis, canonical factor 1 (CF1) separated *T. maculata* from the remaining species and demonstrated close proximity for *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (Fig. 1). The CF1 explained 92% of the variance while the CF2 explained 8%. The Mahalanobis distances between the three species were highly significant ($P < 0.001$). After 1000 permutations, 80% of *T. wygodzinskyi* specimens were correctly reclassified, while *T. maculata* and *T. pseudomaculata* had reclassification rates of 70% and 72%, respectively.

Analysis by populations: Univariate analysis showed significant difference ($P < 0.05$) for the F2-BAS number between both *T. wygodzinskyi* populations. For P-BR, F1-TK and F2-TK sensilla types, significant differences were found among *T. pseudomaculata* populations. The TpsBA and TpsMG populations showed a greater number of P-BR ($P < 0.05$). For F1-TK, TpsCE had a smaller number for this type of sensilla and was significantly different from the others. Finally, TpsMG contained a F2-TK number that was significantly higher than other *T. pseudomaculata* populations. Cluster analysis clearly separated the two groups (Fig. 2): the first group included *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* population from Ceará and the second group contained the remaining *T. pseudomaculata* populations (TpsBA and TpsMG). Unassociated with these groups, we found the *T. maculata* population. Mahalanobis distances were only significant between *T. maculata* and the remaining populations. A low level of reclassification (10%) was obtained for specimens of *T. wygodzinskyi* from Minas Gerais, whereas 60% reclassification was obtained for the population from São Paulo. *T. pseudomaculata* populations from Ceará, Minas Gerais and Bahia State, were also poorly reclassified with 30%, 20% and 20%, respectively. *T. maculata* showed the best value of reclassification, with 70% of the specimens correctly classified.

Sexual dimorphism: The three species showed sexual dimorphism of their antennal phenotype (Table 3). *T. wygodzinskyi* males (TwyMG population) exhibited significantly more F2-TH than females. *T. pseudomaculata* showed sexual

dimorphism for F1-TH and F1-TK (2 populations) and F2-TH (only TpsBA population). Males had a higher number of TH in F1 and F2 than females, although the contrary was observed for F1-TK. *T. maculata* females had a significantly higher density of P-BAS and F1-BAS than males.

Discussion

The close external similarities between *T. maculata* and *T. pseudomaculata* were always noted by the specialist. In a large study, Lent and Wygodzinsky (1979) noted that both species are hardly to separate using external features such as color pattern. They also stated that the male genitalia (mainly the endosomal processes) offered the best characteristics for an effective differentiation between them. These similarities were responsible for the establishment of “*T. maculata* complex” comprising exclusively these two species (Carcavallo et al. 2000; Dujardin et al. 2000). Nevertheless from enzymatic, cytogenetic and morphometric data, Santos et al. (2007) suggest the formation of a different group containing *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*, excluding *T. maculata* to a distinct evolutionary lineage. In accordance with these results, our study demonstrates significant similarity between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* antennal phenotypes, and significant differences with *T. maculata*. Our results are also consistent with molecular studies performed by Hypša et al. (2002) and Paula et al. (2005), who show a high genetic difference between *T. maculata* and *T. pseudomaculata* and a close relationship between *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* (formerly *T. arthurneivai* from São Paulo State; Santos et al. 2007). In contrast, they disagree with the analyses of 12S and 16S sequences performed by Sainz et al. (2004), which suggest that *T. maculata* and *T. pseudomaculata* are closely related species. This discordance could be attributed to a misidentification of Sainz’s specimens from Sergipe (Brazil), included in the analysis as *T. maculata*. According to Lent and Wygodzinsky (1979) and Carcavallo et al. (1998a) who studied the geographic distributional range of Triatominae species, those individuals should be *T. pseudomaculata* because *T. maculata* is only found in Roraima State. Finally, it is highly probable that Sainz et al. (2004) have in fact specimens of a single species. Therefore, their conclusion about the phylogenetical proximity between *T. pseudomaculata* and *T. maculata* is doubtful, as pointed out by Santos et al. (2007).

The inter-population study reinforces the idea that *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* could be sister species. Nevertheless, multivariate analysis shows the

populations distributed in two clusters. The first cluster grouped both *T. wygodzinskyi* populations and *T. pseudomaculata* from Ceará, and the second one with *T. pseudomaculata* from Bahia and Minas Gerais. Both clusters are clearly separated from *T. maculata*. These facts demonstrate the phenotypic proximity of both *T. wygodzinskyi* populations, which originate from close collecting sites.

Even without significant differences in Mahalanobis distances between *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* populations, it is interesting to point out the cluster formed by the *T. pseudomaculata* population from Ceará and *T. wygodzinskyi* populations (Fig. 2). The three populations present high similarity in their antennal phenotype. If we considered *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* as sister species, two possible hypotheses could explain the phenogram topology. In the first, if we consider the antennal phenotype of the Ceará population as plesiomorphic, the phenogram reflects that the group formed by *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* from Ceará shows less phenotypical differentiation from the common ancestor (Fig. 3a). In the second, we considered the antennal phenotype of *T. pseudomaculata* from Minas Gerais to be more plesiomorphic. In this case, the phenogram reflects that the group composed of *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* from Ceará shows the highest phenotypic differentiation from the common ancestor (Fig. 3b). The assumption of Gaunt and Miles (2000), which suggests that genus *Triatoma* has evolved predominantly in rocky habitats, would favor the first hypothesis. Nevertheless, in order to test these hypotheses, further phylogenetic analyses will be necessary to determine the sister group/species of *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*.

The high phenotypical amplitude of *T. pseudomaculata* could be related to biogeographic areas and transition zones in Latin America. Morrone (2006) considers the bioregion from which TpsCE comes as "Para region". In accordance, TpsCE was the only population analyzed that originates from this region, while the two remaining *T. pseudomaculata* populations come from the savanna regions formed by the "cerrado" and "caatinga".

In the interpopulational analysis, we observe a low percentage of *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* specimens correctly reclassified. This is not observed for *T. maculata*, pointing out again the high phenotypic similarities between *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata*.

Sexual dimorphism in the antennal *sensilla* pattern was recorded for several triatomine species: *T. infestans* (Catalá and Dujardin, 2001), *T. pseudomaculata* and

T. sordida (Carbajal de la Fuente and Catalá, 2002), *T. dimidiata* Latreille, 1811 (Catalá et al. 2005) and *Mepraia spinolai* Porter, 1934 (Moreno et al. 2005). Our study confirms these results for *T. pseudomaculata* (Carbajal de la Fuente and Catalá, 2002) and reports for the first time sexual dimorphism in the antennal phenotype of *T. maculata* and *T. wygodzinskyi*.

Evidences of this study and previous works (Hypša et al. 2002, Paula et al. 2005 and Santos et al. 2007) allow us to propose formally the recomposition of the “*T. maculata* complex”. In conclusion, our antennal phenotype data clearly indicate a differentiation between *T. maculata* and *T. pseudomaculata*. In contrast, the latter species and *T. wygodzinskyi* are close species, confirming recent results obtained using geometric morphometry (Carbajal de la Fuente et al., unpublished data). The antennal phenotype reflects the exquisite adaptation of insects to their habitat. Several papers on Triatominae and other insect groups showed this effect very clearly (Lane and Crosskey 1993, Gracco and Catalá 2000, Catalá and Torres 2001). However, the antennae, as a vital essential organ of the insects, have suffered, along their evolutionary history, strong selective pressures reflecting at one and the same time environmental and genetic changes. This work also confirms the high discriminating capacity of antennal phenotype analysis.

Acknowledgements

We are indebted to the anonymous referees for help to improve the manuscript. Special thanks to C.J. Belisário and L. Diotaiuti (Instituto Rene Rachou, Brazil) for the specimens of *T. maculata* and *T. pseudomaculata* from Sobral, CE. We are grateful to R.P. Mello and C.M. Lopes for providing the microscopy facilities. This study was supported by IRD (France), FIOCRUZ and CAPES (Brazil). A.L.C.F by scholarship from the program CAPES/CNPq - IEL Nacional, Brazil.

References

- Barretto, M.P.; 1966. Aspectos da epidemiologia da tripanossomíase americana, infecção com focos naturais, com especial referencia à região do Estado de São Paulo. PhD these Fac. Farm. Odonto. Ribeirão Preto, SP, 139 pp.
- Barretto, M.P. and Ribeiro, R.D.; 1981. Estudo sobre reservatórios o vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXXVII. Observações sobre a ecologia do *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940 (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Bras. Zool. 41, 317-320.

- Carbajal de la Fuente, A.L. and Catalá, S.; 2002. Relationship between antennal sensilla pattern and habitat in six species of Triatominae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97, 1121-1125.
- Carcavallo, R.U., Curto de Casas, S.I., Sherlock, I.A., Galíndez Girón, I., Jurberg, J., Galvão, C., Mena-Segura, C.A. and Noireau F.; 1997a. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. In: R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg and H. Lent (Eds). Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, Vol. 3, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp 747-793.
- Carcavallo, R.U., Franca Rodríguez, M.E., Salvatella, R., Curto de Casas, S.I., Sherlock, I.A., Galvão, C., Rocha, D.S., Galíndez Girón, I., Otero Arocha, M.A., Martínez, A., da Rosa, J.A., Canale, D.M., Farr, T.H. and Barata, J.M.S.; 1997b. Habitats and related fauna. In: R.U. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg and H. Lent (Eds). Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, Vol. 2, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp 561-601.
- Carcavallo, R.U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., Galvão, C.; 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. Entomol. Vect. 7, 1-99.
- Catalá, S. and Schofield, C.J.; 1994. Antennal sensilla of *Rhodnius*. J. Morphol. 219, 193-204.
- Catalá, S. and Dujardin, J.P.; 2001. Antennal sensilla patterns indicate geographic and ecotopic variability among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations. J. Med. Entomol. 38, 423-428.
- Catalá, S., Sachetto, C., Moreno, M., Rosales, R., Salazar-Schetrino, P.M., Gorla, D.; 2005. Antennal phenotype of *Triatoma dimidiata* populations and its relationship with species of phyllosoma and protracta complexes. J. Med. Entomol. 42, 719-25.
- Corrêa, R.R., Alves, U.P. and Noda, J.; 1965. Nota sobre o *Triatoma arthurneivai*. Seu criadouro extradomiciliar (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Bras. Malar. Doenças Trop. 17, 217-232.
- Corrêa, R., Pinto Alves, U. and Pascale, G.; 1962. Presença do *Triatoma arthurneivai* em Sorocaba (Hemiptera: Reduviidae). Rev. Paul. Med. 60, 267.
- Dias, J.C.P., Machado, E.M.M., Fernandes, A.L. and Vinhaes, M.C.; 2000. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. Cad. Saúde Pública. 16, 13-34.

- Dias, J.C.P., Silveira, A.C. and Schofield, C.J.; 2002. The impact of Chagas disease control in Latin América. A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97, 603-612.
- Dias-Lima, A.G., Menezes, D., Sherlock, I. and Noireau, F.; 2003. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). J. Med. Entomol. 40, 989- 990.
- Diotaiuti, L., Faria Filho, O., Carneiro, F., Pinto Dias, J., Pires, H. and Schofield, C.; 2000. Operational aspects of *Triatoma brasiliensis* control. Cad. Saúde Pública. 16, 61-67.
- Dujardin, J.P., Schofield, C.J. and Panzera, F; 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, Classe des Sciences Naturelles et Médicales, NS 24, 1-162.
- Feliciangeli, M.D., Campbell-Lendrum, D., Martinez, C., Gonzalez, D., Coleman, P. and Davies, C.; 2003. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. Trends Parasitol. 19, 44-49.
- Forattini, O.P., Juarez, E. and Rabello, E.X.; 1968. Dados sobre a biologia do *Triatoma arthurneivai* no sudeste do Estado de São Paulo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Saúde Públ. 2, 186-193.
- Forattini, O.P., Rabello, E.X. and Pattoli, D.B.G.; 1972. Aspectos ecológicos da tripanossomose Americana. IV- Mobilidade de *Triatoma arthurneivai* em seus ecótopos naturais. Rev. Saúde Públ. 6, 183-187.
- Hypša, V., Tietz, D.F., Zrzavý, J., Rego, R.O.M., Galvão, C., Jurberg, J.; 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. Mol. Phyl. Evol. 23, 447-457.
- Juarez, E.; 1970. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Triatoma arthurneivai* em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Saúde Públ. 4, 13-18.
- Lent, H. and Wygodzinsky, P.; 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 163, 127-520.
- Luitgards-Moura, J.F., Borges-Pereira, J., Costa, J., Zauza, P.L., Rosa-Freitas, M.G.; 2005. On the possibility of autochthonous Chagas disease in Roraima, Amazon region, Brazil, 2000-2001. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 47, 45-54.

- Moreno, M, L., Gorla, D. and Catalá, S.; 2005. Association between antennal phenotype, wing polymorphism and sex in the genus *Mepraia* (Reduviidae: Triatominae). *Infect. Gen. Evol.* 6, 228-234.
- Morrone, J.; 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Ann. Rev. Entomol.* 51, 467-494.
- Noireau, F., Carbajal de la Fuente, A. L., Lopes, C.M. and Diotaiuti, L.; 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 1-6
- Paula, A.S., Diotaiuti, L. and Schofield, C.J.; 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol. Phyl. Evol.* 35, 712-718.
- Pinto Alves, U. and Noda, J.; 1964. Os transmissores da doença de Chagas da região de Sorocaba no Estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Hig. Saúde Publ.* 29, 141-157.
- Santos S.M., Lopes, C.M., Dujardin, J.P., Panzera, F., Pérez, R., Carbajal de la Fuente, A.L., Pacheco, R.S. and Noireau F.; 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infect. Gen. Evol.* (*in press*).
- Schofield, C.J.; 1988. Biosystematics of the Triatominae. In: *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Clarendon Press, Oxford, UK, 37, 284-312.
- Silveira, A.C. and Vinhaes, M.; 1998. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 15-60.
- WHO 2006. site: (<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>).

Table 1: Characteristics of the different samples analyzed.

Specie	Code	Locality, State	Habitat	N	
				F	M
<i>T. wygodzinskyi</i>	TwyMG	Santa Rita de Caldas, MG	rocks	5	5
	TwySP	Vargem Grande do Sul, SP		5	5
<i>T. pseudomaculata</i>	TpsCE	Sobral, CE	peridomestic	5	5
	TpsBA	Curaçá, BA		5	5
	TpsMG	Itaobim, MG		0	5
<i>T. maculata</i>	TmaRR	Macajá, RR	Palm tree	5	5

MG= Minas Gerais; SP= São Paulo; CE= Ceará; BA= Bahía and RR= Roraima. N= Number of antennas, F= females, M= males.

Table 2: Mean number (standard deviation) of *sensilla* on each antennal segment of the populations examined.

Species	Pedicel				Flagellum 1				Flagellum 2			
	BR	TH	TK	Bas	BR	TH	TK	Bas	BR	TH	TK	Bas
TwyMG	116.80 (16.62)	117.00 (42.93)	0	2.5 (2.27)	23.4 (3.47)	54.4 (15.79)	121.10 (24.00)	22.40 (7.79)	12.10 (3.69)	27.90 (11.25)	80.50 (14.83)	13.30 (3.56)
TwySP	121.70 (15.76)	144.30 (53.43)	0.40 (0.69)	2.90 (2.47)	24.80 (4.21)	61.60 (15.53)	108.80 (22.67)	16.50 (2.50)	13.50 (4.22)	39.10 (13.68)	94.70 (21.26)	18.10 (4.99)
TpsMG	132.60 (16.82)	205.20 (57.75)	1.00 (2.23)	5.00 (1.87)	22.4 (3.78)	60.20 (17.99)	186.00 (15.55)	33.20 (18.97)	12.60 (2.60)	27.00 (3.53)	137.00 (20.85)	16.80 (11.21)
TpsBA	135.20 (20.61)	183.50 (49.59)	4.4 (6.18)	4.90 (1.91)	23.30 (2.83)	55.80 (15.24)	201.70 (34.29)	27.90 (6.29)	12.10 (3.66)	27.20 (10.49)	113.00 (34.30)	16.40 (8.08)
TpsCE	113.50 (15.28)	154.20 (55.41)	1.30 (1.77)	3.70 (2.45)	21.60 (2.63)	50.90 (14.78)	140.70 (28.55)	19.50 (7.83)	13.20 (3.79)	23.40 (6.56)	92.00 (19.45)	12.00 (4.44)
TmaRR	133.90 (14.88)	288.40 (106.04)	37.9 (35.59)	9.2 (5.59)	25.2 (2.94)	87.30 (13.38)	227.5 (33.43)	40.10 (15.09)	13.40 (2.31)	42.80 (7.88)	144.00 (18.48)	35.10 (10.35)

TwyMG and TwySP: *T. wygodzinskyi* from Minas Gerais and São Paulo States; TpsMG, TpsBA and TpsCE: *T. pseudomaculata* from Minas Gerais, Bahía and Ceará States; TmaRR: *T. maculata* from Roraima State. BR = Bristles; TH = thin-walled trichoids; TK = thick-walled trichoids and Bas = basiconics.

Table 3: Mean number (standard deviation) of *sensilla* for five types of receptors among the four triatomine populations with sexual dimorphism ($P < 0.01$).

Specie	P-BAS		F1-TH		F1-TK		F1-BAS		F2-TH	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
TwyMG	-	-	-	-	-	-	-	-	49.60 (10.06)	28.60 (6.65)
TpsBA	-	-	66.00 (8.36)	45.60 (13.88)	184.80 (19.14)	218.60 (39.57)	-	-	35.40 (2.70)	19.00 (8.51)
TpsCE	-	-	58.60 (15.58)	43.20 (10.03)	122.20 (19.42)	159.20 (24.52)	-	-	-	-
TmaRR	5.40 (4.50)	13.00 (3.74)	-	-	-	-	29.40 (13.24)	50.80 (7.15)	-	-

F1-TH= thin walled trichoids on flagel 1; F1-TK= thick walled trichoids on flagel; F1-BAS= basiconics on flagellum 1; F2-TH= thin walled trichoids on flagellum 2; P-BAS= basiconics on pedicel. Twy= *T. wygodzinskyi*; Tps= *T. pseudomaculata*; Tma= *T. maculata*. CE= Ceará State, BA= Bahía State, MG= Minas Gerais State and RR= Roraima State.

Figure captions

Fig. 1: Discriminant analysis based on 5 variables of the antennal phenotype of *T. wygodzinskyi* (Twy), *T. pseudomaculata* (Tps) and *T. maculata* (Tma). Distances between the three species are significant ($p < 0.01$).

Fig 2: Cluster analysis based on Euclidean distances of antennal phenotype (12 variables of *T. wygodzinskyi* from Minas Gerais State (TwyMG), São Paulo State (TwySP); *T. pseudomaculata* from Ceará State (TpsCE), Bahia State (TpsBA) and Minas Gerais State (TpsMG) and *T. maculata* from Roraima State (TmaRR).

Fig. 3: Hypothesis to explain the phenogram topology of Fig. 2 considering the antennal phenotype of the Ceará population of *T. pseudomaculata* to be closer to a hypothetical common ancestor (CA) of *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*.

Fig. 4: Hypothesis to explain the phenogram topology of Fig. 2 considering the antennal phenotype of the Minas Gerais population of *T. pseudomaculata* to be closer to a hypothetical common ancestor of *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*.

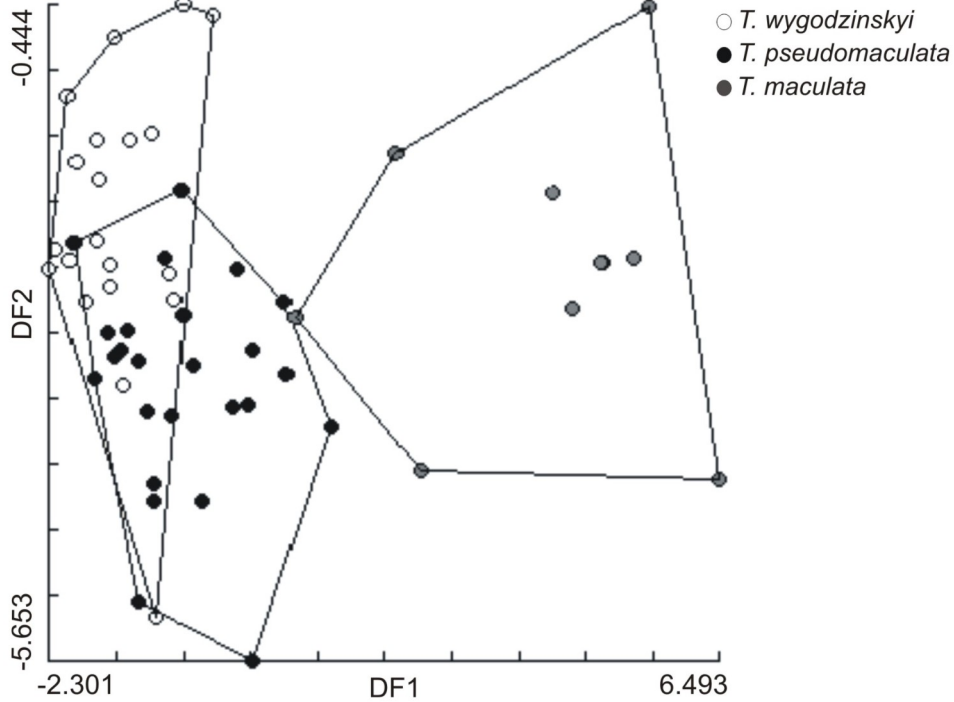


Fig. 1

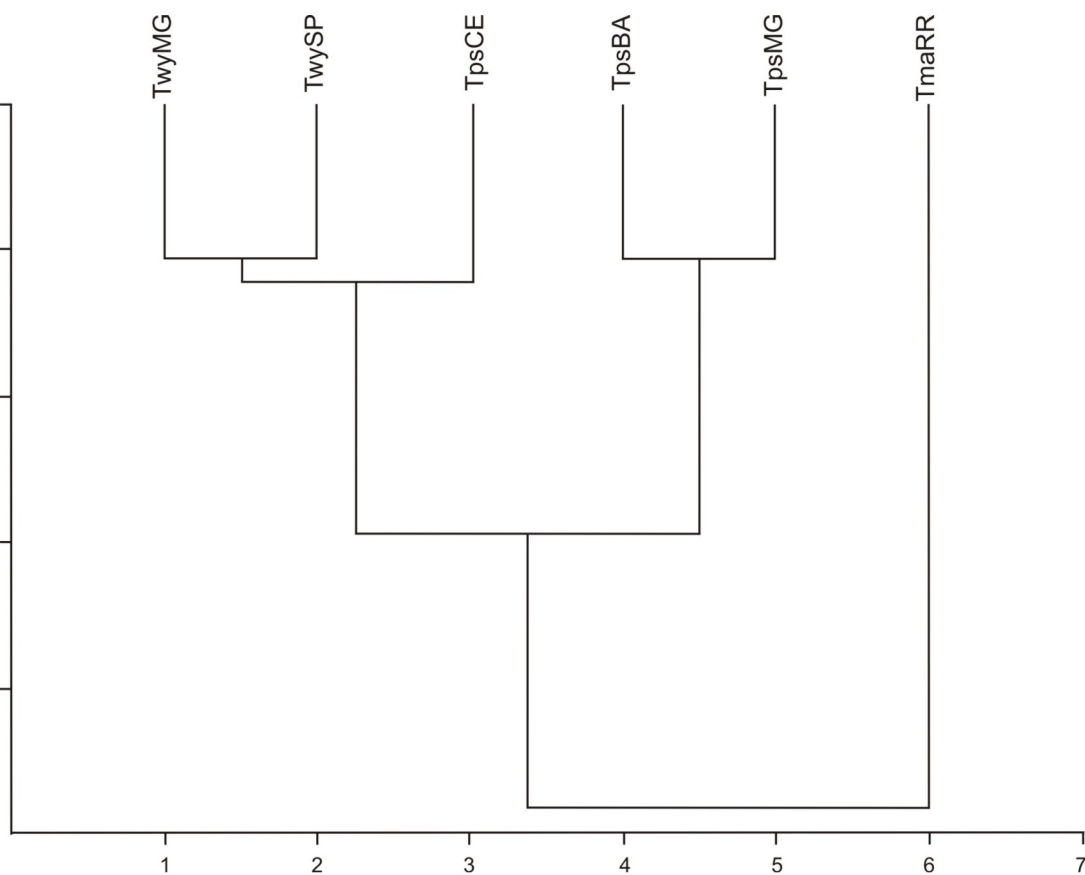


Fig. 2

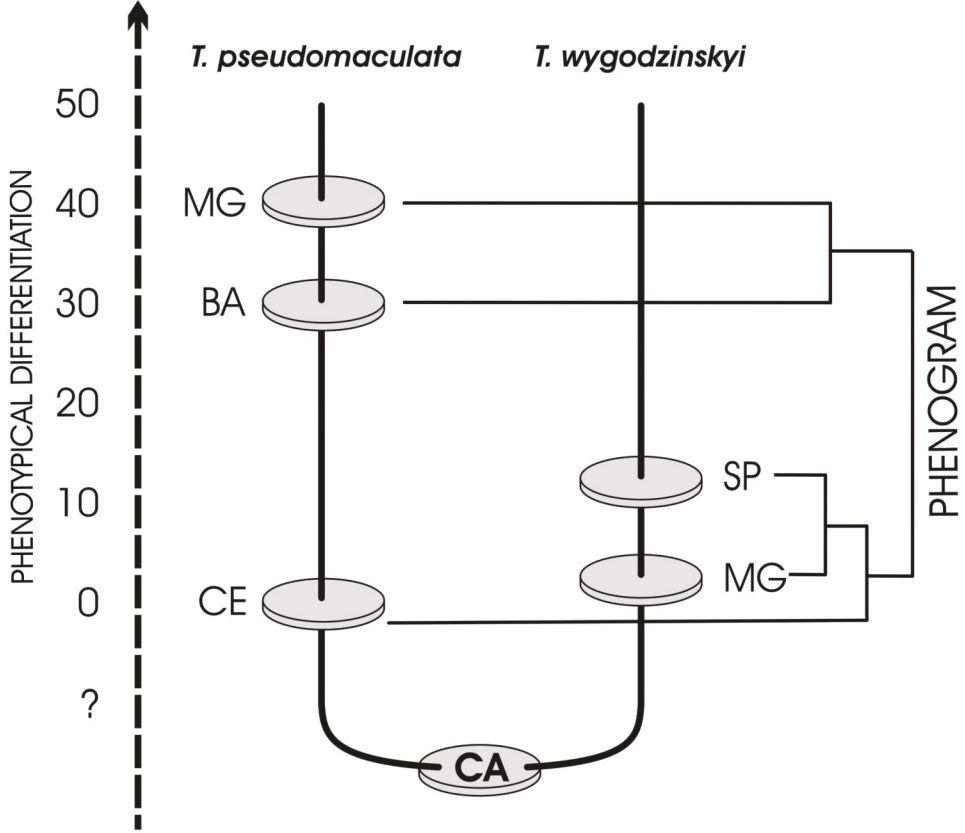


Fig. 3

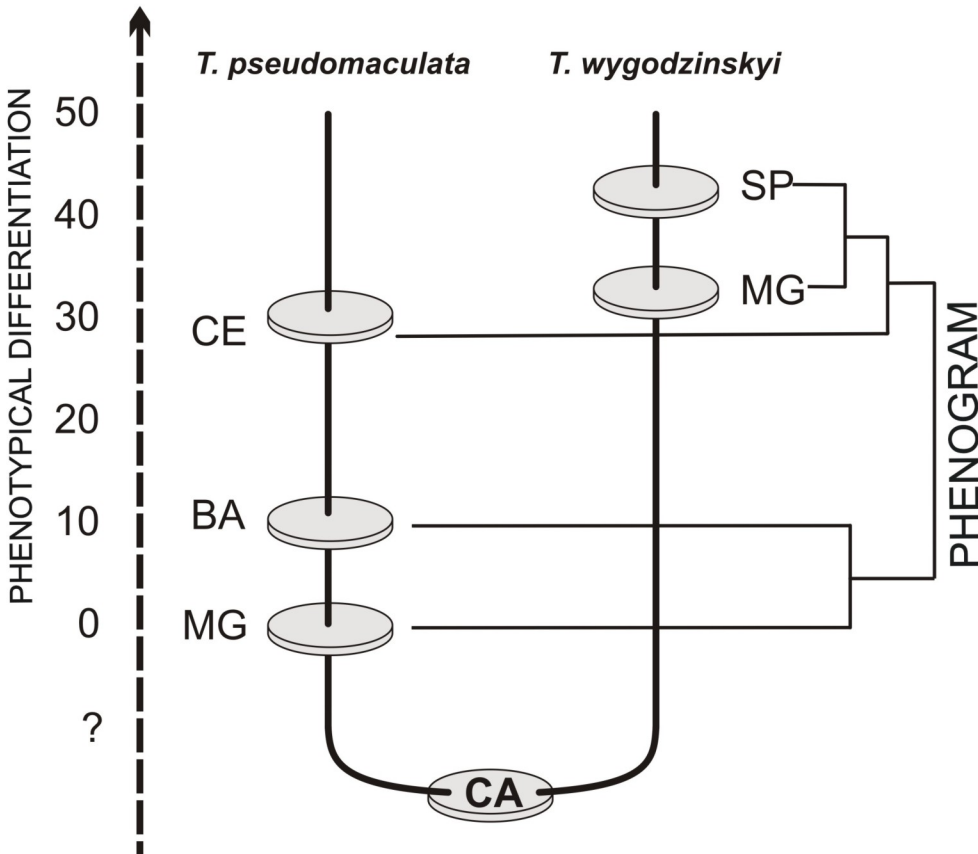


Fig. 4

5.4. Quarto manuscrito

Title: The association between the geographic distribution of *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae) and environmental variables recorded by remote sensors

Running Head: Distribution of two Chagas disease vectors

Carbajal de la Fuente, A.L.¹✉; Porcasi, X.²; Noireau, F.^{3,4}; Diotaiuti, L.⁵ Gorla, D.E.²

¹ Ph.D. student, Depto. Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Pav. Carlos Chagas, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

² Ph.D. student (X.P) and Ph.D. (D.E.G), Centro Regional de Investigaciones Científicas y Transferencia Tecnológica, CRILAR, Entre Ríos y Mendoza s/n, Anillaco (La Rioja), Argentina.

³ Ph.D, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Montpellier, France. ⁴ Facultad de Medicina, Universidad Mayor San Simón, P.O. Box 4866, Cochabamba, Bolivia.

⁵ Ph.D, Instituto Renné Rachou, IRR, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brasil.

✉ Corresponding author:

Ana Laura Carbajal de la Fuente: Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, Brasil. Tel: +55 21 2598-4320/22 r. 117; Fax: +55 21 2573-4468. e-mail: carbajal@ioc.fiocruz.br

Abstract

A geographic distribution analysis of *Triatoma pseudomaculata* (Tps) and *T. wygodzinskyi* (Twy) was carried out. The study was based on biophysics variables estimated from information provided by the satellite remote sensors AVRRH (Advanced Very High Resolution Radiometer) and MODIS (MODerate-resolution Imaging Spectroradiometer). Our goal was to analyze the potential geographic distribution of Tps and Twy, analysing the performance of three predictive models (one for each species and one for both species together) based on temperature, vapour pressure deficit, vegetation and altitude. The analysis of the geographic distribution shows a very good performance for all models (> 85.7% of overall correct classification of presence and absence point data). MODIS-based models showed lower correct classifications than these of AVHRR-based models. The results strongly suggest that the environmental information provided by the remote sensors can be successfully used in studies on the geographic distribution of poorly known Chagas disease vector species.

Key words: *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma wygodzinskyi*, geographic distribution, environmental variables, remote sensing, GIS, Chagas disease.

Introduction

Control of Chagas disease by elimination of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) domestic populations is being successfully pursued in most of the Southern Cone countries of South America, where this species was considered to be the main vector (1, 2). After Uruguay (1997) and Chile (1999), Brazil is the third country to obtain (June 2006) the certification from the PAHO/WHO (www.paho.org/Spanish/DD/PIN/ps060616.htm) of having interrupted the vectorial transmission of the agent of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909) by *T. infestans*. In most Southern Cone regions, autochthonous species of Triatominae, originally restricted to wild environments, are increasingly being reported invading human dwellings and peridomestic structures where they might act as vectors of *T. cruzi* (2-5).

Triatoma pseudomaculata Corrêa & Espínola, 1964 is the second species (after *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911) of epidemiological importance in Northeast Brazil. Specimens typically inhabit sylvatic and peridomestic environments, but they are occasionally reported entering human dwellings (6, 7). *T. pseudomaculata* is considered

an endemic species of the “caatinga” and “cerrado” biogeographical provinces (following the biogeographical division previously proposed (8) and has being recorded in the states of Alagoas, Bahia, Brasília, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, and Tocantins (9, 10).

Triatoma pseudomaculata has one related species, *T. wygodzinskyi* Lent, 1951, which is distributed in the south of Minas Gerais State (10, 11) and São Paulo State (Carbajal de la Fuente, unpub. data). *T. wygodzinskyi* does not represent an epidemiological threat because it is limited to the sylvatic environment. Both species share strong similarities in the external morphology (12). Evidences about their common ancestry, belonging to the same evolutionary lineage, have been recently demonstrated (13, 14). In several studies, *T. wygodzinskyi* has been misidentified with *T. arthurneivai*, another Brazilian sylvatic triatomine. Therefore, previous published data on the ecology and morphology referred to *T. arthurneivai* from São Paulo State, corresponds to *T. wygodzinskyi*, as showed by results on geometric morphometry of wings and masculine genitalia (Carbajal de la Fuente et al., submitted). Despite the morphological similarities and close evolutionary relationships between *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata*, their ecological characteristics are markedly different. In sylvatic environment, *T. wygodzinskyi* is rupicolous (15-19) while *T. pseudomaculata* is arboricolous (20, 21).

These species are increasingly studied in their biology, morphology, genetics and ecology (14), although the knowledge about their geographical distribution is considered outdated. This fact is dramatically evident in *T. wygodzinskyi*, a species only known from very few records in the type locality of Minas Gerais State (11) and from new reports from Sao Paulo State (Carbajal de la Fuente et al., unpub. data). The last compilation about the geographical distribution of both species was presented by (10) and the present paper is the first attempt to produce a predictive study on their distributions.

Studies made by Gorla (22-25) showed that predictive models based on environmental variables obtained by remote sensors are useful tools to study the geographic distribution of triatomines. Dumonteil and Gourbière (26) produced predictive models of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) distribution and elaborated risk maps of Chagas disease for the Yucatán peninsula (México). Cecere et al. (27) studied the spatio-temporal reinfestation patterns by *T. infestans* following a blanket insecticide spraying in the rural community of Amamá (Argentina) using a geographic information

system, satellite imagery, and spatial statistics. Remotely sensed imagery could be used to carry out a fine temporal quantification of several environmental variables for particular geographical areas, to obtain a precise characterization of species occurrence sites and to use this knowledge to make predictions about the potential areas where the species might be present.

The goal of the present paper was to analyze the potential geographic distribution of *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*, through predictive models built from information derived from AVHRR and MODIS imagery. The geographic distribution models were compared among each other to select the best predictive model and contrasted with the currently known distribution of each species.

Material and methods

Geographic region of study:

The data analysis was carried out within an area defined by the limits 0° N - 30° S of latitude and 30° W - 60° W of longitude. Field collections of triatomines bugs were conducted in the Brazilian states of Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, São Paulo and Tocantins, geo-located using a handheld Garmin™ Legend GPS navigator (Fig. 1). The species occurrence dataset was constructed by the aggregation of published reports (1 site for *T. wygodzinskyi*) and field collections during the present study (61 sites for *T. wygodzinskyi* and 168 for *T. pseudomaculata*). The environmental profile derived for the absence data was obtained from a random selection of points distributed in the biogeographic provinces of the Chaco- Caatinga- Cerrado corridor (28), excluding the distributional area proposed for the species by Carcavallo et al. (10). A random selection of points for the species absence was performed for each one of three models: T_{wy}, T_{ps} (individual prediction for the distribution of *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata*, respectively) and T_{ps}- T_{wy} (both species combined in the same predictive model).

Environmental variables:

The environmental variables used to characterize presence and absence sites were estimated from two different types of satellite images, one produced by the AVHRR (Advanced Very High Resolution Radiometer) onboard the NOAA satellite, and the other one produced by the MODIS (MODerate-resolution Imaging Spectroradiometer) onboard

the TERRA (EOS AM) satellite. For the analysis based on the AVHRR imagery, six environmental variables were used: air temperature (AT), land surface temperature (LST), mid-infrared radiation (MIR), normalized difference vegetation index (NDVI), vapor pressure deficit (VP), and land elevation (DEM). The first five variables derived from a temporal series of monthly images taken between 1982-2000. The images had 8x8 km spatial resolution. The temporal series was analyzed using the temporal decomposition of Fourier (image products processed by the TALA Research Group, Oxford University) (29). The decomposition produced a set of 11 descriptive statistics for each variable: average (A0), minimum (Mn), maximum (Mx), amplitudes and phases of the annual, bi-annual and tri-annual cycles (A1, A2, A3, P1, P2, P3), the percentage of the total variance of the three first Fourier components (DALL) and the variance of the complete series (Vr). The AVHRR imagery plus the land elevation model (DEM) conformed a set of 56 independent environmental properties for each pixel location (11 statistics for five environmental variables + DEM).

For the analysis based in the MODIS imagery, two environmental variables were used: land surface temperature (LST) and land elevation (DEM). The first variable derived from a temporal series of weekly maximum value composite diurnal (D) and nocturnal (N) images, taken between (January) 2003- (December) 2004. The images had 1x1 km spatial resolution. Eight descriptive statistics were produced for each variable: average (A0D, A0N, day and night respectively), minimum (MnD, MnN), maximum (MxD, MxN) and variance (VrD, VrN). The MODIS imagery plus the land elevation model (DEM) conformed a set of nine independent environmental properties for each pixel site (eight statistics for the LST series + DEM). The MODIS images were obtained from the EOS Data Gateway (<http://edcimswww.cr.usgs.gov/pub/imswelcome/>) and re-projected to the Latitude – Longitude Geographic Projection System.

The land elevation was obtained from the Digital Elevation Model (DEM) of the US Geological Service (USGS), with 90 meters of spatial resolution. The DEM resolution was adjusted to 1 or 8 km depending on whether MODIS or AVHRR imagery was used, respectively. All image processing was carried out using IDRISI 32 v.14.02.

Data analysis:

Three models of geographical distribution were elaborated for each image type (AVHRR and MODIS): one model for *T. wygodzinskyi* (Twy), one for *T. pseudomaculata* (Tps)

and one for the two species together (Twy-Tps). All the descriptive statistics were used in each model. For each model, a stepwise discriminant analysis was performed in order to estimate the best set of variables that allows the construction of a predictive model to recognize areas with similar environmental characteristics to the places of presence and absence of each species. The discriminant analysis was performed with STATISTICA v.7.0 (StatSoft, Inc. 2000).

Results

***T. wygodzinskyi* model (Twy)**

- AVHRR images

The discriminant analysis selected nine variables (A0, P1, P3, Vr of AT; A0, A1, Vr of VP; MIRMn and DEM) that classified correctly 99.6% of all absence sites (905/909 points) and 100% of the 8 presence sites (Wilks'-Lambda: 0.8579; F (9, 907)= 16.68, p<0.0001). The classification functions and the importance rank of variables based on the standardized coefficients (taken as indicators of the relative weight) are shown in the Table 1. The average (AT-A0) and variance (AT-Vr) of the air temperature and the annual amplitude of the vapor pressure deficit (VP-A1), were the variables with the highest weight for the discrimination between the presence and absence sites of the species. Using the model produced by the discriminant analysis, a map with the predicted distribution of *T. wygodzinskyi* was built, showing the absence and presence ranges for the species (Fig. 2a).

- MODIS images

The discriminant analysis selected three variables (DEM, LST-A0D and MnD) as the best for the description of the geographic distribution of the species. These three variables classified correctly 98.5% of all absence sites (734/745 sites) and 63.6% of the presence sites (7/11 sites) (Willk's-Lambda: 0.8905; F (3, 752)= 30.81 y p<0.0001). The classification functions and the importance rank of variables based on the standardized coefficients are shown in the Table 2. The land elevation (DEM) showed the highest weight in the analysis, followed by the average and the minimum of the diurnal land surface temperature (LST-A0D, MnD). Using the model produced by the discriminant analysis, a distribution map of *T. wygodzinskyi* was built showing the absence and presence ranges for the species (Fig. 2 b).

***T. pseudomaculata* model (Tps)**

- AVHRR images

The discriminant analysis selected 10 variables (P1 of AT; A1, A2, P1, P3, Vr of NDVI; A2 of VP; A0, Mn of LST and A2 of MIR) and classified correctly 99.10% of all absence sites (441/445 points) and 85.71% of the presence sites (18/21 sites) (Wilks'-Lambda: 0.4825, $F(10, 455) = 48.78$, $p < 0.0001$). The classification functions and the importance rank of variables based on the standardized coefficient are shown in the Table 1. The total variance of the time series and the bi-annual amplitude of the normalized difference vegetation index (Vr and A2 of NDVI-) together with the minimum land surface temperature (Mn of LST) were the variables with the highest discrimination power between presence and absence sites of the species. Using the model produced by the discriminant analysis, a distribution map of *T. pseudomaculata* was built showing the absence and presence ranges for the species (Fig. 2c).

- MODIS images

The discriminant analysis identified three variables (DEM, LST-A0D and MxN) with ability to classify correctly 99.5% of all absence sites (384/387 sites) and 78.9% of the presence sites (30/38 sites) (Willk's-Lambda: 0.5805; $F(3, 421) = 101.39$, $p < 0.0001$). The classification functions and the importance rank of variables based on the standardized coefficient are shown in the Table 2. The maximum of the nocturnal land surface temperature (LST-MxN) showed the highest weight, followed by the land elevation (DEM) and the average of the diurnal land surface temperature (LST-A0D). Using the model produced by the discriminant analysis, a distribution map of *T. pseudomaculata* was built showing the absence and presence ranges for the species (Fig. 2d).

***T. wygodzinskyi-T. pseudomaculata* model (Twy-Tps)**

- AVHRR images

The discriminant analysis selected 12 variables (A0 and P1 of AT-; A2, A3, P3 and Vr of NDVI-; A2 and P1 of MIR-; A0 and A2 of VP; Mn of LST and DEM) to classify correctly 97.2% of all absence sites (482/496 points), 87.5% of the *T. wygodzinskyi* presence sites (7/8 sites) and 80.9% of the *T. pseudomaculata* presence sites (17/21 sites) (Willk's- Lambda: 0.4243; $F(24, 1022) = 22.78$, $p < 0.0001$). The classification functions and the importance rank of variables based on the standardized coefficient are shown in the

Table 1. The average of air temperature (AT-A0) and the bi-annual amplitude of the normalized difference vegetation index (NDVI-A2) followed by the minimum land surface temperature (LST-Mn) were the variables with the highest weight to discriminate between presence and absence sites of the species. Using the model produced by the discriminant analysis, a distribution map of both *T. wygodzinskyi* - *T. pseudomaculata* was built showing the absence and presence ranges for both species (Fig. 2e).

- MODIS images

The discriminant analysis selected three variables (DEM, LST-A0D and MxN) to classify correctly 93.3% of all absence sites (369/383 sites), 63.6% of the *T. wygodzinskyi* presence sites (7/11 sites) and 78.9% of the *T. pseudomaculata* presence sites (30/38 sites) (Willk's-Lambda: 0.4693; $F(6, 854) = 65.41$, $p < 0.0001$). The classification functions and the importance rank of variables based on the standardized coefficient are shown in the Table 2. The maximum nocturnal land surface temperature (LST-MxN) showed the highest weight followed by the land elevation (DEM) and the average of the diurnal land surface temperature (LST-A0D). Using the model produced by the discriminant analysis, a distribution map of both *T. wygodzinskyi* - *T. pseudomaculata* was built showing the absence and presence ranges for both species (Fig. 2f).

Discussion

The present work compares for the first time predictive models derived from AVHRR and MODIS imagery in order to identify the potential geographic range of two Chagas disease vectors species. The comparative analysis between the AVHRR and MODIS models showed different abilities to classify correctly the species presence/absence sites. All AVHRR models showed correct classification of presence/absence sites higher than 80%. In the MODIS models, all the correct classification of the presence sites were lower than the corresponding AVHRR models. The worst model used MODIS imagery for *T. wygodzinskyi* and showed only 64% correct classifications (50% would be correctly classified by chance alone). This low performance could be attributed to the fact that the MODIS models did not included the AT and VP variables (only LST and DEM), precisely the variables with highest discrimination power for the presence sites in the AVHRR Twy model. The predictive map derived from the AVHRR and MODIS for the two species case (Twy-Tps model), showed very similar equivalent distributional areas of both species. The most

conspicuous difference was the reduction of the distributional area for *T. pseudomaculata* in the MODIS Twy-Tps prediction map (Fig. 2f).

Compared with the AVHRR data, the better 1x1 km resolution of the MODIS imagery increased the number of presence sites for both species (8 to 11 for *T. wygodzinskyi* and 21 to 38 for *T. pseudomaculata*), but this increment was not significant for the model performance. Contrarily to the expected, higher predictive efficiency of models derived from the MODIS images with finer spatial resolution, our results show higher reliability for the prediction models derived from AVHRR images. This could be related more with the higher number of environmental variables considered in the AVHRR models (56 variables) against the lower number in the MODIS set (9 variables) than with the different spatial resolution of each kind of images. Furthermore, it has to be considered that the temporal AVHRR series (1982/2000) is longer than the temporal MODIS series (2003/2004).

The AVHRR models predict a more extensive geographic distribution for *T. wygodzinskyi* than the currently known presence records. The predicted presence is not restricted only to the Minas Gerais State, but it is also predicted for the States of São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul (Fig 2a). The Twy model classified correctly 100% of the presence and 99.6% of absence sites and it is considered a good predictive model. Five of the nine variables in the discriminant model are elevation and temperature indicators along the “Serra da Mantiqueira” range, over 1000 meters of altitude. A similar geographic distribution study with *T. infestans* also showed the AT as one important variable in the predicted distribution (23). The Tps model derived from AVHRR images shows a predicted geographic distribution coincident with the distributional areas proposed by Carcavallo et al. (10). The Tps model predict the existence of *T. pseudomaculata* in the States of Alagoas, Bahía, Brasília, Ceará, Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Maranhão and Sergipe. Comparing the predicted distribution with the distribution proposed by (10), the model increases the presence of this species to the Espírito Santo State but excludes the State of Mato Grosso do Sul. It is a good predictive model, classifying correctly 85.7 % of the presence and 99.1% of absence sites.

For *T. pseudomaculata*, the variables with highest discrimination value between the presence and absence sites are related to the vegetation (NDVI) and the land surface temperature (LST). These variables were not discriminated in the Twy model. The total number of discriminant variables for each model (9 for Twy, 10 for Tps and 12 for Twy-Tps)

was high when compared with similar studies for *T. infestans* (24), *Rhodnius pallescens*, *R. colombiensis* and *R. ecuadoriensis* (30), where six and seven variables were needed respectively for geographic distribution models that classified correctly >90% of the data points. This greater number of variables suggests that *T. pseudomaculata* is not associated to the studied environmental variables as strongly as *T. wygodzinskyi*. The models obtained do not show an evident sympatric area for the studied species. The absence of a sympatric area and the identification of different environmental variable set to describe the geographic distribution, suggest that the occurrence of these two species is defined by different environmental features at the regional scale. An interesting parallel can be made with the biogeographic provinces of South America proposed by Morrone (8), using panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. Within this biogeographic context, the predicted distribution of *T. pseudomaculata* in our study is mainly associated with the caatinga and cerrado (Fig. 3), the two main Brazilian xerophitic ecosystems. By contrast, the predicted distribution of *T. wygodzinskyi* is associated with the Paraná Forest and the *Araucaria angustifolia* Forest provinces (Fig. 3). The association between *T. wygodzinskyi* occurrence and the “forest” biogeographic provinces is not reflected by the inclusion of the vegetation index in the predicted distribution model, although this could be related with the rupicolous behavior of the species. This microhabitat preference could be responsible for the species survival in areas where the original forest was strongly fragmented or even eliminated. Presence sites included localities with and without forest cover and this is the probable reason of the low influence of the vegetation variables in the prediction of the *T. wygodzinskyi* distribution. This situation does not happen with *T. pseudomaculata*. As *T. pseudomaculata* species is arboricolous in sylvatic ecosystem, the vegetation cover will necessarily affect its distribution, as the absence of vegetation means species absence. Gorla (24) showed that a temporal series of NDVI was a good indicator of the geographic distribution of *T. brasiliensis*. This species is rupicolous in sylvatic habitats, and shows a strong association with the xerophitic environment of the caatinga and cerrado. These two biogeographic areas have a unique vegetational conformation, and it is possible that the remotely sensed vegetation variables reflect the species spatial delimitation and can be considered good indicators for the distribution of the two species.

Although the derived distribution maps for *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi* did not consider important species features such as the dispersal capability, inter-specific competition and micro-environmental conditions, the predicted occurrence areas were

highly congruent with the existing presence data of the two species. This result strongly suggests that the environmental information provided by the remote sensors may be successfully used in predictive studies about the geographical distribution of Chagas disease vectors. The improvement of the reliability of the geographic distribution models will need a validation over the predicted occurrence areas for both species, not studied so far.

Acknowledgments

Special thanks to C.M. Lopes, P. Araújo, J.M.S. Barata, R. Hoffman, G.A. Grande, E. da Rocha, J.P. da Silva and C.M. Neves for their invaluable help and assistance in the fieldwork. To M. Lamfri, M. Scavuzzo and C. Rotela (Gulich Institute, CONAE, Argentina) for the support during the MODIS imagery download. To C.E. Almeida for the provision of geographic coordinates of *T. pseudomaculata* from Paraíba State. To A. Pérez González for the suggestions on an early version of the manuscript. This study received financial support from the Network ECLAT-CDIA, IRD (France) and FIOCRUZ (Brazil). A.L.C.F. has a grant CAPES-I EL Nacional, Brazil. X.P. and D.E.G. are members of “Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas” (CONICET), Argentina.

References

1. Schofield CJ, Dias JCP. The Southern Cone initiative against Chagas disease. *Adv Parasit.* 1998; 42:1-27.
2. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006; 22(12): 583-588.
3. Dias JCP, Diotaiuti L. Triatomíneos e seu controle no Brasil: Perspectivas e desafios. *Cad Saude Publica.* 2000; 6(2):1-126.
4. Dias JCP, Machado EMM, Fernandes AL, Vinhaes MC. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern region, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2000;16 (Suppl 2):13-34.
5. TDR/WHO Seventeenth Programme Report- Progress 2003-2004. Available from <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pr17.htm>. 2005.
6. Souza LC, Frota FCC, Souza JA, Lima JWO. Descrição de um foco urbano de *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), na cidade de Sobral, norte do Ceará. Resultados preliminares. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999; 32: 84-85.

7. Machado de Assis G, Azeredo BVM, Carbajal de la Fuente AL, Doitaiuti L, Lana M. Colonização de ecotopo artificial por *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 em Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Presented at: XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leshmaniose, 2006 November; *Uberaba, Minas Gerais, Brazil*.
8. Morrone J. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annu Rev Entomol.* 2006; 51: 467-494.
9. Carcavallo RU, Martínez A. Biología, ecología y distribución geográfica de los triatominos americanos. In: Carcavallo RU, Rabinovich JE, Tonn RJ, editors. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Buenos Aires: OPS-ECO/MSAS-SNCH; 1985. p 149-208.
10. Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock IA, Galíndez Girón I, Jurberg J, Galvão C, et al. Geographical distribution and alti-latitude dispersion. In: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H, editors. Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas. Rio de Janeiro, Brazil: FIOCRUZ; 1998. p 561-600.
11. Lent H. Novo *Triatoma* no Estado de Minas Gerais (Brasil) (Hemiptera: Reduviidae). *Revista Entomologia.* 1951; 22(1-3): 349-353.
12. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History.* 1979; 163: 127-520.
13. Hypša V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego ROM, Galvão C, Jurberg J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol.* 2002; 23: 447-457.
14. Santos SM, Lopes CM, Dujardin JP, Panzera F, Pérez R, Carbajal de la Fuente AL, et al. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol.* In press 2007. Corrected Proof, Available online 3 February 2007.
15. Lent H, Martins AV. Estudos sobre os triatomídeos de Minas Gerais, com descrição de uma espécie nova. *Revista de Entomologia.* 1940; 11: 877-886.

16. Corrêa RR, Alves UP, Noda J. Nota sobre o *Triatoma arthurneivai*. Seu criadouro extradomiciliar (Hemiptera, Reduviidae). Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais. 1965; 17: 217-232.
17. Forattini OP, Juarez E, Rabello EX. Dados sobre a biologia do *Triatoma arthurneivai* no sudeste do Estado de São Paulo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Rev Saude Publica. 1968; 2: 186-193.
18. Forattini OP, Rabello EX, Pattoli DB. Aspectos ecológicos da tripanossomose Americana. IV- Mobilidade de *Triatoma arthurneivai* em seus ecótopos naturais. Rev Saude Publica. 1972; 6: 183-187.
19. Barretto MP, Ribeiro RD. Estudo sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXXVII. Observações sobre a ecologia do *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940 (Hemiptera, Reduviidae). Revista Brasileira de Biologia. 1981; 41: 317-320.
20. Dias-Lima AG, Menezes D, Sherlock I, Noireau F. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). J Med Entomol. 2003; 40: 989-990.
21. Noireau F, Carbajal de la Fuente AL, Lopes CM, Diotaiuti L. Some considerations about the ecology of Triatominae. An Acad Bras Cienc. 2005; 77: 1-6.
22. Gorla DE. Análisis de la distribución geográfica de Triatominae a escala continental en base a información de variables ambientales. *Unlar Ciencia*. 2001; 2: 2-8.
23. Gorla DE. Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Ecología Austral*. 2002; 12: 117-127.
24. Gorla DE. La reconstrucción de la distribución geográfica de Triatominae en base a información de variables ambientales. Presented at: *Proceedings of the Fourth International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae (ECLAT)*, 2002 Agust. Isla Barú, Colombia, CIMPAT (Univ de los Andes, Colombia), pp 167-173.
25. Gorla DE. Sensores Remotos y Sistemas de Información Geográfica en el estudio de vectores de enfermedades humanas. In: Salomon D, editor. *Actualizaciones en arropodologia sanitaria argentina, Serie Enfermedades Transmisibles*. Buenos Aires, Publicación Monográfica 2; 2002. p 203-211.
26. Dumonteil E, Gourbière S. Predicting *Triatoma dimidiata* Abundance and Infection Rate: A Risk Map for Natural Transmission of Chagas Disease in the Yucatán Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70(5): 514-519.

27. Cecere MC, Vazquez-Prokopec GM, Gürtler R, Kitron U. Spatio-Temporal Analysis of Reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Following Insecticide Spraying in a Rural Community in Northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71 (6): 803-810.
28. Cabrera A, Willink A editors. Biogeografía de América Latina. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Departamento de Asuntos Científicos, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, District of Columbia. 1973. p 1-120.
29. Hay SI, Tatem AJ, Graham AJ, Goetz SJ, Rogers DJ. Global environmental data for mapping infectious disease distribution. *Adv Parasitol.* 2006; 62: 38-79.
30. Gorla DE, Porcasi X, Catalá SS. Sistemas de información geográfica y sensores remotos como herramientas en los programas de control vectorial de la enfermedad de Chagas. Presented at: Memorias del Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas, 2005, May 2-6; Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, p 265-278.

Table 1: Standardized coefficients of the discriminant functions and coefficients of the presence/ absences classifications sites for each AVHRR model. SC= Standardized Coefficients; AF= Absent function; PF= Presence function; AT= Air Temperature; VP= Vapor Pressure deficit; NDVI= Normalized Difference Vegetation Index; LST= Land Surface Temperature; MIR= Mean of the Infrared Radiation; DEM= land elevation. A0= Average; A1, A2 and A3= Amplitudes of the 1, 2, 3-annual cycles; P1, P3= phase of 1, 3-annual cycles; Vr= Variance; Mn= minimum. *Variables weight.

Variable	Statistic	Twy model			Tps model			Twy-Tps model			
		SC	AF	PF	SC	AF	PF	SC	AF	PF (Twy)	PF (Tps)
AT	A0	-2.4406***	104.3087	103.8041	-0.2525	-0.8616	-0.8917	-0.5373*	73.3616	73.0576	73.2016
	P1	0.4215	-0.6096	-0.5608	-	-	-	-0.3286	-3.6850	-3.6395	-3.7197
	P3	0.3255	6.5542	6.6856	-	-	-	-	-	-	-
	Vr	-1.5905**	112.5461	112.0063	-	-	-	-	-	-	-
VP	A0	0.8257	-2.2852	-2.2798	-	-	-	0.3243	-1.5097	-1.5054	-1.5068
	A1	0.9072*	0.0758	0.0838	-	-	-	-	-	-	-
	A2	-	-	-	0.4256	-0.6551	-0.6364	0.4013	-0.5383	-0.5324	-0.5201
	Vr	0.8603	-7.6011	-7.5734	-	-	-	-	-	-	-
NDVI	A1	-	-	-	-0.6202	-2.8667	-2.9795	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-1.0380**	1.7393	1.4084	-0.7934**	-6.6539	-6.6243	-6.8982
	A3	-	-	-	-	-	-	0.2821	3.7671	3.6670	3.9350
	P1	-	-	-	-0.5176	0.6131	0.3842	-	-	-	-
	P3	-	-	-	0.3833	2.5140	2.7744	0.4109	3.7751	3.7714	4.0498
	Vr	-	-	-	1.0708** *	0.1220	0.2312	0.4470	0.5868	0.5811	0.6321
LST	A0	-	-	-	-0.4229	8.1189	8.0375	-	-	-	-
	Mn	-	-	-	0.9476*	0.0833	0.2258	0.8982***	-19.7272	-19.6714	-19.5888
MIR	A2	-	-	-	0.4558	1.5685	2.1752	0.3086	37.8825	37.5940	38.2524
	P1	-	-	-	-	-	-	0.3437	9.9216	9.9054	10.0070
	Mn	0.4962	-5.7836	-5.7005	-	-	-	-	-	-	-
DEM		0.1876	2.2183	2.2216	-	-	-	-0.0026	0.7474	0.7575	0.7483
Constant		-	-148729.6719	-147473.1406	-	-12480.2002	-12671.9893	-	-80841.1719	-80107.1484	-80812.0703

Table 2: Standardized coefficients of the discriminant functions and coefficients of the presence/ absences classifications sites for each MODIS model. SC= Standardized Coefficients; AF= Absent function; PF= Presence function; AOD= Diurnal Average; MnD= Minimum Diurnal; MxN= Maximum Nocturnal; DEM= land elevation.

Variable	Statistic	Twy model			Tps model			Twy- Tps model			
		SC	AF	PF	SC	AF	PF	SC	AF	PF (Twy)	PF (Tps)
LST	AOD	-0.3615	3.5680	3.1995	-0.4992	34.052	4.004	-0.5178	3.4383	3.0000	4.0400
	MnD	-0.2009	0.2315	0.0948	-	-	-	-	-	-	-
	MxN	-	-	-	-1.0415	8.8724	10.3094	-1.0136	8.9740	9.3816	10.4289
DEM		0.8541	0.0095	0.0193	-0.7807	0.0641	0.0735	-0.7008	0.0647	0.0785	0.0743
	Constant	-	-58.2271	-56.6870	-	-160.8798	-220.6814	-	-162.6489	-223.0338	-172.7599

Figure captions

Fig. 1: Map showing the collecting sites: 1= Sobral, CE; 2= Bom Jesús, PB; 3= Curaçá, BA; 4= Itaberaba, BA; 5= Senhor do Bom Fim, BA; 6= Peixe, TO; 7= Itaobim, MG; 8= Santa Rita de Caldas, MG; 9= Vargem Grande do Sul, SP; 10= Ituparanga, SP; CE= Ceará State; PB= Paraíba State; BA= Bahia State; MG= Minas Gerais State; SP= São Paulo State.

Fig. 2: Presence and absence areas of *Triatoma wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* for each three models proposed: Twy (a, b), Tps (c, d) and Twy-Tps (e, f). The areas were predicted analyzing AVHRR (a, c, e) and MODIS (b, d, f) images. The known distribution of *T. wygodzinskyi* (after Carcavallo et al., 1997 and Forattini et al., 1972) is represented by a black polygon (a, b). The known distribution of *T. pseudomaculata* (after Carcavallo et al., 1997) is represented by a white polygon (a, b).

Fig. 3: Predicted distribution of *T. wygodzinskyi* and *T. pseudomaculata* (AVHRR images, Twy-Tps model) in the context of Morrone (2006) biogeographic provinces. Ca= caatinga, Ce= cerrado, PF= Paraná forest, AaF= *Araucaria angustifolia* forest.



Fig. 1

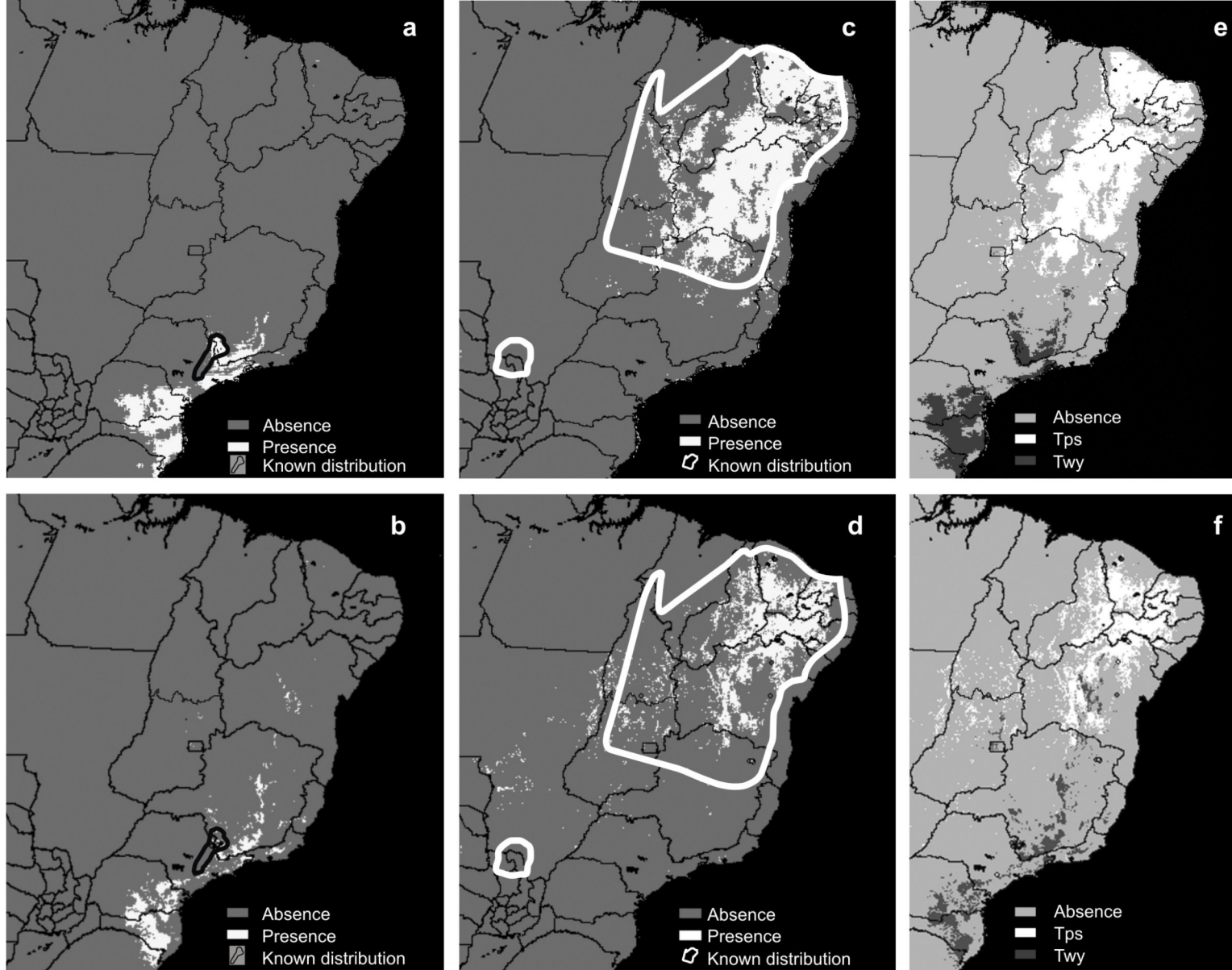


Fig. 2



Fig. 3

5.5. Quinto manuscrito

Publicado em: Acta Tropica

Cita: Carbajal de la Fuente, A.L., S.A. Minoli, C.M. Lopes, F. Noireau, C.R. Lazzari and M.G. Lorenzo. 2007. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera: Reduviidae) in north-eastern Brazil. Acta Trop. 101 (2): 115-119.

Title: Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in north-eastern Brazil

Carbajal de la Fuente, Ana L.^{1*}✉, Minoli, Sebastián A.^{2,3*}, Lopes, Catarina M.¹, Noireau, François⁴, Lazzari, Claudio R.³ and Lorenzo, Marcelo G.⁵

*Authors with an equal contribution to this work.

¹ Depto. de Entomologia. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

² Laboratorio de Fisiología de Insectos, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

³ Institut de Recherche sur la Biologie de l’Insecte, Université François, Rabelais, UMR CNRS 6035, Tours, France.

⁴ Institut de Recherche pour le Developpement (IRD), UR016, Montpellier, France.

⁵ Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brazil.

✉ *To whom all correspondence should be addressed.*

Ana Laura Carbajal de la Fuente, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Avenida Brasil 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ. Brazil.

e-mail: carbajal@ioc.fiocruz.br, Tel.: +55 21 – 25 98 43 20, Fax: +55 21 – 25 73 44 68

Abstract

The present paper reports for the first time the capture of wild *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* by means of light-traps in Brazil. We tested commercially available lighting devices powered by batteries to attract the bugs to a white piece of cloth in the field. Two main findings showed to be significant: first, the results presented here show that light traps can be used for sampling these species in wild environments; second, they reveal that house colonization by triatomines may also happen as a consequence of the arrival of flying sylvatic bugs guided by artificial light sources. In addition, we discuss the effect of some environmental and biological factors on triatomine flight activity modulation.

Key words: Light traps; Flight; Sampling; Northeastern Brazil.

Introduction

Triatomine bugs are vectors of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, the etiological agent of Chagas disease. Currently, approximately 120 million people are exposed to infection in Latin America and 16-18 million are effectively infected with this parasite (TDR, 2002). There are more than 130 species of triatomine bugs described, and most of them feed on endothermic animals. Some of these species are closely related to human dwellings, and, therefore, they become epidemiologically important to man. On the other hand, most triatomines species are strictly sylvatic, almost with no contact with humans. Between these two opposite situations, there is a continuous gradient for other species sharing features of both groups (Schofield, 1994). This is the case of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, the two main vector species found in north-eastern Brazil. *T. brasiliensis* is typically found in rock piles, in association with mammals and reptiles, and *T. pseudomaculata* is commonly found inhabiting hollow trees associated with birds (Carcavallo et al., 2000; Dias-Lima et al., 2003).

The predominant landscape in our study area is the "caatinga", characterized by the presence of the catingueira tree (*Caesalpinia pyramidalis*) in the northeastern Brazilian region. This dominant vegetal species is distributed in rocky mountain ranges sparsely emerging from flat areas. Two different weather patterns can be described for this region: a remarkably hot and dry climate, that extends from May to the beginning of

December; and intermittent rains throughout the rest of the year. As a consequence, there are many differences regarding foliage abundance and, therefore, host availability for the insects. As for the two Chagas disease vectors under study, *T. brasiliensis* is mostly found in the rocky mountain ranges, while *T. pseudomaculata* is more abundant in the flat areas of “caatinga”.

Flight is one of the main mechanisms involved in long-distance movements in insects. The dispersal of either food or mate may be considered as the fundamental phenomena that induce them to fly. Nutritional (Lehane et al., 1992, McEwen and Lehane, 1993) and reproductive (McEwen and Lehane, 1994) status, as well as population density (McEwen et al., 1993) and environmental conditions, such as temperature (Lehane et al., 1992, Schofield et al., 1992), are factors known to modulate the flight activity in triatomines. Although triatomines are predominantly walking insects, colonization of new habitats seems to occur by flight and/or by passive dispersal (Forattini, 1979). Flight may be an important factor to colonization of new houses not only by domiciliated species but also by wild species. Light could make human dwellings more attractive to these bugs, but few reports on light-traps captures have supported this presumption (Tonn et al., 1978, Schweigmann et al., 1988, Wisnivesky-Colli et al., 1993, Noireau and Dujardin, 2001, Vazquez-Prokopec et al., 2004).

In this work, we analyzed whether *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* can be captured in the field using light traps.

Material and Methods

The collecting area is located near Curaçá, Bahia State (S 8°57' W 39°49'; 500 m.a.s.l.), northeastern Brazil, in the caatinga region. In this area, natural colonies of both *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* had been previously found by Dias-Lima et al. (2003). A number of 15 light traps were set at two different sylvatic locations: a plain zone with arboreal vegetation (site a: 9 traps) and; a pile of rocks on a foothill (site b: 6 traps). One light trap was operated during 15 nights in three different periods (November 2001, November 2003 and May 2004, see Table).

Two different battery-powered lighting devices were used: i) an ATOMLUX 2050 Solar Design for four nights (2001 campaign) and; ii) a Coleman 5359 Series (lamp HF/ED π .13 Watts/6500K°) for 11 nights (2003 and 2004 campaign). The trap arrangement consisted of two pieces of white cloth (3 x 2 m), one vertically extended

and the other laid on the ground in order to prevent specimens from falling onto the ground when flying against the vertical cloth. The trap system was illuminated by the lighting device set one meter away from the cloth and one meter above ground. The whole device was mounted in daylight and the lights were turned on thirty minutes before sunset. If there was no triatomine captures after a period of approximately one hour, traps were inactivated, i.e., lights were turned off.

All the triatomines that flew into or around the trap were caught with a forceps and collected in vials. Upon arriving in the laboratory, the species and sex of each individual were identified and recorded. Daily prevailing weather conditions during the sampling period were noted down, as well as the presence or absence of moonlight. Wind intensity was evaluated visually. A lack of movement of the trap cloths and the leaves in the surrounding vegetation was considered as "no wind". An intermediate situation was that in which the cloths and leaves moved slightly. For a single night, in which the cloths were permanently inflated by the predominant air current, strong wind conditions were recorded.

Results

Triatomines reached light traps in 73% of the nights (11/15). The table shows the total number of captures, dates, sites, species and sex. *T. pseudomaculata* showed to be the most predominant bug species collected and *T. brasiliensis* represented one third (8/24) of the total number captured bugs. Additionally, a *Panstrongylus lutzi* male specimen was captured. No significant differences were observed concerning the sex ratio of the collected insects belonging to both species (Table). Differences were observed between the number of captures performed during the dry (November 2001, 2003) and humid (May 2004) seasons. More insects were collected during the former (1.9 insects/night) than during the later (1 insect/night). According to our visual evaluation, all the triatomines collected showed to have flat abdomens characteristic of a fasting status.

The sites chosen for setting up the traps affected the ratio of species captured (Table, Figure). When traps were laid on the plain caatinga, most triatomines captured were *T. pseudomaculata*, whereas *T. brasiliensis* was found in a higher proportion on the foothill.

Discussion

Our data suggest that *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* are attracted by light. Thus, light traps can be used for sampling purposes, allowing the capture of live wild triatomines for laboratory study. The frequency of arrivals observed with these triatomine species was similar to that reported by Noireau et al. (2000) using light traps for capturing Triatominae. On the other hand, captures were scarce if compared with those of *Triatoma protracta*, *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana* in other studies (Sjogren and Ryckman, 1966, Noireau and Dujardin, 2001).

The arrival of wild triatomine adults to our light-trap suggests that light sources may enable bugs to colonize dwellings. If houses with artificial light were located at such capturing sites in the caatinga, one could expect that approximately 1.7 triatomines would reach these houses every night (88% being *T. pseudomaculata*). Because the sampling sites were located at least two km away from the nearest dwellings, it is likely that the insects captured were sylvatic. All of them were apparently in a fasting status, and *T. brasiliensis*, particularly, seemed to be very active at the time of their capture and motivated for feeding (they spontaneously extended their proboscis when captured).

The Triatominae fauna of the surrounding areas, where light trap surveys were carried out, was studied by Dias-Lima et al. (2003), showing that out of 58 trees investigated by means of live bait traps, 43.1% were positive for *T. pseudomaculata* and none for *T. brasiliensis*, which was the prevailing species found among rocks. One adult specimen of *P. lutzii* was also collected in a rocky shelter. Our results confirm that each species prefers different sylvatic habitats (see Figure). Because the two different collection habitats were approximately 500 meters apart and presented an altitude difference of approximately 60 meters, we suggest that the effective range of light traps is a few hundred meters away from the actual collection sites. This resembles the results obtained by Vazquez-Prokopec et al. (2004) with *Triatoma infestans*.

Some literature data (McEwen and Lehane, 1994, Lehane et al., 1992) suggest that the active process of colonization occurs by flying gravid starved females. Our survey suggests that both males and females of the species under study are equally motivated to approach light sources, as recently showed by Minoli and Lazzari (2006) in laboratory assays conducted with *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus*. The arrival of individuals of both sexes to houses as a response to light sources would facilitate the establishment of new domestic colonies.

The light trap success in collecting bugs during the two different survey periods (dry season, November, and humid season, April) contrasts with the collecting results by dissection of dead trunks when performed simultaneously (Carbajal de la Fuente et al., in prep). The proportion of *T. pseudomaculata* adults collected in the trunks in November was lower compared to that observed in April. A low number of adults and small nymphs are normally captured during the dry season through habitat dissection, but figures change drastically as many well fed larger nymphs and adults are found inside tree-logs during the wet season. This dramatic difference with the captures of flying adults may mirror a modification of the nutritional status of insects between these two opposite environments. Therefore, our data may indicate that adult triatomines can fly more frequently in search for food sources during the dry season.

This work contributes to understand the dispersal mechanisms used by two epidemiologically important triatomine bugs, demonstrating that they can disperse by flight. Moreover, it shows that light from dwellings affects the orientation of these bugs during flight. We show here that *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* are able to actively invade human houses with light sources. Finally, this report presents relevant information for Chagas disease control programs and scientists studying these triatomines, since it demonstrates that light traps can be employed as adult sampling/monitoring tools in this region.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Liléia Diotaiuti for supporting field work by S. Minoli. We are indebted to the anonymous referees for help to improve the manuscript. This investigation received financial support from the IRD, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), CONICET, Universidad de Buenos Aires and FIOCRUZ. A.L.C.F by scholarship from the program CAPES/CNPq - IEL Nacional, Brazil.

References

- Carcavallo, R.U., Giron, I.G., Jurberg, J., Lent, H.; 2000. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. In: Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Vol. 2 pp. 561-600
- Dias-Lima, A.G., Menezes, D., Sherlock, I. and Noireau, F.; 2003. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). J. Med. Entomol. 40, 989-990.
- Forattini, O.P, Ferreira, O.A., Silva, E.O and Rabello, E.X.; 1979. Aspectos ecológicos da tripanossomiose americana. XV – Desenvolvimento, variação e permanência de *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus* em ecótopos artificiais. Rev. Saúde Pub. 13, 220-231.
- Lehane, M.J., McEwen, P.K., Whitaker, C.J. and Schofield, C.J.; 1992. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. Acta Tropica 52, 27-38.
- McEwen, P.K. and Lehane, M.J.; 1993. Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). Insect Sci. Applic. 14, 321-325.
- McEwen, P.K. and Lehane, M.J.; 1994. Relationship between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera., Reduviidae). J. Appl. Ent. 117, 217-223.
- McEwen, P.K., Lehane, M.J. and Whitaker, C.J. ;1993. The effect of population density on flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). J. Appl. Ent. 116, 321-325.
- Minoli, S. and Lazzari, C.; 2006. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. Acta Tropica 97, 324-330.
- Noireau, F. and Dujardin, J.P.; 2001. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96, 385-389.
- Noireau, F., Flores, R., Gutierrez, T., Abad-Franch, F., Flores, E. and Vargas, F.; 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other wild triatomines in the Bolivian Chaco. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94, 23-27.
- Schofield, C.J.; 1994. *Triatominae: biology and control*. In: Eurocommunica Publications (Ed)., West Sussex, U.K., pp. 80 pp.

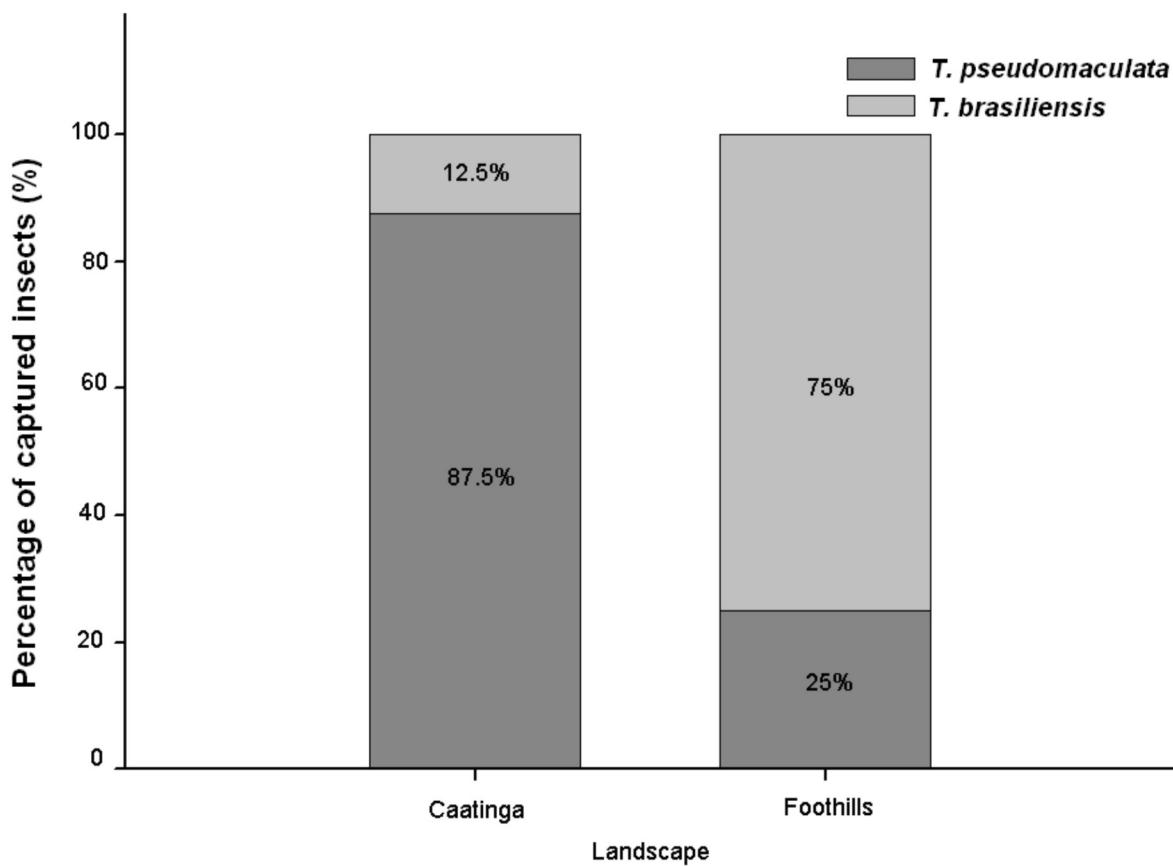
- Schofield, C.J., Lehane, M.J., McEwen, P.K., Catala, S.S. and Gorla D.E.; 1992. Dispersive flight by *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. Med. Vet. Entomol. 6, 51-56.
- Schweigmann, N.J., Vallvé, S.L., Muscio, O., Ghillini, M., Alberti, A. and Wisnivesky-Colli C.; 1988. Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. Med. Vet. Entomol. 2, 401-404.
- Sjogren, R.D. and Ryckman, R.E.; 1966. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North America. . Nocturnal flights of *Triatoma protracta* (Uhler) as indicated by collections at black light traps (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J. Med. Entomol. 3, 81-92.
- TDR; 2002. site: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf>.
- Tonn, R.J., Espínola, H., Mora, E. and Jiménez J.E.; 1978. Trampa de luz negra como método de captura nocturna de triatominos en Venezuela. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental. 18, 25-30.
- Vazquez-Prokopec, G.M., Ceballos, L.A., Kitron, U. and Gürtler, R.E.; 2004. Active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural northwestern Argentina. J. Med. Entomol. 41, 614-621.
- Wisnivesky-Colli C., Gurtler R.E., Solarz N.D., Schweigmann N.J., Pietrokovky S.M., Alberti A., Flo J.; 1993. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88, 27-32.

Table: Triatomines captured by means of battery-powered light traps in Curaçá, Bahía State, Brazil. Insects were collected in wild environments during November 2001, November 2003 and April 2004. Capture sites corresponding to a) “caatinga” plain; b) rock piles on ridges of foothills. * a male of *Panstrongylus lutzi* was captured.

Date	Site	<i>Triatoma brasiliensis</i>		<i>T. pseudomaculata</i>		Wind	Moon
		Males	Females	Males	Females		
November 2001	b	2	1		1	weak	no
	b	-	1	-	-	weak	no
	b	-	-	-	-	strong	no
	b	1	1	-	1	weak	no
November 2003	a	-	-	-	-	none	no
	a	1	-	2	1	weak	no
	a	-	-	1	1	intermediate	no
	a	-	-	1	-	none	no
	a	-	-	1	1	intermediate	no
	a	-	-	-	2	weak	no
April 2004	a	-	-	-	1	intermediate	no
	a	-	-	-	1	intermediate	no
	b*	-	-	-	-	strong	no
	a	1	-	2	-	weak	cloudy
	b	-	-	-	-	weak	yes
Total		5	3	7	9		

Figure caption

Figure 1: Percentage of triatomines of each species captured with light traps at each of the two wild environments of Curaçá, Bahía State, Brazil.



5.6. Sexto manuscrito

Title: *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma juazeirensis* (Hemiptera: Reduviidae):
Behavioural Plasticity Related to Habitat Selection in Different Environments

ANA LAURA CARBAJAL DE LA FUENTE¹, ARTUR DIAS-LIMA², CATARINA MACEDO LOPES¹, LAURE EMPERAIRE³, ANNIE WALTER³, AGENOR FERREIRA⁴, ITALO SHERLOCK² AND FRANÇOIS NOIREAU^{3,5}

¹Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

²Laboratório de Parasitologia e Entomologia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, BA, Brasil,

³Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Montpellier, France,

⁴Secretaria de Saúde, Curaçá, BA, Brasil, ⁵Facultad de Medicina, Universidad Mayor San Simon, P.O. Box 4866, Cochabamba, Bolivia.

✉ *Corresponding author:*

Ana Laura Carbajal de la Fuente, Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Avenida Brasil 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro, RJ. Brazil.

e-mail: carbajal@ioc.fiocruz.br, Tel.: +55 21 – 25 98 43 20, Fax: +55 21 – 25 73 44 68

ABSTRACT

Triatoma pseudomaculata Corrêa and Espínola, 1964 and *Triatoma juazeirensis* Costa and Felix, 2007 (= *T. brasiliensis* Neiva, 1911 [part]), are sylvatic vectors of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), the causative agent of Chagas disease, in northeast Brazil – especially in the caatinga region. In an area of caatinga in the State of Bahia, we compared the wild and peridomestic habitats of these two species of Triatominae in order to assess their behavioural plasticity in relation to habitat selection in different environments. In the sylvatic environment, the habitat of these two species is never shared. *T. pseudomaculata* is found in trees and bird nests, but without apparent preference for any particular tree species. By contrast, *T. juazeirensis* is exclusively rupicolous (found amongst rocks). Both species invade peridomestic structures, but do not display significant ability to colonize human dwellings. In the peridomestic area, they are highly adaptable to different habitats and can occupy substrates that they do not colonize in sylvatic environment. This behavioural plasticity seems to be more striking in *T. juazeirensis* – rupicolous in sylvatic environments, but colonising wooden structures in the peridomicile in more than 80% of cases.

KEY WORD: *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma juazeirensis*, sylvatic environment, peridomicile, Brazil.

Introduction

In many Southern Cone regions, autochthonous species of Triatominae, originally restricted to a wild environment, are increasingly reported to invade human dwellings and peridomestic structures where they might act as vectors of *Trypanosoma cruzi*, causative agent of Chagas disease. This is the case for *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, and *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, both native of

xerophitic ecosystems in northeastern Brasil. Their geographical ranges overlap in the State of Bahia, and both are reported to invade and colonize man-made structures, mainly the peridomicile (Silveira & Vinhaes, 1998; Dias *et al.*, 2000).

T. pseudomaculata often invades peridomestic structures but does not display a significant ability to colonize human dwellings, even though large domestic colonies have been reported in urban areas of Sobral, Ceará (Souza *et al.*, 1999) and Berilo, Minas Gerais (Assis *et al.*, 2006). Reports on its sylvatic habitat are scarce. According to Barretto (1967), *T. pseudomaculata* occurs in hollow trees and rock cavities where it feeds on rodents and marsupials.

By contrast, *T. brasiliensis* seems to represent at least four forms constituting the *T. brasiliensis* species complex (Costa, 1999; Monteiro *et al.*, 2004). One of these, found in the State of Bahia, was recently described as *T. juazeirensis* Costa & Felix, 2007. However, Costa (1999) and Costa *et al.* (2003) suggested that the northern population (*brasiliensis* s.s.) would be most important epidemiologically, because of its widespread distribution (Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí and Rio Grande do Norte), highest *T. cruzi* infection rate (15%) and the ability to colonize domestic ecotopes.

The objective of the present work was to compare the wild and peridomestic habitats of *T. pseudomaculata* and *T. juazeirensis*, in order to assess their behavioural plasticity as related to habitat selection in different environments, and to understand their natural ecology in relation to their process of domestication.

Material and methods

Study area

Curaçá (287 masl; 08°58'S, 39°53'W) is a rural district of Bahia State, Brazil. It is located near the São Francisco River, in a region of caatinga, a set of xerophytic formations located in Northeast Brazil and characterized by the fall of leaves during the dry season and the abundance of cacti and bromeliads (Forattini, 1980; Emperaire, 1986). The climate is semiarid and presents two seasons: dry from April to October, and rainy from November to March. Mean temperatures range between 24°C and 29°C, and the mean annual precipitation is 300 mm. The sylvatic environment investigated displays a diversity of flora associated with the range of human intervention. It is covered by scattered or dense vegetation (elevation 3-6 m) dominated by *Caesalpinia pyramidalis* Tul, locally known as “catingueira”. Thorn shrubs, cacti, and bromeliads predominate at the lowest strata. In places, the plain overlaps with large rocky formations consisting of quartzite, and the elevation is generally lower than 100 meters. Rural houses tend to be isolated, but sometimes grouped in small settlements. Houses are made of brick or mud. The peridomestic structures are often extensive, and usually include various animal enclosures fenced in with sticks, shelters for chickens, material for building (tiles and bricks) and woodpiles. Some trees, in which chickens frequently roost, are located in the peridomestic area. Natural rockpiles are often close to the houses. The main activity of the human population is livestock farming (principally goats and sheep); during the dry season, livestock are usually allowed to roam throughout the surrounding areas, but during the wet season they are kept in enclosures at night.

Collection of triatomines in sylvatic environments

Insect collections were carried out from 2001 to 2004 during the dry and rainy seasons. Various potential habitats were searched for the presence of Triatominae in sylvatic areas in the Curaçá district. Mouse-baited Noireau traps (Noireau *et al.*, 1999) were used to capture insects living in hollow trees and rocks. Some birdnests, built principally by Dendrocolaptidae and Furnariidae and located in cactus “mandacaru” (*Cereus jamacaru* DC) or any tree, were also dissected.

Collection of triatomines in peridomestic-domestic environments

In June and July 2003, 58 domiciliary units (DU, constituted by the intradomicile and the peridomicile) were investigated. They were randomly selected from a wider sample of 136 houses previously mapped and studied (Walter *et al.*, 2005). All potential vector habitats were located on a map and described according to a standardized questionnaire. A 2-3 hour search for bugs was conducted in and around the domicile by two inspectors. The peridomestic area was defined as all natural or artificial structures used more or less daily by farmers or domestic animals, without the limitation of distance from the house. Inside this area, all potential habitats for Triatominae were examined. They were classified according to substrate: baked clay for construction material (tile and brick) and wood, including stick fences, trees and bird-nests. Animals present in domiciliary units were noted.

Processing of insects

Triatominae were placed in labelled plastic bags according to the capture site and transported to the laboratory. Species were identified according to Lent and

Wygodzinsky (1979) and, for *T. brasiliensis*, according to the chromatic patterns described by Costa *et al.* (1997).

Statistical analysis

Chi-square (χ^2) test with Yates correction was used to compare distributions between several categories. Mann-Whitney non-parametric test was used to compare median values from different categories.

Results

Wild environments

From a total of 599 trees investigated, 129 (21.5%) were infested with Triatominae. *T. pseudomaculata* was the only species collected, and was mainly represented by nymphs (95.0% of 222 Triatominae collected). Triatomine burden per positive tree was very low (medians equal to 1 or 2). Some of the investigated trees were taxonomically identified. Infestation rate of *T. pseudomaculata* according to the tree species is shown in the Figure. All tree species were found infested when several (≥ 10) were investigated, and their infestation rates were not significantly different (χ^2 test $df=8$, $P=0.38$). In *C. pyramidalis*, the most common species in the region, the *T. pseudomaculata* infestation rate detected by trapping was 23.3%.

We also searched for Triatominae in nests or shelters of small mammals located between or under the rocks. From a total of 307 traps placed in rocky ecotopes, 59 (19.2%) collected Triatominae. Except for one adult *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923), *T. juazeirensis* was the only species collected from amongst rocks, and, as with *T. pseudomaculata*, most were nymphal stages (100/103).

We dissected 66 birdnests located in “mandacaru” cactus or in trees. In these, *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (n=66) was more frequently found than *T. pseudomaculata* (n=38) in nests built in mandacaru (19% and 38% of the 21 nests were positive for each species, respectively). The 45 birdnests in trees showed similar infestation rates with *T. pseudomaculata* and *Psammolestes tertius* Lent and Jurberg, 1965 (13.3% vs. 11.1%, respectively). None of these Triatominae captured in sylvatic environments was infected with *T. cruzi*.

Peridomestic environments

From a total of 576 triatomine bugs collected in peridomestic structures, 408 were *T. juazeirensis* (155 adults and 253 nymphs) and 168 were *T. pseudomaculata* (42 adults and 126 nymphs). Some specimens of *P. tertius* (n=33) and *R. neglectus* (n=6) were also collected in birdnests from trees located in the peridomestic area. None of the collected Triatominae was infected with *T. cruzi*. From 58 peridomiciles investigated, 42 (72.4%) were positive for triatomine bugs. *T. juazeirensis* was found in 30 (51.7%), *T. pseudomaculata* in 31 (53.4%), *P. tertius* in 8 (13.8%), and *R. neglectus* in 5 (8.6%) of the peridomestic areas. From a total of 489 potential peridomestic habitats investigated, 108 (22.1%) were positive for Triatominae. Fifteen positive ecotopes (two chicken coops and 13 corrals) contained both species (13.8%). The comparative distribution and abundance of *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata* in peridomestic ecotopes are shown in Table 1. *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata* showed similar infestation rates in all ecotopes surveyed (χ^2 test df=1, $P>0.05$). Both species were found in all ecotopes, except for birdnests where *T. juazeirensis* was absent. A dismember χ^2 test applied to *T. juazeirensis* showed two groups of ecotopes

with significantly different proportions of infestation ($P < 0.05$): corrals and roofed corrals vs. the remaining ecotopes. For *T. pseudomaculata*, two groups of ecotopes were significantly different: corrals, artificial chicken coops, fowl trees and bird nest vs. the remaining ones ($P < 0.05$). Concerning the median catches for each species, the only significant difference between species was found for corrals where the *T. juazeirensis* colonies were larger (Mann-Whitney test $df=1$, $P=0.01$). Stick fences, fowl trees and piles of bricks were the ecotopes with the largest *T. juazeirensis* colonies, whereas only the pile of tiles had a high apparent density of *T. pseudomaculata*.

A total of 348 ecotopes associated with domestic animals were surveyed. The comparative distribution and abundance of *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata* as related to the animal host are shown in Table 2. Both species showed similar qualitative and quantitative association with all animals except the goat. Colonies of *T. juazeirensis* were larger than those of the other vector in ecotopes related to goat (Mann-Whitney test $df=1$, $P=0.01$). A dismember χ^2 test applied to *T. juazeirensis* showed two groups of animals according to their association with the vector: pig, cow and goat vs. the remaining animals ($P < 0.05$; Table 2). On the other hand, no animal or group of animals was significantly more associated with *T. pseudomaculata*. The relationship between the presence of both triatomine species and the material forming the peridomestic structures is shown in Table 3. Three sorts of material were considered: wood, baked clay (tiles and bricks), and a mixture of both. *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata* showed similar infestation rates regardless of the material (χ^2 test $df=1$, $P > 0.05$). In contrast, colonies of *T. juazeirensis* were larger in wood than those of *T. pseudomaculata* (Mann-Whitney test $df=1$, $P=0.04$).

Table 4 shows comparative habitat associations of *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata*, in the different environments. In peridomestic environments, *T. juazeirensis* was mainly associated with wood ecotopes, whereas, in a sylvatic environment, it was never found associated with such ecotopes. Conversely, *T. pseudomaculata* was less associated with wood in the peridomestic environments (χ^2 test $df=1$, $P<0.001$).

Domestic environments

Sixteen of the 58 houses (27.6%) contained indoor Triatominae. From a total of 17 triatomine bugs collected indoors, 14 were *T. juazeirensis* (all adults), whereas the remaining two were *T. pseudomaculata* (one adult) and *P. lutzi* (one adult). None of the collected triatomines was infected with *T. cruzi*.

Discussion

T. juazeirensis and *T. pseudomaculata* are native species of the caatinga. Both species are considered to be Chagas disease vectors of regional importance (Silveira & Vinhaes, 1998; Dias *et al.*, 2000; Diotaiuti *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2003).

Our observations on the occurrence and abundance of *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata* in sylvatic environments were based on trapping. The baited trap used has proved to be effective for detecting Triatominae in terrestrial and arboreal habitats (Noireau *et al.*, 2002). Nevertheless, because the trapping system is likely to attract and capture starved bugs, it presents a quantitative and qualitative bias. So, the detection of triatomines depends on the occurrence/abundance of blood resources. Moreover, the observed stage structure of the population may be biased. In contrast to nymphal

instars, adults are able to disperse by flight until they find a blood source. This probably explains the small number of adults captured by our trapping system. Nevertheless, our results clearly show isolation between *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata* in sylvatic environments. *T. juazeirensis*, as well as the other melanic forms of the *T. brasiliensis* complex, is exclusively found in rocky habitats (Costa *et al.*, 1998; Dias-Lima *et al.*, 2003). On the other hand, *T. pseudomaculata* is an arboricolous species, found in hollow trees and bird nests. With regard to this species, our results disagree with previous work that also reported the occurrence of *T. pseudomaculata* in rock cavities (Barretto, 1967). In relation to its propensity for colonizing a particular tree, *T. pseudomaculata* does not exhibit a restricted association with one (or some) tree species. It can be found in any tree of the caatinga, including the predominant species *C. pyramidalis*. *T. pseudomaculata*, *P. tertius* and *R. neglectus* were the three species collected in birdnests. As pointed out by Dias-Lima *et al.* (2003) and Emperaire & Romaña (2006), an association exists between the cactus *Cereus jamacaru* in peridomestic environments and the occurrence of bird nests infested with *R. neglectus*.

Study of the dispersal flight of *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata* showed that light affects the orientation of bugs, which can actively invade human dwelling containing a light source (Carbajal de la Fuente *et al.*, 2007). Once in the peridomicile, both species invade and colonize different ecotopes, with the exception of birdnests mainly occupied by Furnariidae, where *T. juazeirensis* is never found. However, both species showed a marked preference for structures made of wood. This observation differs from Sarquis *et al.* (2006) who suggested that in Ceará, *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* tend to colonize peridomestic ecotopes similar to their original habitat. We found a significant association between the structures frequented by goats (principally corrals) and the occurrence of *T. juazeirensis*. Walter *et al.* (2005) had

previously pointed out such an association. The fact that goats climb and rest on the rocky formations, which provide hiding places for *T. juazeirensis*, suggests a close association with goats in the sylvatic environment, and suggest a possible mechanism for passive transportation of *T.juazeirensis* to peridomestic structures.

Our results also suggest behavioural plasticity both in *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata*, that allows occupation of peridomestic materials that they do not colonize in sylvatic environments. This plasticity seems more marked in *T. juazeirensis*, which leaves a rupicolous habitat in sylvatic environments for colonizing, in the peridomicile, wood material in more than 80% of cases.

Records based on domiciliary captures of *T. brasiliensis s.l.* in the different states of northeast Brazil emphasize that Ceará, Paraíba and Piauí are the States where indexes of colonization are the highest (Costa *et al.*, 2003). However, the form found in these three states is *T. brasiliensis s.s.* (Costa *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2004). By contrast, the epidemiological role of *T. juazeirensis*, which occurs in a more restricted ecological zone than *T. brasiliensis s.s.* (Costa *et al.*, 2002), is questionable. Our survey shows that this species, as well as *T. pseudomaculata*, is not commonly found entering human dwellings and is not infected with *T. cruzi*. Nevertheless, considering their high prevalence in peridomestic premises and high potential to repopulate treated habitats from neighbouring sylvatic populations, both triatomine species must be considered as vector candidates and targets for continuing vigilance (Diotaiuti *et al.*, 2000).

Acknowledgements

We are indebted to the anonymous referees for help to improve the manuscript and to Dr C.J. Schofield for English review. This study received financial support from the UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical

Diseases (grant A00206), IRD (France), FIOCRUZ, CNPq and CAPES (Brazil), and benefited from international collaboration through the ECLAT network. Paulo Evangelista de Araújo and Glauber gave invaluable assistance in the fieldwork. Special thanks to L. Diotaiuti and P. Cabello for reviewing the text and statistics.

References

- Assis, G. M., B. Azeredo, A. L. Carbajal de la Fuente, L. Diotaiuti, and M. Lana. 2006.** Colonia intradomiciliar de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil, pp 45. *In: Proceedings of XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e X Reunião de Pesquisa em Leishmanioses*, Uberaba, Brazil,
- Barretto, M. P. 1967.** Estudo sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XIX. Inquérito preliminar sobre triatomíneos silvestres no Sudeste do Estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*. 9: 313-320.
- Carbajal de la Fuente, A. L., S. A. Minoli, C. M. Lopes, F. Noireau, C. R. Lazzari, and M. G. Lorenzo. 2007.** Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera: Reduviidae) in north-eastern Brazil. *Acta Trop.* 101: 115-119.
- Carcavallo, R.U., M. E. Franca Rodríguez, R. Salvatella, S. I. Curto de Casas, I. A. Sherlock, C. Galvão, D. S. Rocha, I. Galíndez Girón, M. A. Otero Arocha, A. Martínez, J. A. da Rosa, D. M. Canale, T. H. Farr, and J. M. S. Barata. 1998.** Habitats and related fauna, pp 561-600. *In: Carcavallo, R.U., Galíndez Girón, I., Jurberg, J. & Lent, H. (eds), Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, Vol.II*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

- Costa, J. 1999.** The synanthropic process of Chagas disease vectors in Brazil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population, genetical, ecological and epidemiological aspects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 (1): 239-241.
- Costa, J., J. E. Almeida, C. Britto, R. Duarte, V. Marchon-Silva, and R.S Pacheco. 1998.** Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Rduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93: 7-13.
- Costa, J., C. E. Almeida , E. M. Dotson, A. Lins, M. Vinhaes, A. C. Silveira and C. B. Beard. 2003.** The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 443-449.
- Costa, J. and M. Felix. 2007.** *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from Bahia State, northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 102 (1): 87-90.
- Costa, J., M. G. Freitas-Sibajev, V. Marchon-Silva, M. Q. Pires and R. S. Pacheco. 1997.** Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 92: 459-464.
- Costa, J., A. Townsend Peterson and C. B. Beard. 2002.** Ecologic niche modelling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas' disease vector in northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 67: 516–520.
- Dias, J. C. P., E. M. M. Machado, A. L. Fernandes, and M. C. Vinhaes. 2000.** General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. Cad. Saúde Publica.16 (2): 13-34.

- Dias, J. C. P., A. C. Silveira and C. J. Schofield. 2002.** The impact of Chagas disease control in Latin América. A review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97: 603-612.
- Dias-Lima, A.G., D. Menezes, I. Sherlock and F. Noireau. 2003.** Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Hemiptera: Reduviidae). J. Med. Entomol. 40: 989-990.
- Diotaiuti, L., O. Faria Filho, F. Carneiro, J. Pinto Dias, H. Pires and C. Schofield. 2000.** Doença de Chagas no Brasil. Cad. Saúde Publica. 16 (2): 61-67.
- Empeaire, L. 1989.** Végétation et gestion des ressources naturelles dans la caatinga du sud-est du Piauí (Brésil), Orstom, Paris.
- Empeaire, L. and C. A. Romaña. 2006.** Triatominae and Cactaceae: a risk for the transmission of the American trypanosomiasis in the peridomiliary space (Northeast Brazil). Parasite. 13: 171-178.
- Forattini, O. P. 1980.** Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. Rev. Saúde Publica. 14: 265-299.
- Forattini, O.P., E. X. Rabello, O. A. Ferreria, E. O. Rocha e Silva, and J. L. F. Santos. 1984.** Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XXI: Comportamento de espécies triatomíneas silvestres na reinfestação do intra e peridomicílio. Rev. Saúde Publica. 18: 185-208.
- Lent, H. and P. Wygodzinsky. 1979.** Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. N.Y. 163: 127-520.
- Monteiro, F.A., M. J. Donnelly, C. B. Beard, and C. Costa. 2004.** Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. Mol. Phylogenet. Evol. 32: 46–56.

- Noireau, F., R. Flores and F. Vargas. 1999.** Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93: 13-14.
- Noireau, F., F. Abad-Franch, S. A. S. Valente, A. Dias-Lima, C. M. Lopes, V. Cunha, V. C. Valente, F. S. Palomeque, C. J. Carvalho-Pinto, I. Sherlock, M. Aguilár, M. Steindel, E. C. Grisard, and J. Jurberg. 2002.** Trapping Triatominae in sylvatic habitats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 61-63.
- Sarquis, O., J. Borges-Pereira, J. R. Mac Cord, T. F. Gomes, P. H. Cabello, and M. M. Lima. 2004.** Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 263-270.
- Silveira, A.C. and M. Vinhaes. 1998.** Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31 (2): 15-60.
- Souza, L.C., F. C. C. Frola, J. A. Souza, and J. W. O. Lima. 1999.** Descrição de um foco urbano de *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), na cidade de Sobral, norte do Ceará. Resultados preliminares. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32 (1): 84-85.
- Walter, A. E., I. Pojo do Rego, A. J. Ferreira, and C. Rogier. 2005.** Risk factors for reinvasion of human dwellings by sylvatic triatomines in northern Bahia State, Brazil. *Cad. Saúde Publica.* 21: 974-978.

Table 1. Comparative distribution and abundance of *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata* in peridomestic ecotopes.¹Chi squared test (with Yates correction when necessary) to compare the number of positive ecotopes for *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata*. ²Mann-Whitney test (M-W) to compare the median catches for each species. ³Enclosure made of vertical wood posts. ⁴Fence made of vertical, horizontal or oblique trunks. ⁵Trees where the fowl roost. *Significant difference with P < 0.05.

Ecotopes	N° examine d	<i>T. juazeirensis</i>		<i>T. pseudomaculata</i>		P value (χ ² test) ¹	P value (M-W test) ²
		No. (%) of positive ecotopes	Median catch (1 st & 3 ^d quartiles) per positive ecotope	No. (%) of positive ecotopes	Median catch (1 st & 3 ^d quartiles) per positive ecotope		
Corral ³	109	26 (23.9)	3.0 (1-7)	21 (19.3)	1.0 (1-2)	0.62	0.01*
Roofed corral	32	6 (18.8)	7.5 (1-15)	2 (6.3)	8.5 (1-16)	0.34	0.86
Stick fence ⁴	30	2 (6.7)	11.5 (1-22)	1 (3.3)	6.0	0.57	-
Pile of wood	49	2 (4.1)	1.0 (1-1)	4 (8.2)	3.5 (2-4.5)	0.71	-
Artificial chicken coop	29	3 (10.3)	2.0 (1-2)	5 (17.2)	5.0 (2-7)	0.77	0.14
Fowl tree ⁵	44	2 (4.5)	10.0 (9-11)	8 (18.2)	1.0 (1-2.5)	0.14	0.04
Bird nest	47	0	-	9 (19.1)	2.0 (1-5)	-	-
Pile of tiles	38	5 (13.2)	2.0 (1-17)	1 (2.6)	12.0	0.25	-
Pile of bricks	31	1 (3.2)	22.0	1 (3.2)	1.0	1.00	-
Other structures	80	6 (7.5)	2.5 (1-8)	3 (3.8)	2.0 (1-3)	0.53	0.71
Total	489	53 (10.8)	3.5 (2-6)	55 (11.2)	2.5 (1-8)	0.94	0.97

Table 2. Relationship between triatomine species and synantropic animals in the peridomicile. ¹Chi squared test (with Yates correction when necessary) to compare the number of positive ecotope for *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata*. ²Mann-Whitney test (M-W) to compare the median catches for each species. ³Other animals: donkey, horse, pigeon, fowl, peacock, cat, monkey, turtle and armadillo. *Significant difference with $P < 0.05$.

Animal	No. of associated ecotopes	<i>T. juazeirensis</i>		<i>T. pseudomaculata</i>		<i>P</i> value (χ^2 test) ¹	<i>P</i> value (M-W test) ²
		No. (%) of positive ecotopes	Median catch (1 st & 3 ^d quartiles) per positive ecotope	No. (%) of positive ecotopes	Median catch (1 st & 3 ^d quartiles) per positive ecotope		
Goat	133	27 (20.3)	5.0 (1-15)	20 (15.0)	1.0 (1-2.5)	0.43	0.01*
Sheep	16	2 (12.5)	11.5 (2-21)	2 (12.5)	2.0 (1-3)	-	-
Cow	25	7 (28.0)	3.0 (1-4)	4 (16.0)	1.5 (1-2.5)	0.63	0.32
Pig	7	2 (28.6)	13.5 (8-19)	1 (14.3)	3.0	-	-
Dog	25	1 (4.0)	22.0	1 (4.0)	6.0	-	-
Chicken	121	10 (8.3)	2.0 (2-9)	17 (14.0)	2.0 (1-3)	0.28	0.44
Others ³	21	1 (4.8)	1.0	-	-	-	-
Total	348	50 (14.4)	3.0 (2-10)	45 (12.9)	2.0 (1-6)	0.71	0.70

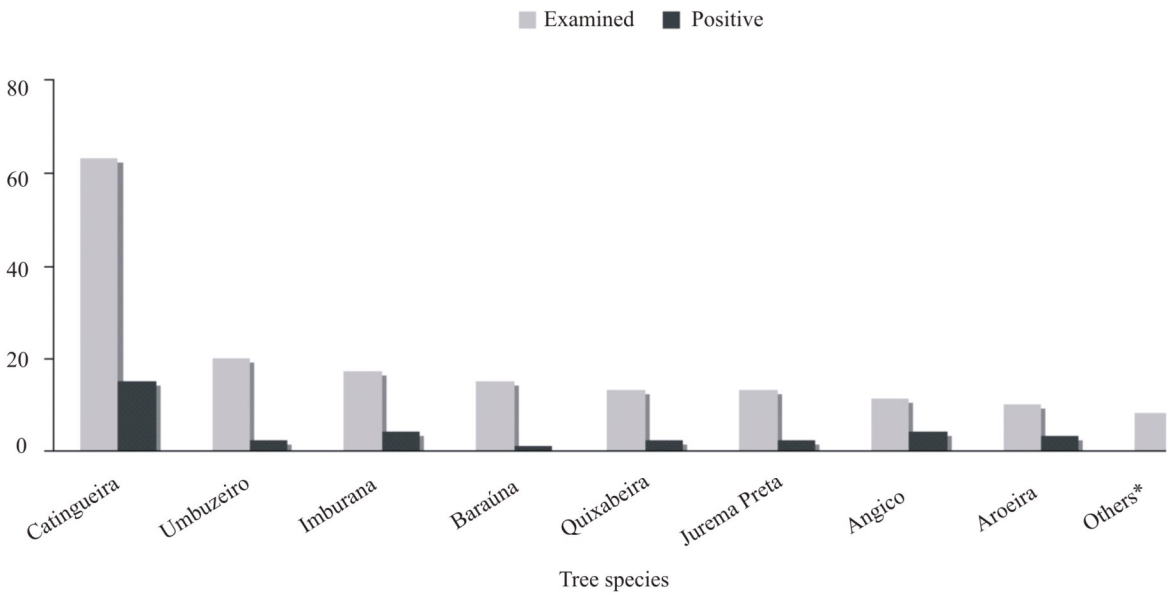
Table 3. Relationship between triatomine species and material of construction for the peridomicile. ¹Chi squared test (with Yates correction when necessary) to compare the number of positive ecotope for *T. juazeirensis* and *T. pseudomaculata*. ²Mann-Whitney test (M-W) to compare the median catches for each species. ³Tiles and bricks. ⁴Wood and backed clay. *Significant difference with $P < 0.05$.

Material	No. of ecotopes	<i>T. juazeirensis</i>		<i>T. pseudomaculata</i>		P value (χ^2 test) ¹	P value (M-W test) ²
		No. (%) of positive ecotope	Median catch (1 st & 3 ^d quartiles) per positive ecotope	No. (%) of positive ecotope	Median catch (1 st & 3 ^d quartiles) per positive ecotope		
Wood	327	40 (12.2)	3.0 (1-10)	42 (12.8)	2.0 (1-3)	0.55	0.04*
Backed clay ³	84	8 (9.5)	2.0 (1-19.5)	3 (3.6)	1.0 (1-12)	0.25	0.50
Mixture ⁴	21	5 (23.8)	7.0 (5-8)	1 (4.8)	16.0	0.27	-
Total	432	53 (12.3)	3.0 (2-7)	46 (10.6)	2.0 (1-16)	0.57	0.70

Table 4. Habitat preference for *Triatoma juazeirensis* and *T. pseudomaculata* according to the environment.

	No. of positive ecotopes for <i>T. juazeirensis</i>		No. of positive ecotopes for <i>T. pseudomaculata</i>	
	Sylvatic	Peridomestic	Sylvatic	Peridomestic
Wood	0	45	129	43
Other substrate	72	13	0	4
P value (χ^2 test)	$P < 0.001$		$P < 0.001$	

Fig 1. *T. pseudomaculata* infestation according to tree species. *Pereira (*Aspidosperma pyriformis*), Umbuzeiro (*Spondias tuberosa*), Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*), and Faveleira (*Cnidocolus phyllacanthus*).



5.7. Manuscrito em preparação: *Biologia comparativa de T. pseudomaculata e T. wygodzinskyi*

O estudo teve como meta estabelecer se espécies de triatomíneos afins como, *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*, apresentam características biológicas semelhantes.

5.7.1. Metodologia

5.7.1.1. Origem das amostras

Os exemplares de *T. pseudomaculata* foram coletados no município de Curaçá, estado da Bahia, em estruturas peridomésticas da área rural. Entretanto, os *T. wygodzinskyi* foram capturados em fendas de rochas em área próxima à localidade de Vargem Grande do Sul, estado de São Paulo. Uma vez capturados, os espécimes foram devidamente identificados e subseqüentemente acondicionados em tubos plásticos e transportados ao laboratório, onde foram mantidos sob condições naturais de fotoperiodismo, temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e de umidade relativa $70 \pm 5\%$.

5.7.1.2. Ciclo biológico

Foram selecionados aleatoriamente ovos provenientes de cinco fêmeas de cada espécie e colocados individualmente em tubos plásticos (12 cm x 3 cm). Dentro do tubo foi colocada uma tira de papel de filtro na tentativa de evitar umidade excessiva e a subseqüente proliferação de fungos. Cada tubo foi numerado e observado diariamente até a eclosão dos ovos. As ninfas foram alimentadas semanalmente em camundongos (*Mus musculus*) anestesiados segundo o protocolo 0014-00, aprovado pela Ceua-Fiocruz e observadas diariamente para se estabelecer o período decorrente entre mudas até a formação do imago. O tempo de duração de cada estágio foi registrado em dias (d). O ciclo de desenvolvimento foi calculado unicamente com os espécimes que completaram todos os estádios. Isto significa que, por exemplo, o número de espécimes (N) utilizado para calcular a duração do “estádio ovo” foi o número de espécimes que alcançaram a primeira muda (N1). Da mesma forma, o N usado para calcular a duração do “estádio N1” foi o número de espécimes que alcançaram a segunda muda (N2) e assim sucessivamente.

5.7.1.3. *Ingestão sanguínea*

Os triatomíneos foram pesados individualmente em uma balança analítica (DAHUS[®]) antes e depois de cada repasto alimentar. Foi calculada a quantidade de sangue ingerida (mg).

5.7.1.4. *Mortalidade*

A taxa de mortalidade (%) e a taxa acumulada (Σ) foram calculadas segundo o estágio ninfal.

5.7.1.5. *Análise estatística*

Para a interpretação dos dados concernentes ao ciclo biológico e ingestão sanguínea, as variáveis foram analisadas usando-se o teste de Mann-Whitney. A duração do ciclo biológico (total e por estágio) foi expressa com valores “medianos”. Os testes foram executados usando-se o programa JMP v.6.0.0 (SAS Institute Inc., 2005). A taxa de mortalidade foi analisada mediante um qui-quadrado usando GraphPad InStat v.3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.7.2. Resultados e Discussão

5.7.2.1. *Ciclo biológico*

O ciclo biológico, expresso em medianas, foi ligeiramente mais longo para *T. pseudomaculata* do que para *T. wygodzinskyi* (232 vs. 205 d, $p = 0.0014$). Entretanto, diferenças inter-específicas foram somente observadas pelo desenvolvimento do ovo e da ninfa de quinto estágio (Tabela 5.1).

Contrastando com a escassa informação sobre a biologia de *T. wygodzinskyi*, sobre a bionomia de *T. pseudomaculata* são numerosos os estudos realizados (Heitzman-Fontenelle, 1972; Perlowagora-Szumlewics, 1976; Gonçalves et al., 1997; Guarnieri et al., 2000; Pinto Soares et al., 2000). Porém, estes estudos não apresentam as mesmas condições experimentais que permitam total comparação com nossos resultados. Variáveis ambientais, fontes alimentares distintas, número de gerações de laboratório, número de insetos por tubo, entre outros fatores, podem ser responsáveis pelas diferenças observadas na duração do ciclo biológico (Canale et al., 1998). Um exemplo ilustrativo é oferecido por Guarnieri et al. (2000). Os autores obtiveram ciclos mais longos para *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis* quando alimentaram os triatomíneos com aves em comparação com a alimentação usando camundongos. Por tal motivo decidimos comparar nossos

resultados (expressos esta vez em médias) com os autores que usaram camundongos como fonte alimentar (Tabela 5.2).

Para *T. pseudomaculata*, existem somente dois estudos comparáveis. Pinto Soares et al. (2000) encontraram um ciclo biológico (de ovos até alcançar o estado adulto) ligeiramente mais curto que o nosso (232 vs. 255 dias) enquanto o resultado obtido por Guarnieri et al. (2000) exhibe uma perfeita congruência com o nosso para a duração total do período N1-N5 (233 dias em ambos os casos) (Tabela 5.2).

O presente trabalho é possivelmente o segundo estudo sobre a duração do ciclo biológico de *T. wygodzinskyi*. A colônia previamente estudada por Juarez (1970) teria sido erroneamente identificada como *T. arthurneivai*, porém pertenceria a *T. wygodzinskyi*. Juarez (1970) observou um ciclo (N1-N5) de duração para *T. wygodzinskyi* maior que o aqui relatado (314 vs. 212 dias). O autor usou a mesma fonte alimentar, mas as condições ambientais (25 °C, 60-70% RH) diferiram daquelas mantidas neste trabalho, o que poderia ser responsável pela diferença observada.

Analisando os resultados das espécies estudadas e comparando-os com *T. maculata* alimentada com sangue de camundongo, denota-se que a duração do ciclo biológico de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* é muito maior que a encontrada para *T. maculata* a que corresponde a apenas 126 dias, segundo Luitgards-Moura et al. (2006) (Tabela 5.2). Quando a colônia de *T. maculata* é alimentada com sangue de ave, o ciclo exhibe uma duração menor (Feliciangeli & Rabinovich, 1985; Espínola et al., 1981).

Estes resultados de duração do ciclo biológico apóiam, junto aqueles verificados por morfometria, as análises do fenótipo antenal e de seqüências de DNAm, tornando mais evidentes as afinidades entre *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*.

Tabela 5.1 – Tempo de desenvolvimento (em dias) segundo o estágio em *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata*, em condições de laboratório e alimentadas em camundongo.

Estádio	<i>T. wygodzinskyi</i>			<i>T. pseudomaculata</i>			<i>p</i>
	N	Mediana	Quartil (25-75%)	N	Mediana	Quartil (25-75%)	
Ovo	74	19	18 - 23	48	21	20 - 24	0.0043*
N1	55	29	21 - 46	41	34	26 - 46	N.S.
N2	51	27	19 - 35	31	23	16 - 37	N.S.
N3	46	28	22 - 40	26	29	24 - 34	N.S.
N4	38	41	32 - 49	25	35	27 - 48	N.S.
N5	31	68	55 - 82	21	97	76 - 128	0.0004*
Total (N=31)	-	205	189 - 230	-	232	215 - 260	0.0014*

N (número de espécimes), N1 (1^{er} estágio ninfal), N2 (2^{do} estágio ninfal), N3 (3^{er} estágio ninfal), N4 (4^{to} estágio ninfal), N5 (5^{to} estágio ninfal). * Diferenças significativas (teste de Mann-Whitney, $p < 0.05$). N.S. = não significativo.

Tabela 5.2 - Comparação entre a duração do ciclo biológico de *T. wygodzinskyi*, *T. pseudomaculata* e *T. maculata* avaliadas em laboratório por diferentes autores usando-se camundongos como fonte alimentar.

Estádio	<i>T. wygodzinskyi</i>		<i>T. pseudomaculata</i>			<i>T. maculata</i>
	Nossos resultados	Juarez (1970)	Nossos resultados	Pinto Soares et al. (2000)	Guarnieri et al. (2000)	Luitgards-Moura et al. (2006)
	X ± SD	X	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Ovo	20 ± 4	N/D	22 ± 3	19 ± 1	N/D	N/D
N1	35 ± 18	28	38 ± 18	25 ± 8	22 ± 1	18 ± 2
N2	30 ± 16	25	29 ± 19	33 ± 5	16 ± 0	21 ± 15
N3	31 ± 18	25	30 ± 8	48 ± 7	16 ± 0	21 ± 3
N4	43 ± 13	32	38 ± 17	52 ± 15	22 ± 1	25 ± 6
N5	73 ± 23	205	98 ± 26	55 ± 17	156 ± 10	41 ± 14
Total $\sum X$ (N1-N5)	212	314	233	213	233	126
Total $\sum X$ (Ovo-N5)	232	n/a	255	232	n/a	n/a

N1 (1^{er} estágio ninfal), N2 (2^{do} estágio ninfal), N3 (3^{er} estágio ninfal), N4 (4^{to} estágio ninfal), N5 (5^{to} estágio ninfal). N/D (não disponível), n/a (não aplicável), X ± SD (média ± desvio padrão).

5.7.2.2. Ingestão sanguínea

Foram encontradas diferenças significativas na quantidade de sangue ingerido por ambos os triatomíneos (Tabela 5.3). Durante seu desenvolvimento, *T. wygodzinskyi* ingeriu um total de 431 mg de sangue, entretanto *T. pseudomaculata* ingeriu 512 mg ($p = 0.001$). Apenas os estádios N4 e N5 de *T. pseudomaculata* ingeriram significativamente mais sangue que os de *T. wygodzinskyi*. Gonçalves et al. (1997) e Guarnieri et al. (2000) observaram que *T. pseudomaculata* ingeriu uma quantidade menor de sangue que a observada neste estudo.

Ambas as espécies precisaram a mesma frequência alimentar (≈ 10) para alcançarem o estágio adulto (dados não apresentados). O número de repastos é um aspecto importante no sucesso da transmissão do *T. cruzi*, devido ao contato entre o hospedeiro e o vetor durante a alimentação (Lopez et al., 1999). Nossos resultados para *T. pseudomaculata*, mostram um número maior de repastos que os encontrados por Gonçalves et al. (1997). Estas diferenças podem estar relacionadas à utilização de outra fonte alimentar por esses autores já que as condições ambientais e a densidade de insetos por tubo foram as mesmas que as apresentadas neste estudo.

Tabela 5.3 – Quantidade de sangue de camundongo ingerido (em mg) segundo estágio ninfal em *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata* em condições de laboratório.

Estádio	<i>T. wygodzinskyi</i>			<i>T. pseudomaculata</i>			<i>p</i>
	N	Mediana	Quartil (25-75%)	N	Mediana	Quartil (25-75%)	
N1	55	5.4	3.7 – 6.4	41	4.3	3.2 – 5.9	N.S.
N2	51	12.0	8.9 – 14.1	33	11.4	7.6 – 15.2	N.S.
N3	46	33.0	25.2 – 39.4	26	33.0	25.9 – 40.8	N.S.
N4	38	88.0	75.0 – 106.9	25	100.4	93.5 – 111.0	0.0413*
N5	31	282.6	228.2 – 336.6	21	369.2	288.1 – 450.6	0.0009*
Total		430.9	363.0 – 336.6		511.8	452.3 – 450.6	0.0010*

N (número de espécimes), N1 (1^{er} estágio ninfal), N2 (2^{do} estágio ninfal), N3 (3^{er} estágio ninfal), N4 (4^{to} estágio ninfal), N5 (5^{to} estágio ninfal).

* Diferenças significativas (teste de Mann-Whitney, $p < 0.05$). N.S. = não significativo.

5.7.2.3. Mortalidade

A taxa de mortalidade e a mortalidade acumulada dentro de cada estágio são apresentadas na Tabela 5.4. Das 74 ninfas iniciais de *T. wygodzinskyi*, apenas 31 alcançaram o estado adulto, o que significa que 58% das ninfas morreram durante todo o período de desenvolvimento. Uma taxa similar foi encontrada para *T. pseudomaculata* onde das 48 ninfas iniciais, 27 morreram (56,3%). A taxa de mortalidade variou dentro de cada estágio de 7,3 a 25,7% em *T. wygodzinskyi* e de 3,9 a 24,4% em *T. pseudomaculata*. A maior taxa de mortalidade foi registrada nas N1 (25,7%) para *T. wygodzinskyi* e nas N2 (24,4%) para *T. pseudomaculata*. O padrão irregular registrado para a taxa de mortalidade de ambas as espécies foi similar ao encontrado para outras espécies de *Triatoma* (Guarnieri et al. 2000). É importante ressaltar que nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as taxas de mortalidade de ambas espécies.

O estudo de algumas características biológicas de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*, demonstra que não existe (taxa de mortalidade, frequência alimentar) ou há pouca diferença na bionomia (quantidade de sangue ingerido, duração do ciclo biológico) entre ambas as espécies. Quando existem diferenças, aquelas não consideram todos os estágios, apenas alguns (ovo e dois últimos estágios). Os resultados favorecem a hipótese que espécies afins teriam grandes semelhanças biológicas. Se esta observação for confirmada pelo estudo de outras espécies, as características biológicas também poderiam ser usadas para sugerir (ou descartar) a proximidade evolutiva entre espécies de triatomíneos.

Tabela 5.4 – Taxa de mortalidade segundo estágio ninfal em *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata* em condições de laboratório utilizando-se camundongo como fonte alimentar.

Estádio	<i>T. wygodzinskyi</i>				<i>T. pseudomaculata</i>				<i>p</i>
	N	n	Taxa mortalidade %	Mortalidade acumulada %	N	n	Taxa mortalidade %	Mortalidade acumulada %	
N1-N2	74	55	25.7	25.7	48	41	14.6	14.6	N.S.
N2-N3	55	51	7.3	31.1	41	31	24.4	35.4	N.S.
N3-N4	51	46	9.8	37.8	31	26	16.1	45.8	N.S.
N4-N5	46	38	17.4	48.7	26	25	3.9	47.9	N.S.
N5- Adulto	38	31	18.4	58.1	25	21	16.0	56.3	N.S.

N (número inicial de espécimes), n (número de ninfas que mudaram para o seguinte estágio), N1 (1^{er} estágio ninfal), N2 (2^{do} estágio ninfal), N3 (3^{er} estágio ninfal), N4 (4^{to} estágio ninfal), N5 (5^{to} estágio ninfal). N.S. = não significativo para o teste Qui-quadrado comparando a taxa de mortalidade.

5.8. Manuscrito em preparação: Estado alimentar de populações silvestres e peridomésticas de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*

Para conhecer o estado alimentar (mediante o peso e as fontes alimentares), estudamos duas populações (silvestre e peridoméstica) de *T. pseudomaculata* coletadas durante os períodos seco e úmido em Curaçá, estado da Bahia. Ao mesmo tempo, analisamos as fontes alimentares de quatro populações de *T. wygodzinskyi* coletadas na fronteira entre os estados de Minas Gerais e São Paulo (Fig. 4.1).

5.8.1. Metodologia

5.8.1.1. Área de estudo

Duas populações de *T. pseudomaculata* (silvestre e peridoméstica) e quatro de *T. wygodzinskyi* (silvestres) foram estudadas (Tabela 5.5). A área de estudo para *T. pseudomaculata* esta localizada em Curaçá, estado da Bahia. A paisagem predominante corresponde à província biogeográfica da caatinga, caracterizada por marcantes diferenças climáticas entre as estações seca (novembro) e chuvosa (maio) (Morrone, 2006). Apresenta média anual de precipitações de 400 mm e temperatura de 26 °C. A “caatingueira” (*Caesalpinia pyramidalis* Tul) é a espécie vegetal predominante.

As populações de *T. wygodzinskyi* foram coletadas nas localidades de Pião e Sertãozinho, estado de Minas Gerais, e no estado de São Paulo em duas áreas dos municípios de Vargem Grande do Sul e Espírito Santo do Pinhal, situadas próximas à divisa dos dois estados. As coletas foram efetuadas durante um período úmido (maio). As localidades acham-se na província biogeográfica da floresta paranaense (Morrone, 2006) com precipitação anual média de 1200 mm e temperatura anual média de 20°C. Esta é uma região antropizada com grandes extensões territoriais transformadas em pastagens dedicadas à prática de agropecuária com criação de gado bovino.

Tabela 5.5: Material examinado para avaliar o estado alimentar e populações naturais de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*.

Espécie	Localidade	Habitat	N	N/ ELISA
<i>T. pseudomaculata</i>	Curaçá, BA	S	292	90
			163	84
		P	172	83
<i>T. wygodzinskyi</i>	Pião, MG		51	28
	Santa Rita de Caldas, MG	S	199	69
	Vargem Grande do Sul, SP		145	87
	Espírito Santo do Pinhal, SP		15	14

Abreviações: estados da BA= Bahia, MG= Minas Gerais, SP= São Paulo, S= silvestre, P= peridomicílio, N= número espécimes.

5.8.1.2. Coleta dos triatomíneos

Todos os triatomíneos foram capturados por meio de busca ativa com ajuda de pinças entomológicas. Os *T. pseudomaculata* provenientes de ecótopos silvestres foram coletados dissecando-se um total de 80 troncos de árvores secos durante um período seco (novembro) e 69 durante um período úmido (maio). Também foram examinados 11 potenciais abrigos nos peridomicílios (definidos como toda construção próxima à casa) durante o período seco. Os ambientes peridomésticos incluíram galinheiros, poleiros, ninhos de aves, pilhas de telhas, tijolos e madeiras e currais de animais para criação. Entretanto, os *T. wygodzinskyi* foram capturados em ambiente silvestre correspondente apenas fendas de rochas.

5.8.1.3. Processamento dos triatomíneos

Os triatomíneos coletados foram agrupados por ambiente de captura e colocados dentro de tubos plásticos com papel absorvente no seu interior. No laboratório, foram imediatamente identificados e classificados por sexo e estágio. Os *T. pseudomaculata* foram pesados individualmente utilizando-se uma balança analítica DHAUS®. Nos exemplares capturados foi realizada uma busca de flagelados no reto de modo a determinar a taxa de infecção com *T. cruzi*. Para isso o abdome dos triatomíneos foi delicadamente comprimido com ajuda de pinças entomológicas, recolhendo-se os dejetos eventualmente eliminados e misturados em duas gotas de solução salina 0,9%, entre lamina e lamínula. A busca de flagelados foi realizada utilizando microscopia ótica (400 x).

Para se conhecerem as fontes de alimentação, ninfas de quarto e quinto estágio foram cuidadosamente comprimidas com a ajuda de pinças na porção final do abdome e gotas de excretas eventualmente eliminadas foram dissolvidas em 50 µl de PBS (solução salina fosfatada) 10 mM, pH 7,2, e subsequentemente examinadas através do teste de ELISA seguindo o método de Burkot et al. (1981) modificado por Duarte (1997). Em placas de microdiluição de poliestireno com 96 cavidades (Alfesa, São Paulo, Brasil), foram colocados 100 µl das amostras diluídos em tampão carbonato bicarbonato pH 9,6. Estas diluições variaram de 1: 1.000 até 1: 64.000. A seguir, as placas colocaram-se em câmara úmida em estufa a 37° C por duas horas para que as proteínas contidas nas amostras pudessem se fixar à placa. Após esta etapa de sensibilização, as placas foram retiradas da estufa e sofreram 3 lavagens com PBS (0,01 M; pH 7,2) adicionado de Tween 20 (Sigma Chemicals Co-St. Louis, USA) a 0,05%, com o auxílio de lavadora de placas semi-automática (Microbomba M-CV II, Brasil). Após as lavagens, 100 µl dos anti-soros homólogos foram colocados nas placas em diluições que variaram de 1: 1000 até 1: 160.000. Estas diluições foram feitas em solução a 1% de leite em pó desnatado (Molico-Nestlé, Brasil) diluído em PBS/ Tween 0,05% pH 7,2. A seguir, a placa foi colocada em câmara úmida na estufa a 37° C por 45 minutos. Decorrido este tempo, a placa foi retirada da estufa e lavada com os mesmos procedimentos das lavagens anteriores. Seguiu-se incubação em estufa e lavagens como já descritas anteriormente.

Terminada esta fase, foi colocada então a solução reveladora constituída de Ortophenilene-diamina (OPD, Sigma Immunochemicals Co-St. Louis, USA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes (Merck Diagnóstica-RJ, Brasil), diluídos em tampão citrato/fosfato pH 4,9 - 5,2. Depois de colocada esta solução, a placa foi deixada em câmara escura por 15 minutos. Decorrido este período, foi procedida à leitura em absorvância em leitor de microplacas EIA Microwell Reader (Sigma Immunochemicals Co-St. Louis, USA). O título dos anti-soros foi dado pela última diluição que apresentou valores de absorvância superiores aos valores estimados para o ponto de corte (“cut off”). Posteriormente, foi feito o cálculo da média das leituras em absorvância. A esta média foram acrescentados 3 desvios padrões. Este valor final foi considerado como “cut off” e, com base nestes cálculos, definidos os valores positivos ou negativos.

Foram usados anti-soros para tatu (*Dasyus novemcinctus* Linnaeus, 1758), galinha (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758), gato (*Felis catus* Linnaeus, 1758), hemolinfa (*Periplaneta americana* Linnaeus, 1758), vaca (*Bos taurus* Linnaeus, 1758), cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758), gambá (*Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758), cavalo (*Equus caballus* Linnaeus, 1758), lagarto (*Tupinambis meriana* (Dumeril & Bibron 1839)), rato (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769), ovelha (*Ovis aries* Linnaeus, 1758) e humano (*Homo sapiens sapiens* Linnaeus, 1758).

5.8.1.4. Análise dos dados

Uma análise preliminar permitiu demonstrar a correlação elevada entre os pesos e comprimentos dos insetos em cada estágio (dados não apresentados). Assim, só o peso foi utilizado para avaliar o estado alimentar de *T. pseudomaculata*. Primeiramente, foi realizada uma comparação do peso entre populações provenientes de habitats silvestres e peridomésticos. Segundo, uma comparação do peso entre triatomíneos coletados durante um período seco e um úmido. Valores das medianas foram comparados pelo teste de Mann-Whitney usando o programa JMP v.6.0.0 (SAS Institute Inc., 2005).

5.8.2. Resultados

5.8.2.1. Populações silvestres vs. peridomésticas

Foi coletado o total de 292 espécimes de *T. pseudomaculata* originários do ambiente silvestre e 172 provenientes do peridomicílio (Tabela 5.6). Exemplos adultos e ninfas pertencentes aos cinco estágios foram capturados em ambos os ecótopos. Os resultados mostram que *T. pseudomaculata* de ambientes peridomésticos estavam, em média, 1,9 vezes melhor alimentadas que os coletados no ambiente silvestre. As ninfas do primeiro estágio encontram-se 1,3 vezes mais alimentadas, as do segundo e terceiro 1,4, as de quarto e de quinto 2,3 e 3,1 respectivamente, as fêmeas 2,1 e, finalmente, os machos 1,5. Foram encontradas diferenças significativas (teste Mann-Whitney, $p < 0,05$) para cada comparação do mesmo estágio entre habitat silvestre e peridoméstico no período seco (Tabela 5.6).

Tabela 5.6: Comparação do estado alimentar entre populações silvestre e peridoméstica de *T. pseudomaculata*. Coletas realizadas durante o período seco em Curaçá, BA.

Estádio	Silvestre			Peridoméstico			Valor P ¹
	N	Peso (mg) Mediana	(Min-Max)	N	Peso (mg) Mediana	(Min-Max)	
N1	78	0,9	0,1 - 3,0	18	1,2	0,8 - 3,1	0,0042 *
N2	62	2,3	0,9 - 9,2	14	3,6	1,6 - 8,0	0,0174 *
N3	54	7,7	2,9 - 20,2	21	10,0	4,1 - 36,0	0,0437*
N4	47	18,7	8,3 - 58,6	18	52,4	17,6 - 79,4	0,0001 *
N5	33	41,3	24,3 - 78,5	38	151,8	29,8 - 235,2	0,0001 *
F	12	52,9	38,4 - 109,6	18	129,9	61,9 - 175,3	0,0001 *
M	6	48,7	42,7 - 95,8	45	92,1	46,1 - 124,1	0,0066 *
Total	292	5,2	0,1 - 109,6	172	68,7	0,8 - 235,2	0,0001 *

¹ Comparação entre os diferentes ambientes. *Diferenças significativas pelo teste de Mann-Whitney.

5.8.2.2. *Varição estacional*

O estado alimentar de 292 espécimes de *T. pseudomaculata* coletados na estação seca foi comparado com 163 espécimes coletados durante a estação úmida. Os resultados comparativos entre as duas estações revelam que os triatomíneos coletados durante o período úmido foram encontrados com pesos mais elevados (Tabela 5.7). Ninfas a partir do terceiro estágio e adultos coletados durante este período tinham maior peso (teste Mann-Whitney, $p < 0,05$). Ressalta-se o fato de ter encontrado um baixo número de triatomíneos do primeiro ($n=3$) e segundo ($n=2$) estágio durante a estação úmida. Entretanto, as ninfas de quinto estágio, além dos adultos, foram mais abundantes durante essa estação que na seca.

5.8.2.3. *Fontes de alimentação*

A Tabela 5.8 mostra o resultado das fontes de alimentação de populações silvestres e peridomésticas de *T. pseudomaculata* em época seca e úmida. Dos triatomíneos silvestres coletados durante o período seco, um total de 90 foram analisados por ELISA. Foi observado um baixo número de amostras positivas (10%) e dos 13 anti-soros usados, cinco resultaram reativos: ave, gato, réptil, rato e ovelha. Dos 84 triatomíneos silvestres coletados durante o período chuvoso e testados, apenas 11 amostras reagiram positivamente a três anti-soros, sendo eles hemolinfa de artrópode, réptil e tatu. Das 11 amostras positivas, nove corresponderam a uma reação para hemolinfa (82%). Entretanto, dos 83 espécimes peridomésticos coletados durante a estação úmida, 10 (12%) foram positivos para ao menos um anti-soro, sendo que o sangue de ave foi o mais detectado (70%).

Em relação aos *T. wygodzinskyi*, todos coletados em ambiente silvestre, um total de 197 foram analisados, sendo 36 (18%) positivos (Tabela 5.9). A fonte de alimentação mais freqüente foi ave, com 47% dos insetos positivos. Todas as outras fontes representaram menos de 15% do total. Analisando as localidades de coleta em separado, podemos ressaltar uma heterogeneidade, uma negatividade para alimentação em ave nos espécimes de Espírito Santo do Pinhal e a presença de hemolinfa de artrópode em alguns triatomíneos desta localidade e de Sertãozinho (MG).

Tabela 5.7: Estado alimentar de populações silvestres de *T. pseudomaculata* coletadas durante as estações seca e úmida, em Curaçá, BA.

Estádio	Período seco			Período úmido			Valor P
	N	Peso (mg) Mediana	(Min-Max)	N	Peso (mg) Mediana	(Min-Max)	
N1	78	0,9	0,1 - 3,0	3	1,7	0,6 - 1,80	0,3324
N2	62	2,3	0,9 - 9,2	2	4,4	4,4 - 4,4	-
N3	54	7,7	2,9 - 20,2	21	11,9	5,4 - 24,7	0,0003 *
N4	47	18,6	8,3 - 58,6	32	49,3	13,9 - 79,0	0,0001 *
N5	33	41,3	24,3 - 78,5	79	133,9	37,1 - 255,2	0,0001 *
F	12	52,9	38,4 - 109,6	15	116,2	70,8 - 201,6	0,0001 *
M	6	48,7	42,7 - 95,8	11	97,0	58,2 - 116,1	0,0103 *
Total	292	5,2	0,1 - 109,6	163	78,8	0,6 - 255,2	0,0001 *

*Diferenças significativas para o teste de Mann-Whitney.

Tabela 5.8: Número absoluto e percentual de *T. pseudomaculata* alimentados segundo a fonte sanguínea ou hemalinfagia (teste ELISA) durante as estações seca e úmida, em Curaçá, BA.

Fonte alimentar	Silvestre		Peridomestico
	Período seco (%) (N=90)	Período úmido (%) (N=84)	Período úmido (%) (N=83)
Tatu	-	1 (9)	1 (10)
Ave	2 (22)	-	7 (70)
Gato	1 (11)	-	-
Hemolinfa	-	9 (82)	-
Réptil	3 (33)	1 (9)	1 (10)
Rato	1 (11)	-	-
Ovelha	2 (22)	-	1 (10)
Total reativos	9 (10)	11 (13)	10 (12)
Não reativos	81 (90)	73 (87)	73 (88)

Tabela 5.9: Número absoluto e porcentual de *T. wygodzinskyi* silvestres alimentados segundo a fonte sanguínea ou hemalinfagia (teste ELISA) durante período úmido em localidades de São Paulo e Minas Gerais.

Fonte alimentar	ESP (N=13)	VGD (N= 87)	P (N= 31)	S (N= 69)	Total (N= 197)
Tatu	3 (27)	-	-	2 (14)	5 (14)
Ave	-	7 (87)	3 (100)	7 (50)	17 (47)
Gambá	-	1 (12)	-	-	1 (3)
Cão	2 (18)	-	-	2 (14)	4 (11)
Hemolinfa	3 (27)	-	-	1 (7)	4 (11)
Cavalo	1 (9)	-	-	2 (14)	3 (8)
Réptil	2 (18)	-	-	0 (0)	2 (6)
Total reativos	11 (85)	8 (9)	3 (11)	14 (20)	36 (18)
Não reativos	2 (15)	79 (91)	25 (89)	55 (80)	161 (82)

ESP= Espírito Santo do Pinhal e VGD= Vargem Grande do Sul (SP); P= Pião e S= Sertãozinho (MG).

5.9. Manuscrito em preparação: Relações filogenéticas entre *T. pseudomaculata*, *T. wygodzinskyi* e *T. maculata* baseadas em seqüências do gene mitocondrial citocromo oxidase I

Usamos a seqüência de nucleotídeos obtida a partir de segmentos do gene mitocondrial citocromo oxidase I para estabelecer uma hipótese de relacionamento filogenético entre *T. pseudomaculata*, *T. wygodzinskyi* e *T. maculata*.

5.9.1. Metodologia

5.9.1.1. Extração do DNA

O DNA foi extraído de triatomíneos adultos (de dois a sete indivíduos por população) pertencentes às espécies apresentadas na Tabela 3, seguindo a metodologia de Collins et al. (1987) com modificações. Estas incluíram a maceração de cada amostra (duas patas de cada triatomíneo) em nitrogênio líquido até pulverizar, antes de adicionar o tampão de maceração (duas vezes o volume original).

5.9.1.2. Amplificação e seqüenciamento do DNA

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi usada para amplificar um segmento de 631 pares de bases (pb) do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Os iniciadores usados foram COIf (5' - CCT GCA GGA GGA GGA GAY CC - 3'; Palumbi & Benzie, 1991) e CO10 (5' - TAA GCG TCT GGG TAG TCT GAR TAK CG - 3'; Baldwin et al., 1998). A reação de amplificação foi executada em um termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) programado para a seguinte ciclagem: uma etapa de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 48°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos com uma extensão final de 72°C durante 10 minutos, seguido de um decréscimo da temperatura para 4°C até a retirada das reações do termociclador.

Em seguida os produtos da PCR foram purificados mediante o uso do *kit "GFX™ DNA and gel band purification"* (GE Healthcare). Um µl de cada produto da PCR purificado foi usado nas reações de seqüenciamento [*Forward* (F) e *Reverse* (R) para cada amostra] de acordo com o método de Sanger et al. (1977) e usando-se o *kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). O excesso de di-deoxinucleotídeos não incorporados foi precipitado utilizando-se etanol de acordo com as recomendações da seção 4-10 do protocolo *ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* (2001). Em seguida as amostras foram

analisadas em um seqüenciador automático ABI 3730 para a produção de um eletroferograma para cada reação de seqüenciamento. Os 30 ciclos usados para as reações de seqüenciamento foram: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos, seguido finalmente de um decréscimo da temperatura para 4°C até a retirada da reação do seqüenciador.

5.9.1.3. Alinhamento e análises filogenéticas

Os eletroferogramas F e R gerados para cada amostra foram editados e usados para produzir uma seqüência consenso representativa de cada indivíduo analisado, com o uso do programa SeqMan v 7.0 do pacote de programas DNASTar (DNASTar, Inc.). Os segmentos iniciais e finais das seqüências obtidas, que constituíam partes dos iniciadores usados, foram excluídos da análise. Estatísticas básicas das seqüências alinhadas foram calculadas e uma matriz de distâncias genéticas com base no modelo de 2 parâmetros de Kimura (Kimura, 1980) foram calculadas com a utilização do programa MEGA v3.1 (Kumar et al., 2004).

Para as inferências filogenéticas foram utilizados os métodos “agrupamento de vizinhos”, do inglês *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com base na matriz de distância mencionada acima, e parcimônia (critério ótimo). Para estas análises, foram considerados os diferentes haplótipos das espécies estudadas como grupo interno e de *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. rubrovaria*, *T. guasayana*, *R. pictipes* e *R. prolixus*, como grupo externo. Seqüências dos representantes do grupo externo foram obtidas do GenBank (números de acesso AF021213, AF021186, AF021206, AF021193, AF449136 e AF449138, respectivamente). O primeiro método foi empregado, pois permite a obtenção de uma única topologia de maneira rápida e confiável, desde que escolhido o modelo de distância apropriado, e se as seqüências não forem muito divergentes (Nei & Kumar, 2000). O modelo de 2 parâmetros de Kimura foi escolhido para produzir a matriz de distâncias porque a estimativa Jukes & Cantor (1969) do número médio de substituições por sítio entre haplótipos foi menor que 0,3 e a razão transições/transversões foi menor que 2,0 (Nei, 1996). O grau de confiabilidade de cada clado foi determinado através do método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com base em 1000 réplicas empregando-se o mesmo programa. O segundo método (parcimônia) permite selecionar uma (ou mais) árvore (s) que tem o menor número de alterações (passos evolutivos) para todos os sítios, sendo, portanto, a(s) mais parcimoniosa(s). Foi usado o algoritmo exato de busca (*Branch and Bound*) com a opção “enumeração implícita”. Os caracteres foram considerados desordenados (não aditivos) e com pesos

iguais. O nível de apoio das hipóteses foi calculado pelo suporte de Bremer, também chamado de índice de decaimento (Bremer, 1994). Foram efetuadas 1000 réplicas de re-amostragem simétricas procurando árvores com enumeração implícita (busca exata). As análises mencionadas neste parágrafo foram realizadas com o programa TNT versão 1.1 (Goloboff et al., 2003). Para facilitar a discussão dos resultados obtidos nas análises foi adotada a notação de “grupo+” proposta por Amorim (1982) para designar o clados que contém todas as espécies de *Triatoma* utilizadas na análise.

Tabela 5.10: Material utilizado como grupo interno neste estudo segundo o procedimento.

Espécie	Localidade	Hábitat	Coleta	N
<i>T. pseudomaculata</i>	Sobral, CE		F1	6
	Bom Jesús, PB		C	1
	Curaçá, BA	P	C	7
	Itaberaba, BA		C	2
	Itaobim, MG		C	4
<i>T. wygodzinskyi</i>	Vargem Grande do Sul, SP		C	5
	Piã, MG	S	C	3
	Santa Rita Caldas, MG		C	3
<i>T. maculata</i>	Mucajaí, RR	S	F1	3

Abreviações: N: número indivíduos; Estados da: BA, Bahia; CE, Ceará; MG, Minas Gerais; PB, Paraíba; RR, Roraima; SP, São Paulo. P, peridoméstico; S, silvestre. F1, primeira geração de laboratório; C, campo.

5.9.2. Resultados e Discussão

Fragmentos de 631 pb do gene COI foram obtidos para os 34 espécimes analisados. Sua análise revelou a existência de 115 sítios variáveis que compõem 12 haplótipos: sete pertencentes a *T. pseudomaculata*, quatro a *T. wygodzinskyi* e um a *T. maculata* (Tabela 8). As frequências de cada nucleotídeo foram 32% (T), 31% (A), 21% (C) e 16% (G). *T. pseudomaculata* apresentou 22 substituições, *T. wygodzinskyi* apresentou sete, e não foi encontrada variabilidade nas três amostras de *T. maculata*. Todas as substituições dentro de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* foram sinônimas (Tabela 9). Existe uma mutação não-sinônima na posição 341 que representa uma mutação na primeira posição do códon (C↔T) e leva a mudança do aminoácido Leucina por Fenilalanina, quando as espécies *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* são analisadas conjuntamente. Quando se inclui também o haplótipo de *T. maculata*, mais

duas substituições não-sinônimas aparecem (A↔G, na posição 308, mudando do aminoácido Serina para Treonina e A↔T, e na posição 536 alterando de Metionina para Valina; ambas na primeira posição dos códons). Valores intraespecíficos de distância Kimura 2 parâmetros foram: 0,012, para *T. pseudomaculata*; 0,006 para *T. wygodzinskyi* e zero para *T. maculata*. Valores interespecíficos foram mais elevados como 0,050 obtido entre *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*; entretanto quando *T. maculata* é incluído nas comparações, as distâncias obtidas são surpreendentemente elevadas (d=0,169 na comparação com *T. pseudomaculata* e 0,175, com *T. wygodzinskyi* (Tabela 10).

A árvore de “agrupamento de vizinhos” para as amostras seqüenciadas, mostrou uma topologia ligeiramente diferente da obtida mediante parcimônia, sobretudo com respeito às espécies mais distantemente relacionadas ao grupo interno (Fig. 9). Em ambas as análises *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* aparecem como espécies irmãs, enquanto *T. maculata* se localiza no grupo externo como grupo irmão do clado *T. rubrovaria*+*T. guasayana*. Observa-se que as distâncias entre os haplótipos de *T. wygodzinskyi* são menores. Isto parece indicar uma separação mais recente de suas populações ou resultar de uma amostragem menos eficiente para essa espécie, quando comparada com *T. pseudomaculata*. Observa-se a maior diferença na população de SP com um haplótipo único, e a maior distância com as populações de MG. Em *T. pseudomaculata* observa-se uma curta distância entre as seqüências presentes nas populações da Bahia e Minas Gerais, além de uma alta similaridade entre os haplótipos “k” do Ceará e “l” da Paraíba.

A busca exata na análise de parcimônia produziu três árvores igualmente parcimoniosas, com 461 passos evolutivos (dados não apresentados). Tanto nas três árvores obtidas, como na consenso mostrada na Fig. 10, não se resgatou a monofilia do “grupo maculata” que, portanto, parece não fazer sentido filogenético já que não constitui um grupo natural. Os resultados mostraram consistentemente que *T. maculata* situa-se entre os táxons que compõem o grupo externo, indicando que essa espécie e *T. pseudomaculata* pertencem a linhagens filogenéticas diferentes. Assim, é bastante provável que os caracteres morfológicos que têm sido utilizados para considerá-las próximas podem ser, na realidade, convergências fenotípicas, ao invés de similaridades herdadas de um ancestral comum recente. *T. pseudomaculata* se encontra filogeneticamente mais relacionada com *T. wygodzinskyi* do que com qualquer outro dos táxons terminais utilizados na análise. Esta proximidade filogenética é altamente congruente com as similaridades fenéticas obtidas na presente tese por técnicas de morfometria geométrica de asas e fenótipo antenal.

Tabela 5.11: Sítios variáveis para um fragmento de 631pb do gene COI em *T. maculata* (a), *T. wygodzinskyi* (b-e) e *T. pseudomaculata* (f-l).

Sítios variáveis												
	111	1111111111	1122222222	2222222222	3333333333	3333333334	4444444444	4445555555	5555555555	5555555666	66666	
H	111444455 4703706989	6677888112 4739258281	3334445667 0392597142	7901112234 8981476921	4555566899 4036928026	0001112344 1480692219	5677777880 5703469896	1112233557 2581403172	7990111222 8068124369	3333455677 2569739514	7888999001 7369258470	11122 34625
a	TAT.CAC.CC	GAATCT.FTT	.TTCTTTC.T	A..CTCCTCT	..TTG.ACAC	CTAATTA.TT	TCACCTTCC.	.ACC.TT.C.	CGG.CCGTGC	TCTTACCCTT	CCGCTCCC.T	
b
cC.....
dC..
eC..	..T.....A.....C	A.....G
f	...G...C..	.C...C..	G..CC.T.C.	A.....C.	T..T.C...	.T.A...TT.	..A...CC.	C...C..TC.	AC...C...C...G
g	...G...C..	.C...C..	G..CC.T.C.	A.....C.	TC.T.C...	.T.A...TT.	..A...CC.	C...C..TC.	AC...C...C...G
h	...G...C..	.C...C..	G..CC.T.C.	A.....C.	T..T.C...	.T.A...TT.	..A...CC.	C...CT.TC.	AC...C...C...G
i	...G...C..	.C...C..	G..CC.T.C.	A.....C.	T..T.C..C.	.T.A...TT.	..A...CC.	C...C..TC.	AC...C...C...G
j	...G...C..	.C...CT..	...CC.T.C.	.GG....C.	T..T.C..C.	.T.A...TT.	..A...CC.	C.....TCG	...T.....	A...CC...C...
kC..	.C...CT..	...CC.T.C.	T.....C.	T...C...	.T.A...TT.	.CA...C..	CT....TC.	...T.....	A...C...C..T.	...TG
lC..	.C...CT..	...CC.T.C.	T.....C.	T...C...	.T.A...TT.	.CA...C..	CT....TC.	...T.....	A...C...	..G..C..T.	...TG
Co	CTCATTFFFF	ATCCTCTCCC	AACTACCTTC	CAATATACTC	ATCCATFFFF	TCGGCCCCC	CTGATACTTT	TCATTCCCTA	TAACATAAAA	GTACGTTTCC	ATAACTTTCA	ATACA

Abreviações: H: haplótipos; Co: consenso.

Tabela 5.12: Número de haplótipos, variações e substituições das seqüências estudadas.

Grupo	N	H	Sítios variáveis	Substituições	
				s	ns
<i>T. pseudomaculata</i>	20	7	22	22	0
<i>T. wygodzinskyi</i>	11	4	7	7	0
<i>T. maculata</i>	3	1	0	0	0

Abreviações: N: numero de seqüências; H: número de haplótipos, s: sinônimas; ns: não sinônimas.

Tabela 5.13: Distância genética com correção de Kimura 2-parâmetros entre e dentro as espécies estudadas.

Grupo	entre os grupos			dentro dos grupos
	(1)	(2)	(3)	
<i>T. pseudomaculata</i> (1)	-			0,012
<i>T. wygodzinskyi</i> (2)	0,050	-		0,006
<i>T. maculata</i> (3)	0,169	0,175	-	0,000

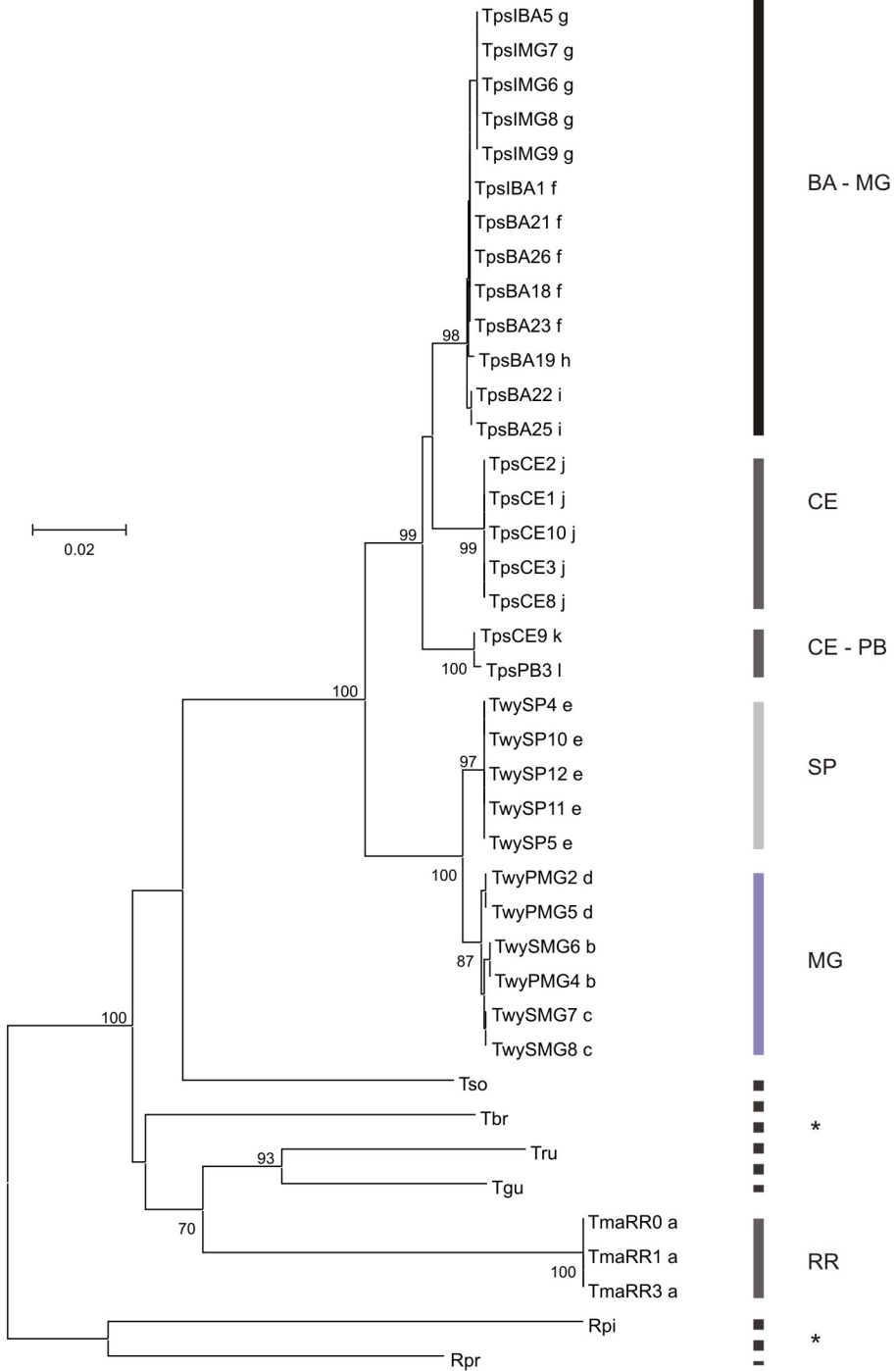


Fig. 5.1: Árvore de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-Joining*) construído com base nas distâncias 2 parâmetros de Kimura para todas as seqüências de 631 pb do gene COI de *T. pseudomaculata* (Tps), *T. wygodzinskyi* (Twy) e *T. maculata* (Tma). Letras a-l indicam os haplótipos. Seqüências das espécies *T. sordida* (Tso), *T. brasiliensis* (Tbr), *T. guasayana* (Tgu), *T. rubrovaria* (Tru), *R. pictipes* (Rpi) e *R. prolixus* (Rpr) que constituem o grupo externo, foram obtidos do GenBank. Barras verticais indicam a origem das populações: BA, Bahia; CE, Ceará; MG, Minas Gerais; PR, Paraíba; RR, Roraima e SP, São Paulo. Asteriscos indicam os grupos externos.

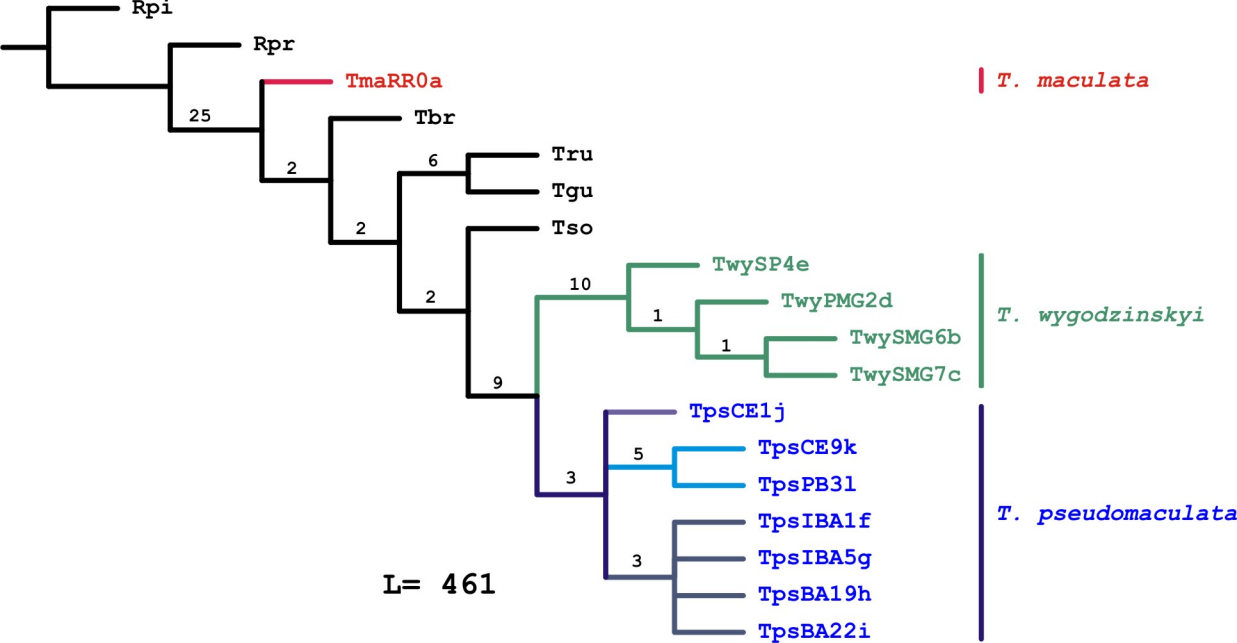


Fig. 5.2: Consenso estrito obtido a partir das três árvores mais parcimoniosas para os 12 haplótipos de *T. pseudomaculata*, *T. wygodzinskyi* e *T. maculata*. Números acima dos ramos indicam Suporte de Bremer. L: comprimento da árvore. Dados de *T. sordida* (Tso), *T. brasiliensis* (Tbr), *T. guasayana* (Tgu), *T. rubrovaria* (Tru), *R. pictipes* (Rpi) e *R. prolixus* (Rpr) como grupos externos, foram obtidos do GenBank.

5.10. Outros resultados

5.10.1. Taxa infecção com *Trypanosoma cruzi*

Na Tabela 5.14 são apresentados os resultados referentes à taxa de infecção pelo *T. cruzi* de três localidades. Nenhum *T. pseudomaculata* foi encontrado infectado por *T. cruzi*. Enquanto a taxa de infecção era de 5% em *T. wygodzinskyi*.

Tabela 5.14: Taxa de infecção com *Trypanosoma cruzi* para *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* de diferentes localidades do Brasil.

Espécie	Localidade	Hábitat	N	<i>T. cruzi</i> +
<i>T. pseudomaculata</i>	Itaobim, BA		11	0
	Itaberaba, BA	P	13	0
	Senhor do Bom Fim, BA		16	0
Total			40	0
<i>T. wygodzinskyi</i>	Espírito Santo do Pinhal, SP		14	0
	Pião, MG	S	21	1 (5%)
	Sertãozinho, MG		40	2 (5%)
Total			75	3 (5%)

BA= Bahia, SP= São Paulo, MG= Minas Gerais; P= Peridoméstico, S= Silvestre; += positivo.

5.10.2. Dispersão de *T. wygodzinskyi* mediante o vôo

Durante três noites em março de 2005, foi colocada armadilha luminosa seguindo a metodologia apresentada no manuscrito N° 5 em uma área silvestre próxima à localidade de Vargem Grande do Sul, SP, com o intuito de coletar *T. wygodzinskyi*. Não se obtiveram resultados positivos.

6. DISCUSSÃO GERAL

6.1. Taxonomia

6.1.1. O status específico dos taxa é válido?

Nenhum dos resultados obtidos pelas diferentes técnicas comprometeu a validade taxonômica das espécies estudadas, não sendo achadas evidências que justificassem uma possível sinonímia. Portanto, *Triatoma pseudomaculata*, *T. wygodzinskyi*, *T. maculata* e *T. arthurneivai* podem ser consideradas espécies válidas concordando com Lent & Wygodzinsky (1979), Carcavallo et al. (1998c, 2000), Dujardin et al. (2000) e Galvão et al. (2003). Cada um dos análises efetuados aportou elementos a favor do reconhecimento de cada espécie. O estudo filogenético mostrou que todas as populações apontadas como pertencentes a uma determinada espécie agruparam-se dentro de um mesmo clado, evidenciando que possuíam validade como grupo natural. A maioria dos parâmetros fenotípicos analisados também caracterizaram as espécies, apontando uma maior semelhança entre suas populações, destacando-se a morfometria geométrica das asas com um alto valor discriminatório. A distribuição geográfica proposta por Carcavallo et al. (1998a) e os resultados dos modelos preditivos apresentados nesta tese, mostram um cenário plausível e congruente com a hipótese filogenética, onde o “subcomplexo *wygodzinskyi*” ocupa uma área geográfica contínua e suas espécies têm distribuições de escassa simpatria, relacionando-se cada uma às províncias biogeográficas específicas. Já *T. maculata*, situada no norte da América do Sul, exibe uma grande alopatria ao respeito do “subcomplexo *wygodzinskyi*”, situado no este do continente, do qual é também distante filogeneticamente.

6.1.2. Existiram e continuam existindo erros de identificação na literatura?

Existem importantes erros a destacar para *T. pseudomaculata*: durante muitos anos, *T. maculata* foi registrada na região Nordeste do Brasil até a descrição, em 1964, de *T. pseudomaculata*. Depois dessa data, ficou estabelecido que *T. maculata* estava presente no Brasil, unicamente no estado de Roraima e que os registros de ocorrência na região nordeste pertenciam na verdade a *T. pseudomaculata*. Contudo, atualmente, observamos que em algumas das planilhas elaboradas pelas Secretarias de Saúde que visitamos em vários estados nordestinos, muitos exemplares coletados continuam sendo registrados como *T. maculata*. Por tal motivo, pensamos que Sainz et al. (2004) tenham recebido, para seu estudo molecular, exemplares de *T. pseudomaculata* provenientes de

Sergipe e erroneamente identificados como *T. maculata*, recaindo em conclusões equivocadas sobre as relações filogenéticas entre as espécies. Nesse estudo, baseado em seqüências de DNAm para 32 espécies de Triatominae, Sainz et al. (2004) haviam sugerido que o clado constituído por *T. pseudomaculata* e *T. maculata* era o mais consistente. Esses autores ainda explicam que as semelhanças morfológicas são apoiadas pelas semelhanças genéticas, encontrando uma taxa de substituição nucleotídica baixa (0,2 – 0,8%). Finalmente, seus resultados, concordariam com a hipótese proposta por Schofield (1988) sobre a origem comum destas duas espécies. Porém, passa despercebido para os autores que a amostra processada como *T. maculata* proveio do nordeste do Brasil (Sergipe), área de ocorrência de *T. pseudomaculata*.

Por outro lado, como foi demonstrado pela análise morfométrica realizada no presente estudo, todas as antigas publicações em que são referidos exemplares de *T. arthurneivai* provenientes do Estado de São Paulo, estariam reportando-se dados de *T. wygodzinskyi*. Da mesma forma, publicações mais recentes, como Hypša et al. (2002), Paula et al. (2005) e Rosa et al. (2005), tiveram *T. wygodzinskyi* como objeto de estudo, e não *T. arthurneivai*. Recentemente, Santos et al. (2007) haviam suspeitado a pertinência das populações paulistas a *T. wygodzinskyi*. Isto foi definitivamente confirmado pelos resultados moleculares obtidos nesta tese, que indicam que as populações de triatomíneos próximas à localidade tipo de *T. wygodzinskyi* e localizadas no sul do estado de Minas Gerais e norte de São Paulo formam um clado monofilético. Como sugerido no manuscrito N° 1 é provável que *T. arthurneivai* seja uma espécie endêmica da Serra do Cipó ou da Cordilheira do Espinhaço.

Uma das possíveis origens dos erros de identificação dessas espécies de triatomíneos é o grande peso dos caracteres cromáticos nas chaves dicotômicas. A caracterização cromática do pronoto, utilizada por Lent & Wygodzinsky (1979) e Carcavallo et al. (2000) como caráter discriminante entre *T. arthurneivai* e *T. wygodzinskyi*, não deveria ser mais considerada, como demonstram nossos resultados (manuscrito N°1, Fig. 6). Fazendo uma análise exaustiva da coloração do pronoto dos exemplares de *T. wygodzinskyi* coletados na localidade tipo, encontramos uma grande variedade de colorações que passam desde um pronoto avermelhado, ângulos humerais com manchas avermelhadas, até o pronoto totalmente escuro. Segundo a chave de identificação proposta por Lent & Wygodzinsky (1979), não existiriam exemplares com pronoto escuro em *T. wygodzinskyi*, característica *T. arthurneivai*.

A genitália masculina de ambas as espécies apresenta claramente uma diferenciação ao nível do falo, especificamente no processo do endosoma (manuscrito N°1, Fig. 2 b, c) e no falosoma (Fig. 2 e, f). Concordando com Lent & Wygodzinsky (1979) caracteres da genitália masculina, e a conformação das asas parecem ser os caracteres mais úteis na efetiva discriminação destas espécies.

6.2. Sistemática

6.2.1. Existe alguma evidencia que suporte um grupo natural conformado por *T. maculata* e *T. pseudomaculata*?

Uma relação natural estreita entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* tem sido sugerida várias vezes na literatura. Schofield (1988) propôs que *T. pseudomaculata* se originou a partir de populações de *T. maculata* difundidas através da caatinga nordestina. Carcavallo et al. (2000) foram os primeiros em agrupar exclusivamente *T. maculata* e *T. pseudomaculata*, criando o “complexo *Triatoma maculata*” (“complexo *T. maculata*” ou “complexo *maculata*”). Posteriormente Dujardin et al. (2000) modificaram a classificação de Lent & Wygodzinsky (1979) e criaram para estas espécies o “subcomplexo *maculata*” (pertencente ao complexo *infestans* do subgrupo *infestans* do grupo *rubrofasciata*).

A validade do “subcomplexo *maculata*” foi pela primeira vez questionada explicitamente por Santos et al. (2007). Os dados apresentados por esses últimos autores levantaram a hipótese de que *T. maculata* não seria uma espécie próxima a *T. pseudomaculata* e, possivelmente, mais afinidades existiriam entre *T. pseudomaculata*, *T. arthurneivai* e *Triatoma* sp. (os autores especularam que poderia se tratar de *T. wygodzinskyi*). Os resultados aqui obtidos a partir das análises morfológicas e moleculares sustentam que o “subcomplexo *maculata*” proposto por Carcavallo et al. (2000) e Dujardin et al. (2000) não é válido como grupo natural. Evidências desta invalidade também podem ser observadas nos resultados obtidos por Hypša et al. (2002) e Paula et al. (2005), que mostraram uma alta diferenciação genética entre *T. maculata* e *T. pseudomaculata* e uma relação mais próxima entre *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi*. Também Belisário et al. (2007) concordam com estes resultados, baseando as suas conclusões fundamentalmente em hibridizações entre essas espécies.

Até a aplicação das modernas técnicas moleculares na sistemática dos triatomíneos, o grupamento dos Triatominae foi baseado em semelhanças fenotípicas e, em menor medida, nas suas relações comportamentais e ecológicas (Usinger et al., 1966; Carcavallo et al., 2000). Entretanto, se consideramos que as espécies que

compõem um grupo monofilético também devem apresentar proximidade genética, a existência do “subcomplexo *maculata*” é facilmente questionada. Evidentemente, os resultados semelhantes das análises morfológicas e filogenéticas obtidos nesta tese, apontam que somente *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* podem ser agrupados no mesmo grupo evolutivo e que *T. maculata* pertence a uma linhagem diferente, contradizendo a hipótese sobre a origem de *T. pseudomaculata* derivada a partir de *T. maculata* (Schofield, 1988). As evidências de similaridades também obtidas através do estudo de ciclo biológico favorecem este argumento. Ambas as espécies -*T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata*- apresentam o tempo total de desenvolvimento similar (da eclosão até a muda para adulto), sendo superior aos 200 dias. Entretanto, os tempos registrados para *T. maculata*, em experimentos usando a mesma fonte alimentar (camundongo) não ultrapassam os 130 dias. Esses resultados nos permitem postular que espécies “irmãs” poderiam ter características biológicas similares, como a duração do ciclo biológico.

Levando a consideração todas as evidências apresentadas, propomos a eliminação do “subcomplexo *maculata*” sugerido por Carcavallo et al. (2000) e Dujardin et al. (2000) e definimos o **novo** “subcomplexo *wygodzinskyi*”, conformado por *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata*. Possivelmente *T. arthurneivai* também forme parte deste grupo, já que os resultados de morfometria revelam uma proximidade fenética entre estas três espécies. Futuros estudos moleculares poderão confirmar esta hipótese.

6.3. Aspectos ecológicos, biológicos e epidemiológicos

6.3.1. A distribuição geográfica das espécies que compõem o grupo *wygodzinskyi* pode ser predita?

De forma veloz e desproporcionada, modificações ambientais estão sendo registradas no mundo inteiro decorrentes das atividades humanas (IPCC, 2007). Por tal motivo, técnicas dinâmicas que monitorem o planeta diariamente são necessárias para estabelecer sistemas de controle e de alertas (Gorla 2002b). Os Sistemas de Informação Geográfica (GIS) são plataformas que introduzem, armazenam, recuperam, manipulam, analisam e produzem dados que possuem atributos do espaço e que estão associados com ele (Ostfeld et al., 2005). Eles podem ser utilizados para localizar casos de doenças, distribuições de vetores e hospedeiros e estabelecer as relações espaço-temporais entre essas ocorrências de doenças e suas características ambientais.

Os modelos preditivos da distribuição geográfica de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* derivados de variáveis ambientais, demonstraram que é possível

estabelecer relações entre essas variáveis e a localização destas espécies. Imagens AVHRR já foram utilizadas em estudos de distribuição de *T. infestans*, *R. pallescens* e *T. brasiliensis*, por Gorla (2002a, b) e de *Rhodnius colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999 e *R. ecuadoriensis* Lent & León, 1958 por Gorla et al. (2005).

O modelo de distribuição para *T. pseudomaculata* baseado em imagens AVHRR mostra uma distribuição geográfica coincidente com as áreas propostas por Carcavallo et al. (1998b), ampliando a distribuição do vetor no Estado de Espírito Santo e excluindo-a do Mato Grosso do Sul. Diferentemente, o modelo de distribuição proposto para *T. wygodzinskyi* prediz uma área maior à atualmente conhecida pelos registros de presença por Lent & Wygodzinsky (1979) e Carcavallo et al. (1998b). Esta área não estaria restrita ao estado de Minas Gerais, mas também incluiria a sua presença nos Estados de São Paulo (confirmado pelas coletas realizadas durante este trabalho), Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Os mapas de distribuição para ambas as espécies podem ser projetados no mapa de províncias biogeografias proposto por Morrone (2006), baseado na panbiogeografia e análises cladísticas da entomofauna. Como resultado, o presente trabalho confirma que as áreas de distribuição de *T. pseudomaculata* estão principalmente associadas com a região da caatinga, com algumas áreas sobrepondo a região do cerrado (ver manuscrito N°4, Fig. 3). Estes são dois ecossistemas brasileiros de características xerofíticas. Em contraste, a área preditiva de distribuição para *T. wygodzinskyi* é associada com as províncias da Floresta de Paraná e da Floresta de *Araucaria angustifolia* (Fig. 3), áreas de menor rigorosidade nas condições ambientais. Os mapas preditivos sugerem uma área de distribuição muito maior que a conhecida para esta espécie prevendo-se prováveis novas ocorrências em zonas ainda não amostradas. Sendo *T. wygodzinskyi* uma espécie estritamente silvestre, o maior desafio ao modelo preditivo é precisamente a forte destruição dos habitats naturais a que se vê submetida atualmente sua área de distribuição.

6.3.2. *T. pseudomaculata* pode se dispersar através do vôo?

A capacidade de dispersão é um importante fator biológico por ser considerado um dos principais mecanismos envolvidos no movimento dos insetos a media e grandes distâncias. Os resultados obtidos demonstram a capacidade de *T. pseudomaculata* para se deslocar, atraída pela luz. A frequência de chegada observada para esta espécie foi similar à reportada por Noireau et al. (2000) usando armadilhas de luz para capturar *T.*

sordida e *T. guasayana*. Foram capturados menos exemplares de *T. pseudomaculata* se comparados com o resultado de coletas de *Triatoma protracta* (Uhler, 1894), *T. sordida* e *T. guasayana* (Sjogren & Ryckman, 1966, Noireau & Dujardin, 2001). Porém, estimamos que 1,7 adultos poderiam se dirigir por noite do ambiente silvestre para os domicílios atraídos pela luz (88% sendo *T. pseudomaculata*), permitindo a colonização das habitações. Os resultados de capturas para o principal vetor do Nordeste brasileiro, *T. brasiliensis*, também indicam que esta espécie é capaz de se dispersar ativamente. Dados da literatura (McEwen & Lehane, 1994; Lehane et al., 1992) sugerem que o processo ativo de colonização acontece quando fêmeas grávidas e famintas se deslocam à procura de fontes de alimentação. Segundo nossos resultados, tanto machos quanto fêmeas desta espécie podem ser igualmente motivadas a se aproximar a uma fonte de luz (manuscrito N° 5, Tabela 1). O mesmo foi recentemente demonstrado por Minoli & Lazzari (2006) em ensaios conduzidos em laboratório com *T. infestans* e *R. prolixus*. Os esforços de captura do *T. wygodzinskyi* com armadilha luminosa foram improdutivos, motivo pelo qual não se registraram dados de dispersão. Isto pode dever-se ao baixo esforço de coleta quando comparado com *T. pseudomaculata*, onde os esforços de captura se estenderam durante várias estações e por maior número de noites. Também é possível pensar que a capacidade de dispersão de *T. wygodzinskyi* seja baixa, motivo pelo qual, não seja reportada com frequência nos ambientes domiciliares. Talvez as colônias ou populações naturais encontrem em seus habitats, suficiente e freqüente disponibilidade de fontes alimentares, não se dispersando à procura de sangue. Esta última hipótese é reforçada pela improdutividade das capturas realizadas com armadilha com isca animal, o que permite supor haver um estado nutricional satisfatório de *T. wygodzinskyi* e, em conseqüência, uma não dispersão pelo vôo.

6.3.3. Qual é o estado alimentar de *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* em ambientes silvestre e peridoméstico?

Já no estudo efetuado para comparar o estado alimentar de populações silvestres e peridomésticas de *T. pseudomaculata*, os triatomíneos silvestres foram encontrados com deficiências significativas de alimentação. Todos os estádios coletados nesse ambiente apresentaram pesos baixos revelando um pobre estado alimentar quando comparados com os exemplares da mesma espécie coletados no ambiente peridoméstico. Por outro lado, no ambiente silvestre, o padrão alimentar muda

drasticamente durante as estações. Ninfas e adultos foram encontrados com maior peso, e supostamente melhor alimentados, durante a estação úmida em relação à época seca. A estação seca é um período com escassa fauna associada e fonte de sangue no habitat silvestre, sugerindo também que a dispersão ativa provavelmente possa acontecer com maior frequência durante esse período. Coincidentemente, os dados de vôo indicam que os adultos de *T. pseudomaculata* se dispersam com mais frequência durante essa estação.

Segundo as análises das fontes alimentares, a maior amplitude trófica se registrou em *T. pseudomaculata* no período seco quando 5/7 (71%) dos anti-soros usados foram positivos. Entretanto, a amplitude trófica diminuiu para 3/7 (43%) durante a estação úmida. No entanto, estes resultados baseados em amostragem pequena devem ser confirmados. As amostras de *T. pseudomaculata* correspondentes ao período úmido tiveram a hemolinfa de artrópode como principal fonte de alimentação e, coincidentemente, abundantes representantes da fauna de invertebrados foram observados co-habitando simultaneamente os nichos. Possivelmente, a hemolinfagia é uma fonte de nutrientes alternativa e sua utilização oportunista poderia ser considerada um remanescente comportamental do ancestral predador. A presença de hemolinfa também foi detectada nas fontes alimentares de *T. wygodzinskyi*, porém em menor proporção. Freitas et al. (2005) já haviam detectado este hábito em *T. pseudomaculata* provenientes de coletas peridomiciliarias no Ceará. Observações de campo têm sugerido que os triatomíneos coletados em ambientes silvestres ocasionalmente se alimentam da hemolinfa (Miles et al., 1981; Barrett, 1991; Salvatella et al., 1994) e estudos de laboratório confirmaram que algumas espécies podem completar seu ciclo de vida alimentando-se em baratas (Salvatella et al., 1994; Lorosa et al., 2000; Ruas-Neto et al., 2001). Recentemente, um estudo analisando os padrões de alimentação de *Belminus herrerii* Lent & Wygodzinsky, 1979 mostrou que a barata pode ser a única fonte alimentar identificada (Sandoval et al., 2004). Mas, apesar destes relatos sobre a possível ocorrência da hemolinfagia nos Triatominae, estudos prévios dedicados à determinação das fontes de alimentação não consideraram esta possibilidade (Carcavallo et al., 1998d).

Os resultados das fontes de alimentação em ambiente peridoméstico mostraram as aves como principal fonte alimentar de *T. pseudomaculata*, concordando com os dados apresentados por Freitas et al. (2005). As galinhas têm sido reportadas como a principal fonte de alimentação de *T. infestans*. Seriam responsáveis pela manutenção de

abundantes colônias nas habitações humanas (Cecere et al., 1997; Gürtler et al., 1998). Entretanto, no ambiente silvestre de Curaçá, BA, nossos resultados parecem indicar que as aves não são a fonte sanguínea primordial de *T. pseudomaculata* que, conseqüentemente, não seria um triatomíneo ornitófilo.

6.3.4. *Apresenta T. pseudomaculata uma plasticidade comportamental em relação ao seu habitat, quando se muda do ambiente silvestre para o peridomicílio?*

Foi realizado um estudo sobre *T. pseudomaculata* e *T. juazeirensis* (*T. brasiliensis*, da Bahia, recentemente descrita por Costa & Felix, 2007) para conhecer a seleção de hábitat destas espécies em ambientes silvestre e peridoméstico. Os resultados mostraram claramente um completo isolamento entre *T. pseudomaculata* e *T. juazeirensis*. A última espécie, assim como as outras formas melânicas do “grupo *brasiliensis*”, é encontrada exclusivamente em rochas (Costa et al., 1998; Dias-Lima et al., 2003). Por outro lado, *T. pseudomaculata* é uma espécie arborícola encontrada em buracos de árvores e ninhos de aves também localizados nas árvores. Com respeito a esta espécie, os resultados discordam dos de Barretto (1967), um trabalho que reporta a ocorrência de *T. pseudomaculata* em cavidades rochosas. No peridomicílio as duas espécies são encontradas em diversos ambientes, mas tanto *T. pseudomaculata* quanto *T. juazeirensis* mostram uma marcada preferência por construções em madeira, um substrato que a última espécie nunca coloniza no médio silvestre. Estas observações conflitam com as de Sarquis et al. (2006) que sugerem que, no Ceará, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* tendem a colonizar ecotopos similares ao ambiente natural. Nossos resultados mostraram também uma associação significativa entre estruturas freqüentadas por cabras (principalmente currais) e a ocorrência de grandes colônias de *T. juazeirensis*, concordando com Walter et al. (2005). Finalmente, o conjunto destes resultados demonstra que existe uma plasticidade comportamental que permite a ambas as espécies colonizar, no peridomicílio, substratos que não ocupam no ambiente silvestre.

6.3.5. *T. pseudomaculata e T. wygodzinskyi apresentam taxas elevadas de infecção natural pelo T. cruzi?*

Os resultados obtidos revelaram uma baixa taxa de infecção por *T. cruzi*. Foram encontrados apenas três adultos de *T. wygodzinskyi* infectados com o parasita coletados em Pião e Sertãozinho, MG. Este é o primeiro registro de infecção natural para esta

espécie. Existe um registro prévio de infecção para uma fêmea de *T. arthurneivai* coletada em Itaúna, MG (Barretto & Riveiro, 1981). Devido ao fato de que os registros desta espécie fora da Serra do Cipó são duvidosos e que estes corresponderiam a *T. wygodzinskyi* (manuscrito N°1), a identidade taxonômica do inseto positivo registrado por Barretto & Riveiro (1981) fica sujeita a reavaliação.

No caso de *T. pseudomaculata*, é notável a ausência de infecção natural por *T. cruzi* na região norte da Bahia. Resultados negativos foram encontrados na mesma área de estudo por Santos (2003) e Emperaire & Romaña (2007). Um estudo sobre os triatomíneos peridomiciliados do Nordeste brasileiro realizado por Costa et al. (2003) revelou uma taxa de infecção de 0.9% para esta espécie. Segundo esses autores, essa taxa, relativamente baixa, poderia dever-se à associação desta espécie com aves, refratárias da doença. Porém, nossos resultados mostraram que aves não são a fonte principal destes triatomíneos no ambiente silvestre.

Dados epidemiológicos revelam que *T. juazeirensis* apresentaria um avançado processo sinantrópico na Bahia e, por causa desse fato, poderia ser um vetor da doença de Chagas de importância local (Silveira & Vinhaes 1998; Dias et al., 2002; Costa et al., 2003). *T. juazeirensis* e as outras formas melânicas de *T. brasiliensis* comporiam o conjunto de vetores primários na região semi-árida do Nordeste do Brasil (Costa et al., 2003). Porém, o papel exercido por cada população melânica que forma o complexo *T. brasiliensis* continua incerto e precisaria ser esclarecido. Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, *T. pseudomaculata* representou mais de 20% das capturas em ambientes humanos no estado da Bahia, em 1998, enquanto *T. juazeirensis* (citado como *T. brasiliensis* nos relatórios) correspondeu a somente 10%. Nossos resultados mostram que estas espécies não são comumente encontradas no interior das casas no estado da Bahia, e apresentam muito baixa infecção por *T. cruzi*. Não obstante, considerando sua alta prevalência no peridomicílio e seu elevado potencial para recolonizar os ambientes antrópicos (tratados por inseticida) a partir de populações silvestres, tanto *T. pseudomaculata* quanto *T. brasiliensis* (e suas formas melânicas) devem ser considerados como vetores secundários e motivo de contínuo controle (Diotaituti et al. 2000, Dias 2006).

7. CONCLUSÕES

- ✚ *Triatoma maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. arthurneivai* e *T. wygodzinskyi* são taxa bem definidos independentemente das suas similitudes externas, sendo diferenciáveis morfológica ou molecularmente.
- ✚ O “complexo *T. maculata*” segundo Carcavallo et al. (2000) ou “subcomplexo *maculata*” segundo Dujardin et al. (2000) constitui um grupo polifilético e, portanto, deve ser desconsiderado.
- ✚ A criação de um novo grupo chamado “subcomplexo *wygodzinskyi*” contendo *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata*, é proposta sob a base da sua proximidade filogenética além das elevadas similaridades morfológicas, morfométricas, moleculares e biológicas. *T. arthurneivai* se apresenta como um possível candidato a formar parte deste grupo. Também se descarta a hipótese que propôs que *T. pseudomaculata* poderia ter sido originada a partir de populações que ficaram isoladas durante o processo de dispersão de *T. maculata*.
- ✚ Os dados de distribuição geográfica, biologia e ecologia disponíveis na literatura sobre *T. arthurneivai* e *T. wygodzinskyi* eram poucos e confundidos.
- ✚ Os registros de *T. arthurneivai* fora da sua localidade tipo na Serra do Cipó correspondem a erros de identificação com *T. wygodzinskyi*.
- ✚ *T. pseudomaculata* pode-se dispersar ativamente através do voo quando atraída pela luz artificial, favorecendo assim, a possibilidade de ingressar e instalar-se nas construções artificiais, e conseqüentemente se associar com o homem.
- ✚ A distribuição geográfica conhecida de *T. pseudomaculata* é congruente com os modelos de distribuição preditivos obtidos a partir do sensoriamento remoto, ficando associada às províncias biogeográficas de caatinga e cerrado. Os modelos de distribuição geográfica obtidos a partir de sensoriamento remoto para *T. wygodzinskyi* predizem uma distribuição mais ampla que a conhecida,

estendendo-se pelas províncias biogeográficas do Bosque Paranaense e Bosque de *Araucaria angustifolia*.

- ✚ *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata* apresentam ciclos biológicos de duração parecida superior a 200 dias, o que reforça a hipótese que sejam espécies irmãs.
- ✚ Para alcançar o estado adulto, *T. pseudomaculata* ingere uma quantidade de sangue maior do que *T. wygodzinskyi*.
- ✚ Em ambiente silvestre, *T. pseudomaculata* é uma espécie arborícola estrita, encontrada em troncos de árvores (sem preferências) e ninhos de aves e roedores.
- ✚ *T. pseudomaculata* embora não apresente uma significativa habilidade para colonizar o domicílio, tem uma ampla capacidade para invadir estruturas peridomésticas e, uma vez nesse ambiente sinantrópico, possui a capacidade de colonizar substrato que não seja madeira.
- ✚ As populações silvestres de *T. pseudomaculata* apresentam um déficit alimentar marcante quando comparadas com populações peridomésticas. Este déficit alimentar, associado à capacidade de dispersão pelo vôo, poderia favorecer a invasão e colonização das estruturas sinantrópicas.
- ✚ *T. pseudomaculata* e *T. wygodzinskyi* podem-se alimentar tanto de sangue de vários tipos de vertebrados quanto da hemolinfa de artrópodes, caracterizando assim, uma hemolinfagia residual.

8. REFERÊNCIAS

- Abad-Franch F & Monteiro FA 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc*, 77: 437-454.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, Patterson JS, Miles MA 2003. Phylogenetic relationships among members of the Pacific *Rhodnius* lineage (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol*, 2: 244–245.
- Amorim DS 1982. Classificação por seqüenciação: uma proposta para a denominação dos ramos retardados. *Rev Bras Zool*, 1(1):1-9.
- Arganaraz ER, Hubbard GB, Ramos LA, Ford AL, Nitz N, Leland MM, Vandeberg JL, Teixeira, AR 2001. Blood-sucking lice may disseminate *Trypanosoma cruzi* infection in baboons. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 43: 271-6.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers LE Jr, Fornaciari G, Allison M 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci* 101: 203-209.
- Baldwin JD, Bass AL, Bowen BW, Clark WH 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Mol Phylogen Evol* 10: 399-407.
- Bargues MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2000. Nuclear rDNA based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95: 67-573.
- Barrett TV 1991. Advances in triatomine bug ecology in relation to Chagas disease. *Adv Dis Vect Res*, 80: 142-176.
- Barretto MP 1966. Aspectos da epidemiologia da tripanossomíase americana, infecção com focos naturais, com especial referencia à região do Estado de São Paulo. Ph D these Fac. Farm. Odonto. Ribeirão Preto, SP, 139 pp.
- Barretto MP 1967. Estudo sobre reservatórios o vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XIX. Inquérito preliminar sobre triatomíneos silvestres no Sudeste do Estado de Goiás, *Rev Bras Biol*, 9: 313-320.
- Barretto MP, Ferraz de Siqueira A, Da Rocha Carvalheiro J, Ferriolli Filho F, Ruas Fernandes LA 1975. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. Distribuição geográfica de triatomíneos na Bacia Hidrográfica do Rio Grande, Brasil. *Rev Bras Biol*, 35 (1): 21-30.

- Barretto MP & Ribeiro RD 1981. Estudo sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXXVII. Observações sobre a ecologia do *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940 (Hemiptera, Reduviidae). Rev Bras Zool, 41: 317-320.
- Belisário CJ, D'Avila GCP, Diotaiuti L 2007. Biological aspects between the crosses between *T. maculata* (Erichson, 1848) and *T. pseudomaculata* Correa & Espínola, 1964 (Hemiptera: Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz (In press).
- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L 2005. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceara State, Northeastern Brazil. Acta Trop, 93 (1):119-26.
- Bremer K. 1994. Branch support and tree stability. Cladistics, 10: 295-304.
- Burkot, TR, Goodman WG, De Foliartt GR. 1981. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 30: 1336-1341.
- CDC 2006 : http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/chagasdisease/factsht_chagas_disease.htm.
- Canale D, Jurberg J, Carcavallo R, Galvão C, Galindez-Girón I, Mena Segura C, Rocha D, Martinez A. Bionomia de algumas espécies. In: Atlas of Chagas Disease Vectors in the Américas, Vol. 3, Carcavallo RU, Galindez Girón I, Jurberg J, Lent H Org., Fiocruz Ed., Rio de Janeiro, Brazil: 349-890, 1998
- Carbajal de la Fuente AL & Catalá SS 2002. Relationship between antennal sensilla pattern and habitat in six species of Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz, 97 (8): 1121–1125.
- Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H. Filogenia de Triatomíneos. In: Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, eds.; Rio de Janeiro: Fiocruz, vol. 3, 1998a.
- Carcavallo RU, Curto de Casas S, Sherlock I, Giron IG, Jurberg J, Galvão C, Mena Segura C & Noireau F. Distribuição geográfica e dispersão alti-latitudinal dos triatomíneos. In: Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, eds.; Rio de Janeiro: Fiocruz, vol. 3, pp. 747-792, 1998b.
- Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Galvão C, Lent H. Chaves gráficas para as tribos, gêneros e espécies da subfamília Triatominae. In: Atlas of Chagas

- disease vectors in the Americas. Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, eds.; Rio de Janeiro: Fiocruz, vol. 1, pp.107-244, 1998c.
- Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvão C 2000. Phylogeny of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) proposal for taxonomic arrangements. *Entomol Vect* 7 (1): 1-99.
- Carcavallo RU, Rocha DS, Galíndez Girón I, Sherlock I, Galvão C, Martínez A, Tonn R, Cortón E. Feeding sources and patterns. In: Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Carcavallo RU, Girón IG, Jurberg J, Lent H, eds.; Rio de Janeiro: Fiocruz, vol. 2, pp. 537-560, 1998d.
- Catalá S 1996a. Los patrones de sensilla en Triatominae. Una propuesta para el estudio de las tendencias adaptativas de la subfamilia. In CJ Schofield, JP Dujardin, J Jurberg (eds) Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae, Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, INDRE, Mexico City, p. 59-62.
- Catalá S. 1997a. Sensilla associated with the rostrum of eight species of Triatominae. *J Morphol*, 228 (2): 195-201.
- Catalá S 1997b. Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a comparative study of five genera. *Int J Insect Morphol Embryol* 26: 6-73.
- Catalá S & Dujardin JP 2001. Antennal sensilla patterns indicate geographic and ecotopic variability among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *J Med Entomol*, 38 (3), 423–428.
- Catalá SS, Maida D, Caro-Riaño H, Jaramillo N, Moreno J 2004. Changes Associated with Laboratory Rearing in Antennal Sensilla Patterns of *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, and *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (1): 25-30.
- Catalá S, Sachetto C, Moreno M, Rosales R, Salazar-Schettino PM, Gorla D 2005. Antennal phenotype of *Triatoma dimidiata* populations and its relationship with species of *phyllosoma* and *protracta* complexes. *J Med Entomol*, 42: 719-25.
- Catalá S & Torres M 2001. Similarity of the patterns of sensilla on the antennae of *Triatoma melanosoma* and *Triatoma infestans*. *Ann Trop Med Parasitol* 95 (3): 287–295.
- Cecere MC, Gürtler RE, Chuit R, Cohen JE 1997. Effects of chickens on the prevalence of infestation and population density of *Triatoma infestans* in rural houses of north-west Argentina. *Med Vet Entomol*, 11(4): 383-8.

- Cecere MC, Vázquez-Prokopec GM, Gürtler R, Kitron U 2004. Spatio-Temporal Analysis of Reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Following Insecticide Spraying in a Rural Community in Northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*, 71 (6): 803-810.
- Chagas C 1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1: 159- 218.
- Chagas C 1912. Sobre um trypanosomo do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pela *Triatoma geniculata* Latr. (1811). Possibilidade de ser o tatu um depositario do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior (Nota prévia). *Brasil-Medico*, 26: 305-306.
- Chesser RK 1998. Heteroplasmy and Organelle Gene Dynamics. *Genetics* 150(3): 1309 - 1327.
- Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am J Trop Med H* 37: 37- 41.
- Corrêa RR, Alves UP, Noda J 1965. Nota sobre o *Triatoma arthurneivai*. Seu criadouro extradomiciliar (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Malar Doenças Trop*, 17: 217-232.
- Corrêa R, Pinto Alves U, Pascale G 1962. Presença do *Triatoma arthurneivai* em Sorocaba (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Paul Med*, 60: 267.
- Costa J, Almeida JE, Britto C, Duarte R, Marchon-Silva V, Pacheco RS 1998. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93 (1): 7-13.
- Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, Beard CB 2003. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 443-449.
- Costa J & Felix M 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102 (1): 87-90.
- Coura JR 2005. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Ed. Guanabara Koogan – Rio de Janeiro. pp 557.

- Darwin CR 1871. The voyage of the Beagle. Disponível em: <http://www.literature.org/authors/darwin-charles/the-voyage-of-the-beagle/>
- Dias JCP 2002. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa internacional 1991/2001 (Silveira AC et al.). Uberaba: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro.
- Dias, JCP 2006. Descentralización y enfermedad de Chagas, Brasil, 2005. In: Descentralização e gestão do controle das enfermidades transmissíveis na América Latina (Yadón, Zaida – ed.). Buenos Aires, Argentina: OPS, 2006. 320 pp.
- Dias JCP, Machado EMM, Fernandes AL, Vinhaes MC 2000. General situation and perspectives of Chagas disease in Northeastern Region, Brazil. Cad Saúde Públ, 16 (2):13-34.
- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin América. A review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 97: 603-612.
- Dias-Lima, AG, D Menezes, I Sherlock and Noireau F. 2003. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol 40: 989-990.
- Diotaiuti L, Loiola CF, Falcão PL, Dias JCP 1993. The ecology of *Triatoma sordida* in natural environments in two different regions of the state of Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo, 35(3): 237-245.
- Diotaiuti L, Faria Filho O, Carneiro F, Pinto Dias J, Pires H, Schofield CJ 2000. Doença de Chagas no Brasil. Cad Saúde Públ, 16: 61-67.
- Duarte R, 1997. Ensaio Imunoenzimático ELISA para Identificação Experimental de Fontes Alimentares em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae), MSc Tese, IOC-Fiocruz, 103 pp.
- Dujardin JP, Beard CB, Ryckman R 2007. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. Infect Gen Evol 7(2): 161-167.
- Dujardin JP, Panzera P, Schofield C 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, Classe des Sciences Naturelles et Médicales, NS 24 (5), 162 pp.

- Dumonteil E & Gourbière S 2004. Predicting *Triatoma dimidiata* Abundance and Infection Rate: A Risk Map for Natural Transmission of Chagas Disease in the Yucatán Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 70(5): 514-519.
- Empereaire L & Romaña C 2006. Triatominae e Cactaceae: un risque pour la transmission de la Trypanosomose Americana dans le peridomicile (nord-est du Brésil). *Parasite* 13 (2):171-178.
- Espínola H, Rodriguez F, Bermudez M, Tonn R 1981. Informaciones sobre la biología y el ciclo de vida de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), en condiciones de laboratorio. *Bol Dir Malariol*, 21: 140-142.
- Feliciangeli MD, Campbell-Lendrum D, Martinez C, Gonzalez D, Coleman P, Davies C 2003. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. *Trends Parasitol*, 19: 44- 49.
- Feliciangeli MD, Rabinovich J 1985. Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions II. *Triatoma maculata*. *J Med Entomol*, 22: 43-48.
- Fornaciari G, Castagna M, Viacava P, Togneti A, Bevilacqua G, Segura EL 1992. Chagas disease in Peruvian Incan mummy. *Lancet*, 339: 128-129.
- Forattini OP, Juarez E, Rabello EX 1968. Dados sobre a biologia do *Triatoma arthurneivai* no sudeste do Estado de São Paulo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Saúde Públ*, 2: 186-193.
- Forattini OP, Rabello EX, Pattoli DG 1972. Aspectos ecológicos da tripanosomose Americana. IV-Mobilidade de *Triatoma arthurneivai* em seus ecótopos naturais. *Rev Saúde Públ*, 6: 183-187.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA 2002. Genetic diversity. In: *Introduction to conservation Genetics*. Cambridge University Press 45- 70.
- Freitas S, Lorosa E, Silva Rodrigues CD, Freitas A, Gonçalves TCM 2005. Fontes alimentares de *Triatoma pseudomaculata* no Estado do Ceará, Brasil. *Rev Saúde Públ*, 39 (1): 27-32.
- Galvão AB 1973. Contribuição ao conhecimento do *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e do *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Soc Bras Med Trop*, 7 (6): 365-380.
- Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae)

- and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202: 1-36.
- Garcia AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Valente SA, Frame I A, Stothard R, Miles M 1998. Random Amplification of Polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol*, 35: 38-45.
- García BA, Manfredi C, Fichera L, Segura EL 2003. Short report: variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg*, 68: 692–694.
- García BA, Moriyama EN, Powell JR 2001. Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic relationships. *J Med Entomol*, 38: 675–683.
- Giordano R, Pizarro Cortez JC, Paulk S, Stevens L 2005. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(7): 753-760.
- Goloboff PA, Farris JS 2001. Methods for quick consensus estimation. *Cladistics*, 17: 26-34.
- Goloboff P, Farris JS, Kallersjo M, Oxelman B, Ramirez MJ, Szumik CA 2003. Improvements to resampling measures of group support. *Cladistics*, 19: 324-32.
- Goloboff P, Farris JS, Nixon K 2003. T.N.T.: Tree Analyzing Using New Technology. Program and documentation, available from the authors, and at www.zmuc.dk/public/phylogeny.
- Gonçalves TCM, Cunha V, Oliveira E, Jurberg J 1997. Alguns aspectos da biologia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 275-280.
- Gonçalves TCM, Mallet JRS, Ramos LB, Souza SCS, Lima NRC, Santos SM, Lopes, CM 2006 Levantamento e monitoramento de triatomíneos em área de influência da Usina hidrelétrica Peixe Angical (TO). In: XXII Reunião Anual de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, Uberaba, Brasil. *Rev Bras Med Trop*.

- Gorla DE 2002a. Remotely sensed environmental variables as indicators of *Triatoma infestans* distribution. *Ecol Austral*, 12: 117-127.
- Gorla DE 2002b. Sensores Remotos y Sistemas de Información Geográfica en el estudio de vectores de enfermedades humanas. In: Actualizaciones en entomología sanitaria argentina, Serie Enfermedades Transmisibles (Salomon Ed.). 203-211 pp.
- Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ 1997 Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Trop*, 63: 127-140.
- Gorla DE, Porcasi X, Catalá S 2005. Sistemas de información geográfica y sensores remotos como herramientas en los programas de control vectorial de la enfermedad de Chagas. In: Memorias del Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia, 2-6 de mayo de 2005. 265- 278.
- Gracco M & Catalá S 2000. Inter-specific and developmental differences on the array of antennal chemoreceptors in four species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95: 67-74.
- Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D 2007. Actualización de la distribución geográfica y ecoepidemiología de la fauna de triatominos (Reduviidae: Triatominae) en Colombia. *Biomédica*, 27(1):143-62.
- Guarnieri AA, Pereira MH, Diotaiuti, L 2000. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *J Med Entomol*, 37 (3): 373-379.
- Gumiel M, S Catalá, F Noireau, A Rojas de Arias, A García, and J P Dujardin 2003. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Syst Entomol*, 28: 173-179.
- Gürtler RE, Cohen JE, Cecere MC, Lauricella MA, Chuit R, Segura EL 1998. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. *Am J Trop Med Hyg*, 58(6):748-58.
- Heitzmman-Fontenelle T 1976. Bionomia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em laboratório. *Studia Ent*, 19: 201-210.

- Hypša V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego ROM, Galvão C, Jurberg J 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phyl Evol*, 23:447-457.
- Ianni BA & Mady C 2005. The Sugarcane Juice was Delicious, but...*Arq Bras Cardiol*, 85 (6): 379-380.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis. In: Intergovernmental Panel on Climate Change. Disponível em: <http://www.ipcc.ch>.
- Jaramillo N 2004. La variabilidad morfológica y la morfometría geométrica. In: *Morfología y Morfometría Aplicadas a la Taxonomía de los vectores de la Enfermedad de Chagas* (Vallejo & Carranza ed). Curso Taller internacional. Universidad de Tolima. Ibagué, Colombia 135 pp.
- Jaramillo N, D Castillo, ME Wolff 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(5): 667-673.
- Jeannel R 1919. Henicocephalidae et Reduviidae. In *Voyage de Ch. Alluaud et R. Jeannel en Afrique orientale (1911-1912). Resultats scientifiques – Hemiptera*, Paris, 3: 131-314.
- Juarez E 1970. Observações sobre o ciclo evolutivo do *Triatoma arthurneivai* em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Saúde Públ*, 4: 13-18.
- Kimura M 1980. A simple method for estimating evolutionaty rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 16: 111-120.
- Klingenberg CP 2002. Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanis. *Gene* 287: 3-10.
- Kumar S, Tamura K & Nei M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment Briefings in Bioinformatics 5:150-163.
- Lehane MJ, McEwen PK, Whitaker CJ, Schofield CJ 1992. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Trop*, 52: 27-38.
- Lent H 1951. Novo *Triatoma* no Estado de Minas Gerais (Brasil) (Hemiptera: Reduviidae). *Rev Entomol*, 22(1-3): 349-353.

- Lent H & Martins V 1940. Estudos sobre os triatomíneos do Estado de Minas Gerais, com descrição de uma nova espécie. Rev Entomol 2(3): 877-886.
- Lent H & Jurberg J 1980. Comentários sobre a genitália externa masculina em *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera, Reduviidae). Rev Brasil Biol, 40 (3): 611-627.
- Lent H & Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Am Mus Nat Hist, 163: 127-520.
- López A, Crocco L, Morales G, Catalá S 1999. Feeding frequency and nutritional status of peridomestic populations of *Triatoma infestans* from Argentina. Acta Trop, 73(3):275-81.
- Lorosa ES, Jurberg J, Souza AL, Vinhaes MC, Nunes IM 2000. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Entomol Vect, 7: 287-296.
- Luitgards-Moura JF, Borges-Pereira J, Costa J, Zauza PI, Rosa-Freitas MG 2005. On the possibility of autochthonous Chagas disease in Roraima, Amazon Region, Brazil. 2000-2001. Rev Inst Med trop São Paulo, 47: 45-54.
- Luitgards-Moura JF, Vargas AB, Almeida CE, Magno-Esperança G, Agapito-Souza R, Folly-Ramos E, Costa J, Tsouris P, Rosa-Freitas MG 2006. A *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population from Roraima, Amazon Region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. Rev Inst Med Trop São Paulo, 47: 131-137.
- Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg, 60: 377-386.
- Machado de Assis, GF, Azeredo BVM, Carbajal de la Fuente AL, Diotaiuti L, Lana M 2006. Colonização de ecótopo artificial por *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, em Berilo, Vale do Jequitinhonha, MG, Brasil. Resumos da XXII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses, Uberaba, Brasil.
- Martínez FH, GC Villalobos, AM Cevallos, P De la Torre, JP Laclette, R Alejandre-Aguilar, B Espinoza 2006. Taxonomic study of the Phyllosoma complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological

- importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 41 (2): 279-287.
- Martins V 1941. Infecção experimental do *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins, 1940, pelo *Schizotrypanum cruzi*. *Rev. Semanal Med Cirurgia*, 55(9): 131-132.
- Matías A, de la Riva JX, Torrez M, Dujardin JP 2001. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by wings. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 947-950.
- McEwen PK & Lehane MJ 1994. Relationship between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera., Reduviidae). *J Appl Ent*, 117: 217-223.
- Miles MA, de Souza AA, Povoá M 1981. Chagas disease in the Amazon Basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera, Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará state, Brazil. *J Med Entomol*, 18: 266-278.
- Miles MA, Feliciangeli MD, Arias AR 2003. American trypanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Med J*, 28: 1444-1448.
- Minoli S & Lazzari C 2006. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. *Acta Trop*, 97: 324-330.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol*, 12: 997–1006.
- Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol*, 32: 46–56.
- Moreno ML, Gorla D, Catalá S 2005. Association between antennal phenotype, wing polymorphism and sex in the genus *Mepraia* (Reduviidae: Triatominae). *Infec Gen Evol* 6: 228-234.
- Morrone J 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Ann Rev Entomol*, 51: 467-494.
- Nery-Guimarães F, Silva NN, Clausell DT 1968. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrida em Teutônia (Estrela-Rio Grande do Sul). *Hospital (Rio de Janeiro)* 73: 1767-804.

- Nei M 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Ann Rev Genetics*, 30: 371-403.
- Nei M & Kumar S 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford.
- Noireau F, Carbajal de la Fuente AL, Macedo LC, Diotaiuti L 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An Acad Bras Cienc*, 77(3): 1-6.
- Noireau F, & Dujardin JP 2001. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 385-389.
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Abad-Franch F, Flores E, Vargas F 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other wild triatomines in the Bolivian Chaco. *T Roy Soc Trop Med H*, 94: 23-27.
- Noireau F, Flores R, Vargas F 1999. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Tr Roy Soc Trop Med Hyg*, 93: 13-14.
- Noireau F, Zegarra M, Ordoñez J, Gutierrez T, Dujardin JP 1999. Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) domestic populations from Bolivia: application on control interventions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 347-351.
- Oliveira-Lima JW, Faria Filho OF, Viera JBF, Gadelha FV, Oliveira Filho A-M 2000. Peridomiciliary changes and implications for *Triatoma brasiliensis* control. *Cad Saúde Públ*, 16 (2): 61-67.
- Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F 2005. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol Evol*, 20 (6): 328-336.
- Palumbi SR, Benzie J 1991. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid shrimp. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1: 27-34.
- Paula AS, Diotaiuti L, Schofield CJ 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol Phylog Evol*, 35: 712–718.
- PAHO 2006. Comunicado de prensa: OPS/OMS certifica a Brasil por haber logrado interrumpir la transmisión vectorial del Mal de Chagas. Disponível em: www.paho.org/Spanish/DD/PIN/ps060616.htm
- Pellegrino J 1948. Distribuição e índice de infecção dos triatomídeos transmissores da doença de Chagas no sudoeste de Minas Gerais. *Rev Brás Méd*, 5 (8): 555- 566.

- Pellegrino J 1950. Novos dados sobre a distribuição de triatomídeos e sua infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* no estado de Minas Gerais (Brasil). Mem Inst Oswaldo Cruz, 48: 639 -667.
- Pellegrino J 1951. Transmissores da doença de Chagas no estado de Minas Gerais. Rev Ass Méd M.G., 2(1): 43-66.
- Perlowagora-Szumlewics A 1976. Laboratory colonies of Triatominae, biology and population dynamics. In New Approaches in American Trypanosomiasis Research. PAHO/WHO Sci Publ 318: 63-82.
- Pereira MH, Gontijo NF, Guarneri AA, Sant'Anna MRV, Diotaiuti L 2006. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. Trends Parasitol, 22 (11): 516-520.
- Pérez-Gutiérrez E, Salvatella R, Figueroa R, Prata A, Figueiredo A, Junqueira A, De Castro A, Silveira AC, Abad-Franch, F, Hoffmann H, Nascimento J, Herrera J, Dias JCP e outros. Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos. Rev Soc Bras Med Trop, 39: 512-514.
- Pfeiler E, Bitler BG, Ramsey JM, Palacios-Cardiel C, Markow TA 2006. 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(1): 209-221.
- Pinto Alves U & Noda J 1964. Os transmissores da doença de Chagas da região de Sorocaba no Estado de São Paulo, Brasil. Arq Hig Saúde Publ, 29: 141-157.
- Pinto Soares RP, Evangelista LG, Soares Laranja L, Diotaiuti L 2000. Population Dynamics and Feeding Behavior of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata*, Main Vectors of Chagas Disease in Northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 95(2): 151-155.
- Rosa JA, Medeiros MP, Cilense M, Barata JMS 2005. Morphological study of the thorax of the five nymphal instars of *Triatoma arthurneivai* Lent & Martins (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Rev Bras Entomol, 49(3): 289-293.
- Rothhammer F, Allison MJ, Nuñez L, Staden V, Arriza B 1985. Chagas disease in pre-Columbian South America. Am J Phys Anthropol, 68: 495- 98.
- Ruas-Neto AL, Corseuil E, Cavalleri A 2001. Development of rupestrian triatomines (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) following hemolymphagy on Blaterids

- (Blattodea: Blabbaridae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Entomol Vect*, 8: 205-216.
- Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, García BA 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica*, 121: 229-240.
- Saitou N & Nei M 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406-425.
- Salvatella R, Calegari L, Puime A, Basmadjian Y, Rosa R, Guerrero J, Martinez M, Mendaro G, Briano D, Montero C, Wisniversky-Colli C 1999. Perfil alimentario de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Triatominae) en ambitos peridomiciliares de una localidade rural de Uruguay. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 36: 311-320.
- Sanchez-Martin MJ, Feliciangeli MD, Campbell-Lendrum D, Davies CR 2006. Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised by reinvasion of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations?. *Trop Med Int Health*, 11(10):1585-93.
- Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha D, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99: 137-140.
- Sanger FS, Nicklen S, Coulson AR 1977. DNA sequencing with chain terminator inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–5467.
- Santos S 2003. Estudo molecular de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espinola, 1964 e espécies afins: Rastreamento genético populacional e suas implicações na taxonomia e epidemiologia. M.Sc. Tese, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil.
- Santos S, Lopes C, Dujardin JP, Panzera F, Pérez R, Carbajal de la Fuente AL, Pacheco R, Noireau F 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infect Gen Evol*, 7: 469-475.
- Sarquis O, Guedes OT, Mac Cord R, Cabello PH, Borges-Pereira J, Lima MM 2006. Aspects of peridomiciliary ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil

- associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz, 101(2): 143-147.
- Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gurtler RE 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. J Med Entomol, 41(4): 643-9.
- Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde do Brasil (SVS/MS) 2005. Consenso Brasileiro em doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop, 38 (3): 1-29.
- Schaefer CW 2003. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic Questions and Some Others. Neotrop Entomol, 32(1): 001-010.
- Schofield CJ 1988. Biosystematics of the Triatominae. In: Biosystematics of Haematophagous Insects. Clarendon Press, Oxford, UK, 37: 284-312.
- Schofield CJ 1994. Triatominae – Biology & Control. West Sussex: Eurocommunica Publications.
- Schofield CJ 2000a. Biosystematics and evolution of the Triatominae. Cad. Saude Publ, 16: 89–92.
- Schofield CJ 2000b. *Trypanosoma cruzi* - the vector-parasite paradox. Mem Inst Oswaldo Cruz, 95: 535-544.
- Schofield CJ, Dolling WR 1993. Bedbugs and kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). In R.P. Lane & R.W. Crosskey (eds.), Medical insects and arachnids. London, England: Chapman and Hall.
- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP 1999. The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94 (I): 375-378.
- Schofield CJ, Dujardin JP 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. Actualités Biologiques, 21: 183-197.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol, 22 (12): 583-588.
- Shikanai-Yasuda MA, Marcondes CB, Guedes LA 1991. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo, 33: 351-7.
- Silveira AC 2000. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. Cad Saude Públ, 16 (2): 35-42.
- Silveira AC & Vinhaes M 1998. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. Rev Soc Bras Med Trop, 31: 15-60.

- Solano P, Dujardin JP, Schofield CJ, Romana C, Tibayrenc M 1996. Isoenzymes as a tool for identification of *Rhodnius* species. Res Rev Parasitol 56: 41-47.
- Souza LC, FCC Frota, JA Souza, JWO Lima 1999. Descrição de um foco urbano de *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), na cidade de Sobral, norte do Ceará. Resultados preliminares. Rev Soc Bras Med Trop, 32: 84-85.
- Sjogren RD & Ryckman RE 1966. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North America. . Nocturnal flights of *Triatoma protracta* (Uhler) as indicated by collections at black light traps (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J Med Entomol, 3 : 81-92.
- Usinger RL 1943. A revised classification of the Reduvidae with a new subfamily from South America (Hemiptera). Ann Entomol Soc Am, 36: 602-617.
- Usinger RL, Wygodzinsky P, Ryckman RE 1966. The biosystematics of Triatominae. Ann Rev Entomol, 11: 309-330.
- Valente SAS, Pimentel, OS, Valente VC 2001. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém. Primeiro registro no oeste do Pará. Rev Soc Bras Med Trop, 34 (1):19-20.
- Villegas J, Feliciangeli MD, Dujardin JP 2002. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). Infect Gen Evol, 2: 121-128.
- Walter AE, Pojo do Rego I, Ferreira AJ, Rogier C 2005. Risk factors for reinvasion of human dwellings by sylvatic triatomines in northern Bahia State, Brazil. Cad Saúde Públ, 21: 974-978.
- WHO 2002. *Control of Chagas disease*. Technical Report Series no. 905, Geneva, pp. 109.
- WHO 2006: (<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>).

ANEXO I

Original do artigo apresentado no tópico 5.5 Quinto manuscrito

Carbajal de la Fuente, A.L., S.A. Minoli, C.M. Lopes, F. Noireau, C.R. Lazzari and M.G. Lorenzo.
2007. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera: Reduviidae) in north-eastern Brazil. *Acta Trop.* 101 (2): 115-119.

Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction or distribution or commercial use.



This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil

Ana L. Carbajal de la Fuente^{a,*}, Sebastian A. Minoli^{b,c,1}, Catarina M. Lopes^a, François Noireau^d, Claudio R. Lazzari^c, Marcelo G. Lorenzo^e

^a Depto. de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Avenida Brasil 4365, CEP 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratorio de Fisiología de Insectos, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

^c Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, Université François, Rabelais, UMR CNRS 6035, Tours, France

^d Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR016, Montpellier, France

^e Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brazil

Received 30 May 2006; received in revised form 28 November 2006; accepted 28 December 2006

Available online 10 January 2007

Abstract

The present paper reports for the first time the capture of wild *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* by means of light traps in Brazil. We tested commercially available lighting devices powered by batteries to attract the bugs to a white piece of cloth in the field. Two main findings showed to be significant: first, the results presented here show that light traps can be used for sampling these species in wild environments; second, they reveal that house colonization by triatomines may also happen as a consequence of the arrival of flying sylvatic bugs guided by artificial light sources. In addition, we discuss the effect of some environmental and biological factors on triatomine flight activity modulation.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Triatominae; Light traps; Flight; Sampling; Northeastern Brazil

1. Introduction

Triatomine bugs are vectors of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, the etiological agent of Chagas disease. Currently, approximately 120 million people are exposed to infection in Latin America and 16–18 million are effectively infected with this parasite (TDR, 2002). There are more than 130 species of triatomine bugs

described, and most of them feed on endothermic animals. Some of these species are closely related to human dwellings, and, therefore, they become epidemiologically important to man. On the other hand, most triatomines species are strictly sylvatic, almost with no contact with humans. Between these two opposite situations, there is a continuous gradient for other species sharing features of both groups (Schofield, 1994). This is the case of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, the two main vector species found in northeastern Brazil. *T. brasiliensis* is typically found in rock piles, in association with mammals and reptiles, and *T. pseudomaculata* is commonly found inhabiting hollow trees associated

* Corresponding author. Tel.: +55 21 25 98 43 20; fax: +55 21 25 73 44 68.

E-mail address: carbajal@ioc.fiocruz.br

(A.L. Carbajal de la Fuente).

¹ These authors contributed equally to this work.

with birds (Carcavallo et al., 1997; Dias-Lima et al., 2003).

The predominant landscape in our study area is the “caatinga”, characterized by the presence of the catingueira tree (*Caesalpinia pyramidalis*) in the north-eastern Brazilian region. This dominant vegetal species is distributed in rocky mountain ranges sparsely emerging from flat areas. Two different weather patterns can be described for this region: a remarkably hot and dry climate, that extends from May to the beginning of December; and intermittent rains throughout the rest of the year. As a consequence, there are many differences regarding foliage abundance and, therefore, host availability for the insects. As for the two Chagas disease vectors under study, *T. brasiliensis* is mostly found in the rocky mountain ranges, while *T. pseudomaculata* is more abundant in the flat areas of “caatinga”.

Flight is one of the main mechanisms involved in long-distance movements in insects. The dispersal for either food or mate may be considered as the fundamental phenomena that induce them to fly. Nutritional (Lehane et al., 1992; McEwen and Lehane, 1993) and reproductive (McEwen and Lehane, 1994) status, as well as population density (McEwen et al., 1993) and environmental conditions, such as temperature (Lehane et al., 1992; Schofield et al., 1992), are factors known to modulate the flight activity in triatomines. Although

triatomines are predominantly walking insects, colonization of new habitats seems to occur by flight and/or by passive dispersal (Forattini et al., 1979). Flight may be an important factor for the colonization of new houses not only by domiciliated species but also by wild species. Light may make human dwellings more attractive to these bugs, but few reports on light trap captures have supported this presumption (Tonn et al., 1978; Schweigmann et al., 1988; Wisnivesky-Colli et al., 1993; Noireau and Dujardin, 2001; Vazquez-Prokopec et al., 2004).

In this work, we analyzed whether *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* can be captured in the field using light traps.

2. Materials and methods

The collecting area is located near Curaçá, Bahía State (S 8°57' W 39°49'; 500 m a.s.l.), northeastern Brazil, in the caatinga region. In this area, natural colonies of both *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* had been previously found by Dias-Lima et al. (2003). 15 light trap captures were done at two different sylvatic locations: a plain zone with arboreal vegetation (site a: 9 nights) and a pile of rocks on a foothill (site b: 6 nights). Only one light trap was operated during the 15 nights in three different periods (November 2001, November 2003 and May 2004, see Table 1).

Table 1
Triatomines captured by means of battery-powered light traps in Curaçá, Bahía State, Brazil

Date	Site	<i>Triatoma brasiliensis</i>		<i>T. pseudomaculata</i>		Wind	Moon
		Males	Females	Males	Females		
November 2001	b	2	1		1	Weak	No
	b	–	1	–	–	Weak	No
	b	–	–	–	–	Strong	No
	b	1	1	–	1	Weak	No
November 2003	a	–	–	–	–	None	No
	a	1	–	2	1	Weak	No
	a	–	–	1	1	Intermediate	No
	a	–	–	1	–	None	No
	a	–	–	1	1	Intermediate	No
	a	–	–	–	2	Weak	No
April 2004	a	–	–	–	1	Intermediate	No
	a	–	–	–	1	Intermediate	No
	b ^a	–	–	–	–	Strong	No
	a	1	–	2	–	Weak	Cloudy
	b	–	–	–	–	Weak	Yes
Total		5	3	7	9		

Insects were collected in wild environments during November 2001, November 2003 and April 2004. Capture sites corresponding to (a) “caatinga” plain; (b) rock piles on ridges of foothills.

^a A male of *Panstrongylus lutzi* was captured.

Two different battery-powered lighting devices were used: (i) an ATOMLUX 2050 Solar Design for four nights (2001 campaign) and; (ii) a Coleman 5359 Series (lamp HF/ED π .13 W/6500 °K) for 11 nights (2003 and 2004 campaign). The trap arrangement consisted of two pieces of white cloth ($3\text{ m} \times 2\text{ m}$), one vertically extended and the other laid on the ground in order to prevent specimens from falling onto the ground when flying against the vertical cloth. The trap system was illuminated by the lighting device set 1 m away from the cloth and 1 m above ground. The whole device was mounted in daylight and the lights were turned on 30 min before sunset. If there was no triatomine captures after a period of approximately 1 h, traps were inactivated, i.e., lights were turned off.

All the triatomines that flew into or around the trap were caught with a forceps and collected in vials. Upon arriving in the laboratory, the species and sex of each individual were identified and recorded. Daily prevailing weather conditions during the sampling period were noted down, as well as the presence or absence of moonlight. Wind intensity was evaluated visually. A lack of movement of the trap cloths and the leaves in the surrounding vegetation was considered as “no wind”. An intermediate situation was that in which the cloths and leaves moved slightly. For a single night, in which the cloths were permanently inflated by the predominant air current, strong wind conditions were recorded.

3. Results

Triatomines reached light traps in 73% of the nights (11/15). The table shows the total number of captures, dates, sites, species and sex. *T. pseudomaculata* showed to be the predominant bug species collected and *T. brasiliensis* represented one-third (8/24) of the total number captured bugs. Additionally, a *Panstrongylus lutzi* male specimen was captured. No significant differences were observed in the sex ratio of the collected insects of both species (Table 1). Differences were observed between the number of captures performed during the dry (November 2001, 2003) and humid (May 2004) seasons. More insects were collected during the former (1.9 insects/night) than during the later (1 insect/night). According to our visual evaluation, all the triatomines collected showed to have flat abdomens characteristic of a fasting status.

The sites chosen for setting up the traps affected the ratio of species captured (Table 1, Fig. 1). When traps were set up on the plain caatinga, most triatomines captured were *T. pseudomaculata*, whereas *T. brasiliensis* was found in a higher proportion on the foothill.

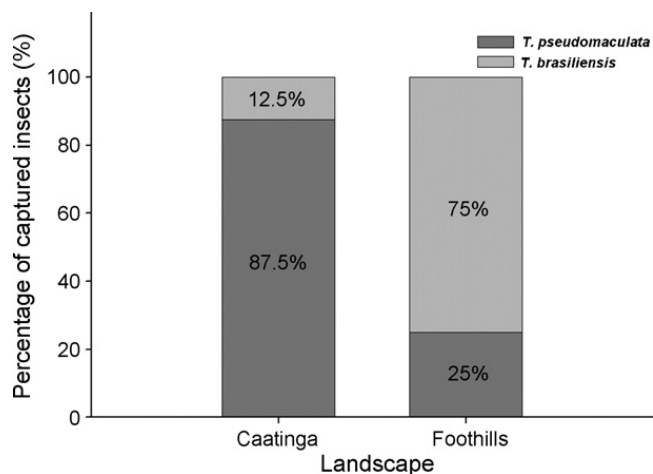


Fig. 1. Percentage of triatomines of each species captured with light traps at each of the two wild environments of Curaçá, Bahia State, Brazil.

4. Discussion

Our data suggest that *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* are attracted by light. Thus, light traps can be used for sampling purposes, allowing the capture of live wild triatomines for laboratory study. The frequency of arrivals observed with these triatomine species was similar to that reported by Noireau et al. (2000) using light traps for capturing Triatominae. On the other hand, captures were scarce if compared with those of *T. protracta*, *T. sordida* and *T. guasayana* in other studies (Sjogren and Ryckman, 1966; Noireau and Dujardin, 2001).

The arrival of wild triatomine adults to our light trap suggests that light sources may enable bugs to colonize dwellings. If houses with artificial light were located at such capturing sites in the caatinga, one could expect that approximately 1.7 triatomines would reach these houses every night (88% being *T. pseudomaculata*). Because the sampling sites were located at least 2 km away from the nearest dwellings, it is likely that the insects captured were sylvatic. All of them were apparently in a fasting status, and *T. brasiliensis*, particularly, seemed to be very active at the time of their capture and motivated for feeding (they spontaneously extended their proboscis when captured).

The Triatominae fauna of the surrounding areas, where light trap surveys were carried out, was studied by Dias-Lima et al. (2003), showing that out of 58 trees investigated by means of live bait traps, 43.1% were positive for *T. pseudomaculata* and none for *T. brasiliensis*, which was the prevailing species found among rocks. One adult specimen of *P. lutzi* was also collected in a rocky shelter. Our results confirm that each species prefers different sylvatic habitats (see Fig. 1). Because

the two different collection habitats were approximately 500 m apart and presented an altitude difference of approximately 60 m, we suggest that the effective range of light traps is a few hundred meters away from the actual collection sites. This resembles the results obtained by Vazquez-Prokopec et al. (2004) with *T. infestans*.

Some literature data (McEwen and Lehane, 1994; Lehane et al., 1992) suggest that the active process of colonization occurs by flying gravid starved females. Our survey suggests that both males and females of the species under study are equally motivated to approach light sources, as recently showed by Minoli and Lazzari (2006) in laboratory assays conducted with *T. infestans* and *Rhodnius prolixus*. The arrival of individuals of both sexes to houses as a response to light sources would facilitate the establishment of new domestic colonies.

The light trap success in collecting bugs during the two different survey periods (dry season, November, and humid season, April) contrasts with the collecting results by dissection of dead trunks when performed simultaneously (Carbajal de la Fuente et al., in preparation). The proportion of *T. pseudomaculata* adults collected in the trunks in November was lower compared to that observed in April. A low number of adults and small nymphs are normally captured during the dry season through habitat dissection, but figures change drastically as many well fed larger nymphs and adults are found inside tree-logs during the wet season. This dramatic difference with the captures of flying adults may mirror a modification of the nutritional status of insects between these two opposite environments. Therefore, our data may indicate that adult triatomines can fly more frequently in search for food sources during the dry season.

This work contributes to understand the dispersal mechanisms used by two epidemiologically important triatomine bugs, demonstrating that they can disperse by flight. Moreover, it shows that light from dwellings affects the orientation of these bugs during flight. We show here that *T. brasiliensis* and *T. pseudomaculata* are able to actively invade human houses with light sources. Finally, this report presents relevant information for Chagas disease control programs and scientists studying these triatomines, since it demonstrates that light traps can be employed as adult sampling/monitoring tools in this region.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Liléia Diotaiuti for supporting field work by S. Minoli. We are indebted to the anonymous referees for help to improve the

manuscript. This investigation received financial support from the IRD, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), CONICET, Universidad de Buenos Aires and FIOCRUZ. ALCF by a scholarship from the CAPES/CNPq-IEL Nacional program, Brazil.

References

- Carcavallo, R.U., Giron, I.G., Jurberg, J., Lent, H., 1997. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. In: Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, vol. 2, pp. 561–600.
- Dias-Lima, A.G., Menezes, D., Sherlock, I., Noireau, F., 2003. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). J. Med. Entomol. 40, 989–990.
- Forattini, O.P., Ferreira, O.A., Silva, E.O., Rabello, E.X., 1979. Aspectos ecológicos da tripanossomiase americana. XV—Desenvolvimento, variação e permanência de *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus* em ecótopos artificiais. Rev. Saúde Pub. 13, 220–231.
- Lehane, M.J., McEwen, P.K., Whitaker, C.J., Schofield, C.J., 1992. The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. Acta Trop. 52, 27–38.
- McEwen, P.K., Lehane, M.J., 1993. Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). Insect Sci. Applic. 14, 321–325.
- McEwen, P.K., Lehane, M.J., 1994. Relationship between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). J. Appl. Entomol. 117, 217–223.
- McEwen, P.K., Lehane, M.J., Whitaker, C.J., 1993. The effect of population density on flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). J. Appl. Entomol. 116, 321–325.
- Minoli, S., Lazzari, C., 2006. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. Acta Trop. 97, 324–330.
- Noireau, F., Dujardin, J.P., 2001. Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96, 385–389.
- Noireau, F., Flores, R., Gutierrez, T., Abad-Franch, F., Flores, E., Vargas, F., 2000. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other wild triatomines in the Bolivian Chaco. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hygiene 94, 23–27.
- Schofield, C.J., 1994. Triatominae: Biology and Control. Eurocommunica Publications, West Sussex, UK, 80 pp.
- Schofield, C.J., Lehane, M.J., McEwen, P.K., Catala, S.S., Gorla, D.E., 1992. Dispersive flight by *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. Med. Vet. Entomol. 6, 51–56.
- Schweigmann, N.J., Vallvé, S.L., Muscio, O., Ghillini, M., Alberti, A., Wisnivesky-Colli, C., 1988. Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. Med. Vet. Entomol. 2, 401–404.
- Sjogren, R.D., Ryckman, R.E., 1966. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in southwestern North America. Nocturnal flights of *Triatoma protracta* (Uhler) as indicated by collections at black light traps (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). J. Med. Entomol. 3, 81–92.
- TDR, 2002. site: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/files/chagas-poster.pdf>.
- Tonn, R.J., Espínola, H., Mora, E., Jiménez, J.E., 1978. Trampa de luz negra como método de captura nocturna de triatomíneos en Venezuela. Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental 18, 25–30.

Vazquez-Prokopec, G.M., Ceballos, L.A., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2004. Active dispersal of natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in rural northwestern Argentina. J. Med. Entomol. 41, 614–621.

Wisnivesky-Colli, C., Gurtler, R.E., Solarz, N.D., Schweigmann, N.J., Pietrokovky, S.M., Alberti, A., Flo, J., 1993. Dispersive flight and house invasion by *Triatoma guasayana* and *Triatoma sordida* in Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88, 27–32.

Author's personal copy

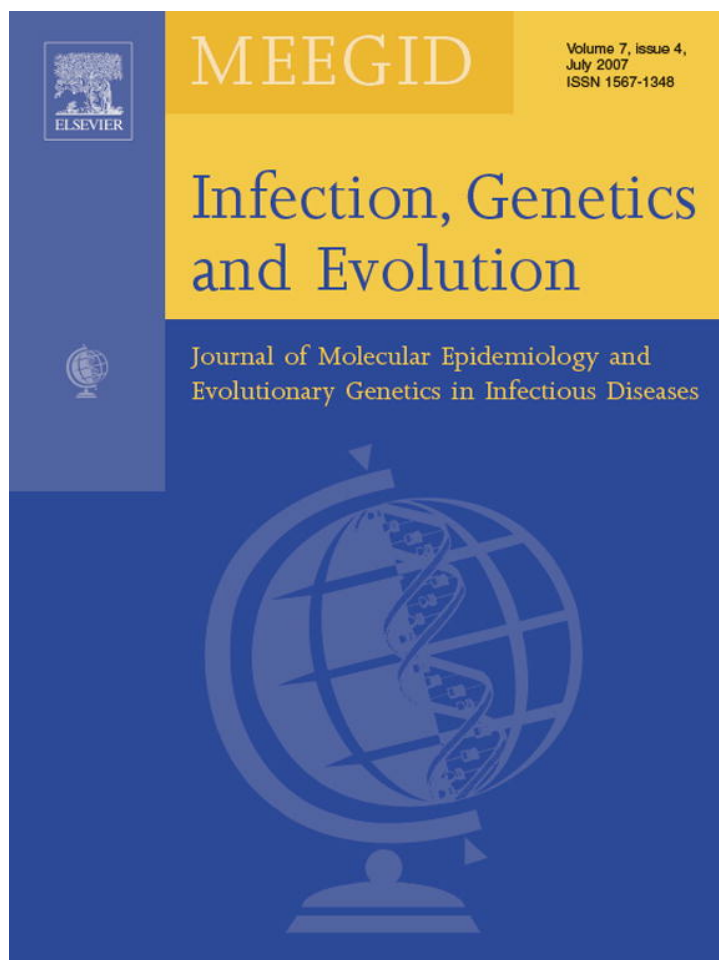
ANEXO II

Artigos publicados pela autora relacionados com esta tese, mas que não integram a mesma.

Santos S.M., Lopes, C.M., Dujardin, J.P., Panzera, F., Pérez, R., Carbajal de la Fuente, A.L., Pacheco, R.S. and Noireau F.; 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infec. Gen. Evol.*, 7: 469–475

Noireau, F., Carbajal de la Fuente, A.L., Lopes, C.M. and Diotaiuti, L.; 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An. Acad. Bras. Cienc.* 77, 1-6

Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction or distribution or commercial use.



This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae)

S.M. dos Santos^a, C.M. Lopes^a, J.P. Dujardin^b, F. Panzera^{c,d}, R. Pérez^c,
A.L. Carbajal de la Fuente^a, R.S. Pacheco^e, F. Noireau^{f,g,*}

^aDepartamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^bUR062, UMR CNRS-IRD 9926, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France

^cSección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay

^dCentro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), Cuernavaca, Morelos, Mexico

^eDepartamento de Bioquímica e Biología Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

^fUR016, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France

^gFacultad de Medicina, Universidad Mayor San Simón, Cochabamba, Bolivia

Received 9 June 2006; received in revised form 20 January 2007; accepted 29 January 2007

Available online 3 February 2007

Abstract

The *maculata* group currently comprises two species of Triatominae, *Triatoma maculata* and *Triatoma pseudomaculata*, which share morphologic and chromatic characteristics. In order to clarify the systematic status of these two vectors of *Trypanosoma cruzi* and to infer their evolutionary relationships, we performed an enzymatic, morphometric and cytogenetic comparison of them, also taking into account two sister species not included in the group (*T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi*). According to our results, *T. maculata* and *T. pseudomaculata* belong to distinct evolutionary lineages. Similarly, *T. arthurneivai* topotypes from Minas Gerais form an independent isolated group by morphometrics. Our results also support the specific status of the *Triatoma* population from São Paulo State (formerly referred to *T. arthurneivai*), and suggest the possibility that it is *T. wygodzinskyi*. Finally, we suggest that only the arboricolous *T. pseudomaculata* from northeast Brazil and the rupicolous sister species originated from São Paulo State should be classified together in the same group.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Triatoma maculata*; *T. pseudomaculata*; *T. arthurneivai*; *T. wygodzinskyi*; Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE); Morphometrics; Cytogenetics; Taxonomy; Phylogeny

1. Introduction

Triatoma maculata (Erichson, 1848) is a triatomine species found in Venezuela, Colombia, the Roraima state in Brazil, Suriname, Guyana, French Guiana and also in the Caribbean islands of Aruba, Bonaire and Curaçao (Carcavallo et al., 1999). It shares many morphologic and chromatic characteristics with *Triatoma pseudomaculata* Corrêa and Espínola (1964), a species that occurs throughout northeastern Brazil. For this

reason, *T. pseudomaculata* remained misidentified for more than a century before being described from insects collected in the Ceará State. According to the current hypothesis about their origin, *T. maculata* and *T. pseudomaculata* resulted of from the evolution of two geographic populations derived from a common ancestor by passive dispersion of nymphs associated with migratory birds (Schofield, 1988). Because both species display great similarity, they form the *maculata* group (Carcavallo et al., 2000; Dujardin et al., 2000). Two other species, *Triatoma arthurneivai* Lent and Martins, 1940 and *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951, exhibit morphological similarities with *T. maculata* and *T. pseudomaculata*, which led Carcavallo et al. (1997) to considerate their relationship with the group.

* Corresponding author at: Facultad de Medicina, Universidad Mayor San Simón, Cochabamba, Bolivia. Tel.: +591 2 278 29 69; fax: +591 2 278 29 44.
E-mail address: francois.noireau@ird.fr (F. Noireau).

Table 1
Known distribution and some ecological traits of *T. maculata*, *T. pseudomaculata*, *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi*

Species	Geographic distribution	Silvatic habitat	Trends to domesticity	References
<i>T. maculata</i>	Brazil (RR), Colombia Venezuela, Surinam, Guyana, French Guiana, Caribbean islands	Palm tree, hollow tree, bird nest, bromeliad	+	Tonn et al. (1978), Carcavallo et al. (1998), Carcavallo et al. (1999)
<i>T. pseudomaculata</i>	Brazil (AL, BA, CE, DF, GO, MG, PB, PE, PI, RN, SE, TO)	Hollow tree, bird nest	+	Carcavallo et al. (1999), Vinhaes and Dias (2000), Dias-Lima et al. (2003)
<i>T. arthurneivai</i>	Brazil (MG, PR, SP)	Rocky formation	N.R.	Forattini et al. (1968), Barretto and Ribeiro (1981), Carcavallo et al. (1999)
<i>T. wygodzinskyi</i>	Brazil (MG)	N.R.	N.R.	Lent and Wygodzinsky (1979)

N.R.: not recorded. AL (Alagoas), BA (Bahia), CE (Ceará), DF (Distrito Federal), GO (Goiás), MG (Minas Gerais), PB (Paraíba), PE (Pernambuco), PI (Piauí), PR (Paraná), RN (Rio Grande do Norte), RR (Roraima), SE (Sergipe), SP (São Paulo), TO (Tocantins).

T. arthurneivai was described from a type material collected in the Serra do Cipó, Minas Gerais State, Brazil, and was later reported in the São Paulo State where its eco-biological traits were described (Corrêa et al., 1965; Forattini et al., 1968; Barretto and Ribeiro, 1981). *T. wygodzinskyi* was described from a small number of specimens collected, on a single occasion, in the south of Minas Gerais State. The known distribution and some ecological traits of all four species are reported in Table 1.

Sylvatic *T. maculata* and *T. pseudomaculata* are known to exist in a variety of arboreal habitats while *T. arthurneivai* is found only in the cracks of stones (Table 1). The ecological traits of *T. wygodzinskyi* are unknown. *T. maculata* is considered to be a secondary vector of *Trypanosoma cruzi* to man in Venezuela and Colombia and also in the State of Roraima, Brazil, where a process of domestication is occurring (Felicangeli et al., 2003; Luitgards-Moura et al., 2005). *T. pseudomaculata* is an autochthonous species of “caatingas”, a set of xerophytic formations located in northeast Brazil which is characterized by the fall of leaves during the dry season and the abundance of cacti and bromeliads (Forattini, 1980). Additionally, *T. pseudomaculata* is typically a vector candidate which was originally restricted to wild environments and is currently reported to be invading artificial structures (Silveira and Vinhaes, 1998). Thus, *T. pseudomaculata* must be regarded

as a species that has not yet completed its transition to a domestic habitat.

The importance of phylogenetic information in interrelations of ecosystems, population dynamics, evolutionary trends and possibilities for control is recognized, particularly when disease vectors such as Triatominae are involved. Such information can provide new clues to understand the synanthropic process when sister species exhibit a marked difference. The evolutionary relationship between *T. maculata* and *T. pseudomaculata* is still a matter of debate that deserves deeper analysis as various authors hold opposing views about their lineages (Hypša et al., 2002; Sainz et al., 2004; De Paula et al., 2005). In order to further ascertain the systematic relationships of both epidemiologically important taxa and sister species (*T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi*), we used multilocus enzyme electrophoresis, morphometric and cytogenetic techniques.

2. Materials and methods

2.1. Triatominae

Specimens from three of the four triatomine species analyzed in this paper were obtained from laboratory colonies and used for multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) and cytogenetics. *T. wygodzinskyi*, which is unavailable as a

Table 2
Characteristics of the different samples analyzed

Species identification	Code ^a	Geographic origin	Latitude, longitude	Year of collecting	No. of individuals studied by		
					MLEE	Morphometrics	Cytogenetics
<i>T. maculata</i>	Tm-RR	Boa Vista, RR	2°49'N,60°40'W	2001	27	13	4
	Tm-VN	Venezuela	–	–	–	20	–
<i>T. pseudomaculata</i>	Tps-CE	Sobral, CE	3°42'S,40°21'W	2001	4	5	5
	Tps-PI	João Costa, PI	3°53'S,42°07'W	2002	10	9	–
	Tps-BA	Curaçá, BA	9°28'S,39°44'W	2002	27	35	4
	Tps-PE	Caruaru, PE	8°16'S,35°58'W	2001	–	7	–
<i>T. arthurneivai</i>	Ta-SP	E. S. de Pinhal, SP	22°11'S,46°45'W	2001	19	8	4
	Ta-MG	Serra do Cipó, MG	19°11'S,43°22'W	1940	–	9	–
<i>T. wygodzinskyi</i>	Tw-MG	Sta Rita de Caldas, MG	22°01'S,46°19'W	1951	–	3	–

^a A symbol code is used to identify the samples. The first symbol represents the species (Tm for *T. maculata*, Tps for *T. pseudomaculata* . . .) and the second one the geographic origin after a hyphen (BA: Bahia, CE: Ceará, MG: Minas Gerais, PE: Pernambuco, PI: Piauí, RR: Roraima, SP: São Paulo, VN: Venezuela). With the exception of Venezuela, all the geographic origins are situated in Brazil.

laboratory colony given the extreme rarity of collected specimens, could not be analyzed by these genetic markers. For morphometric analysis, we used the same laboratory colonies and also included the topotypes of *T. arthurneivai* and *T. wygodzinkyi* (both from Minas Gerais, Brazil) conserved in the entomological collection of Oswaldo Cruz Institute. Data on populations and number of individuals studied by MLEE, morphometrics and cytogenetics are summarized in Table 2.

2.2. Multilocus enzyme electrophoresis

Nymphal instars and adults of both sexes were used. Thoracic muscles were dissected out and ground in 100 μ l of an enzyme stabilizer (dithiothreitol, *E*-aminocaproic acid and EDTA, each at 2 mM). Extracts were stored at -70°C prior to use. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) was performed on cellulose acetate plates (Helena Laboratories, Beaumont, TX). The following 16 enzyme systems were assayed: aconitate hydratase (ACON, EC 4.2.1.3); diaphorase (DIA, EC 1.6.2.2); fructose-1, 6-diphosphatase (FDP, EC 3.1.3.11); fumarate hydratase (FUM, EC 4.2.1.2); glutamate dehydrogenase (GDH, EC 1.4.1.3); aspartate aminotransferase (GOT, EC 2.6.1.1); glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD, EC 1.1.1.8); glucose phosphate isomerase (GPI, EC 5.3.1.9); glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, EC 1.1.1.49); hexokinase (HK, EC 2.7.1.1); isocitrate dehydrogenase (IDH, EC 1.1.1.42); malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37); malic enzyme (ME, EC 1.1.1.40); mannose-phosphate isomerase (MPI, EC 5.3.1.8); phosphoglucomutase (PGM, EC 2.7.5.1); and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH, EC 1.1.1.44). Electrophoresis and enzyme staining were performed as described previously by Ben Abderrazak et al. (1993) and Noireau et al. (1998). Genotype frequencies were obtained by direct genetic interpretation of gel banding patterns. Genetic variability was estimated by the percentage of polymorphic loci (*P*) and the mean expected heterozygosity (*He*). Nei's standard genetic distance (Nei, 1987) was used to compare gene frequency differences between species or populations.

2.3. Cytogenetics

Testes were removed from freshly killed adults, fixed in an ethanol–acetic acid mixture (3:1) and stored at -20°C . Air-dried chromosome preparations were made by squashing gonads in 50% acetic acid, freezing them in liquid nitrogen and removing the coverslip with a razor blade. The C-banding technique was performed as reported by Pérez et al. (1997) in order to observe the distribution and behavior of C-heterochromatin during mitosis and meiosis. Observations were carried out with a Nikon Microphot FX microscope (Nikon, Tokyo, Japan). The photographs in the bright field microscope were made with Ilford 50 film (Ilford Ltda, Cheshire, U.K.).

2.4. Morphometrics

Measurements were made on the head and thorax of each specimen by the same investigator according to Casini et al.

(1995). The nine head measurements were: inner distance between the eyes, inner distance between ocellae, ante-ocular distance, post-ocular distance excluding the neck, length of the antenniferous tubercle, head length, and length of the 1st, 2nd and 3rd rostral segments. The four measurements performed on the thorax were: width of the collar of the thorax, thorax partial width at the intersection of the fore and median lobes, thorax total width between the humerus, and the total length of the thorax excluding the scutellum. Head log-transformed characters, together with thorax log-transformed characters, were scaled for size by subtracting row means and submitted to a principal component analysis (Darroch and Mosimann, 1985). To preserve an acceptable number of variables relative to the smallest group, the seven first components were retained and used as input for a so-called “size-free discriminant analysis” on the four groups. The three specimens of *T. wygodzinkyi* were classified on the basis of their Mahalanobis distance to each group centroid and projected onto the factorial map of the first two discriminant factors. For morphometric analyses and their graphical display, we used the PAD and related morphometric software modules freely available at <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>.

3. Results

3.1. Isoenzyme electrophoresis

A single zone of enzymatic activity or locus was scored for ACON, DIA, FDP, FUM, GDH, GOT, GPI, IDH, MDH, MPI, PGM and 6PGDH, while two loci were scored for ME. The HK and G6PD enzymes were excluded from the analysis because they could not be reliably scored, and the GPD enzyme because it was dependent of the insect stage. Thus, the studied set of enzymes represented a total of 14 gene loci. Three polymorphic loci ($P = 0.21$) were found for the *T. pseudomaculata* from Piauí (Tps-PI), two ($P = 0.14$) for *T. maculata* (Tm-RR) and *T. pseudomaculata* from Bahia (Tps-BA). For the other populations (Tps-CE and Ta-SP), the different loci were monomorphic. The estimate of gene diversity (or mean expected heterozygosity, *He*) was 0.07 (Tm-RR), 0.06 (Tps-PI) and 0.05 (Tps-BA), respectively. The genotype proportions for the polymorphic loci showed no significant departures from the expectations of the Hardy–Weinberg equilibrium (calculated by fixation index *F*; $P > 0.05$). Only two loci (*Dia* and *Me2*) did not present intergroup variation. Eleven loci (*Gdh*, *Fdp*, *Fum*, *Gdh*, *Got*, *Gpi*, *Idh*, *Mdh*, *Mpi*, *Pgm* and *6Pgdh*) and 12 loci (*Gdh*, *Fdp*, *Fum*, *Gdh*, *Got*, *Gpi*, *Idh*, *Mdh*, *Me1*, *Mpi*, *Pgm* and *6Pgdh*) allowed us to differentiate *T. maculata* from *T. pseudomaculata* and *T. arthurneivai*, respectively. One or two diagnosis loci (*Me1* and *6Pgdh*) were found between *T. arthurneivai* and *T. pseudomaculata*, depending on the geographic origin of these last samples (Table 3). *T. pseudomaculata* populations and *T. arthurneivai* were separated by genetic distances >0.10 . Higher genetic distances (from 1.48 to 1.51) were observed between *T. maculata* and the *T. pseudomaculata* populations (Table 3).

Table 3

Number of isoenzyme diagnosis loci (above diagonal) and Nei genetic distance (below diagonal) between the samples analyzed

	Tm-RR	Tps-CE	Tps-PI	Tps-BA	Ta-SP
Tm-RR	–	11	11	11	12
Tps-CE	1.50	–	0	0	2
Tps-PI	1.51	0.01	–	0	1
Tps-BA	1.48	0.09	0.06	–	1
Ta-SP	1.91	0.15	0.11	0.11	–

Tm: *T. maculata* (RR: Roraima); Tps: *T. pseudomaculata* (CE: Ceará, PI: Piauí, BA: Bahia); Ta: *T. arthurneivai* (SP: São Paulo).

3.2. Cytogenetics

The males of the three species had the same diploid chromosome number ($2n = 22$), constituted by 20 autosomes and a pair of sex chromosomes (XY). The analysis of the C-banding patterns in gonial mitosis and the meiotic chromosome behavior showed that the three species presented different amounts and distribution of autosomal heterochromatin. Moreover, all individuals of each species presented only one C-banding pattern. These differences in the heterochromatin content were clearly observed during early meiotic prophase (Fig. 1). *T. arthurneivai* consisted completely of euchromatic autosomes (i.e. without heterochromatin) and only the Y chromosome was heterochromatic. During early meiotic prophase, there was one heteropycnotic chromocenter formed only by the association of the XY sex chromosomes (arrow Fig. 1a). In *T. maculata* most autosomes presented terminal and small C-heterochromatic dots that appeared scattered throughout the nucleus (Fig. 1b). In *T. pseudomaculata* only three or four autosomes appeared with C-regions, but some of them were closely associated with the sex chromosomes (arrowheads Fig. 1c). The number of C-heterochromatic dots was higher in *T. maculata* than in *T. pseudomaculata* (compared Fig. 1b with c). The C-banding patterns detected in gonial mitosis (data not shown) were in agreement with the ones observed during meiotic prophase (Fig. 1).

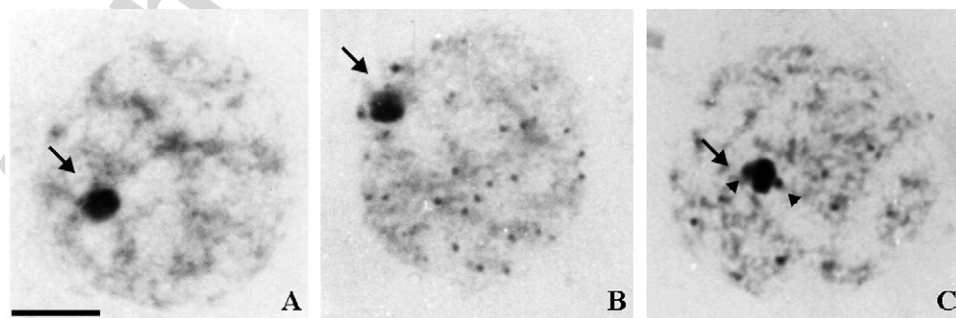


Fig. 1. Representative C-banding patterns observed at meiotic prophase (diffuse stage) in male specimens of *Triatoma arthurneivai*, *T. maculata* and *T. pseudomaculata*: (A) *T. arthurneivai* from São Paulo: the association of the XY sex chromosomes constituted one heterochromatic chromocenter (arrow). All autosomal bivalents were euchromatic while that the Y chromosome is heterochromatic. (B) *T. maculata*: almost all autosomes had small heterochromatic C-dots that appear scattered throughout the nucleus. (C) *T. pseudomaculata*: this species had a chromocenter (arrow) formed by the association of the heterochromatic regions of one autosome (arrowheads). This species presented fewer heterochromatic C-dots than *T. maculata*.

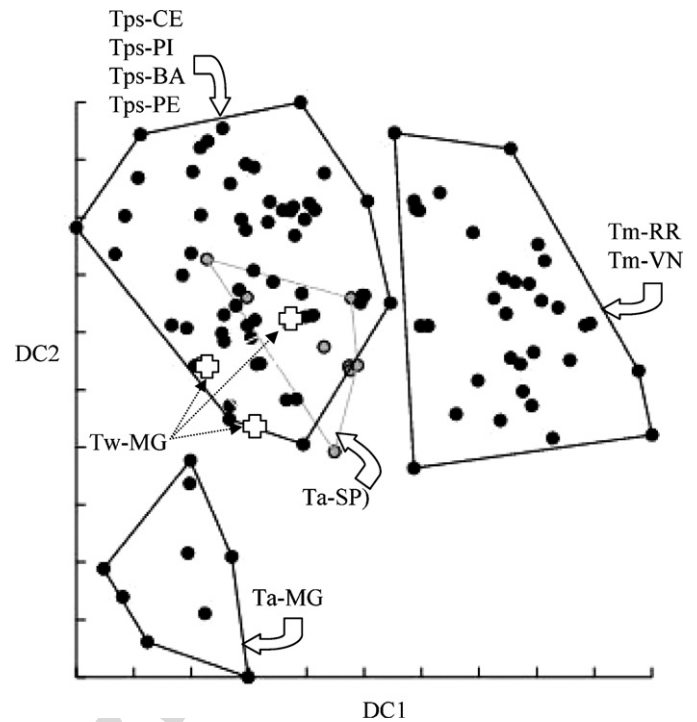


Fig. 2. Factorial map based on the measurements of head and thorax of adults of *Triatoma maculata* (Tm-RR and Tm-VN), *T. pseudomaculata* (Tps-CE, Tps-PI, Tps-BA, Tps-PE), *Triatoma arthurneivai* from São Paulo (Ta-SP), and *T. arthurneivai* (Ta-MG). The three *T. wygodzinskyi* specimens were introduced as supplementary data after completion of the discriminant analysis, and projected onto the factor map (Tw-MG, white cross). DC1 and DC2 are first and second discriminant function derived from size-free components.

3.3. Morphometrics (Fig. 2)

The first discriminant function derived from size-free components completely separated *T. maculata* from the remaining species. There was an obvious subdivision within the *T. arthurneivai* taxon, one group (Ta-SP) overlapping with *T. pseudomaculata*, the other one (Ta-MG) behaved as an independent, isolated group. The projected specimens of *T. wygodzinskyi* were compatible with either *T. arthurneivai* from São Paulo or *T. pseudomaculata*.

4. Discussion

With the exception of *T. maculata* that occurs in Venezuela and some regions of adjacent countries, all the other species are Brazilian and spread from the northeastern (*T. pseudomaculata*) to central Brazil (*T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi*). *T. maculata* and *T. pseudomaculata* are arboricolous and allopatric, being separated by the Amazon forest (Carcavallo et al., 1999). Because *T. maculata* is commonly found indoors and infected with *T. cruzi*, it is considered the second most important Chagas disease vector in Venezuela (Lent and Wygodzinsky, 1979; Feliciangeli et al., 2003). As for *T. pseudomaculata*, it is often found in peridomestic areas and can occasionally invade human dwelling (Silveira and Vinhaes, 1998). It should be considered to be a vector candidate and thus be monitored. On the other hand, *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi* are exclusively sylvatic. *T. arthurneivai* is rupicolous while the habitat of *T. wygodzinskyi* is unknown. Both species occur in sympatry in southern Minas Gerais (Carcavallo et al., 1999).

Specific taxonomic status and population structuring/relationships were first assessed by isoenzyme electrophoresis. Isoenzyme analysis is a classic technique that has remained a valuable tool to address the correct level of phylogenetic divergence in several organisms, including Triatominae (Hartl and Dykhuisen, 1984; Dujardin et al., 2000). In order to obtain reliable estimates of genetic distance, it is important to examine a large number of loci rather than a large number of individuals (Richardson et al., 1986; Nei, 1987). With a total of 14 gene loci examined and sample sizes ranging from 8 to 20 individuals by population (except for the Tps-CE population originated from the type locality, with only 4 individuals), our work allows a reliable analysis on evolutionary relationships. Although the apparently null or very low levels of genetic variation in populations analyzed (with H_e ranging from 0 to 0.085) might be attributed to the small sample sizes and the colony origin of the specimens, it is in agreement with other studies that indicate low isoenzyme variability in Triatominae (Dujardin et al., 2000). In several groups of triatomines, allozyme electrophoresis was successfully used for the distinction of cryptic species and the determination of the correct status of dubious populations (Panzera et al., 1995; Noireau et al., 1998). According to Noireau et al. (1998) and Dujardin et al. (2000), values of genetic distance higher to 0.10 are supposed to indicate specific rank in triatomines.

For morphometrics, the removal of size was intended to allow partitioning of environmental differences (size related) from evolutionary influences (Hutcheson et al., 1995). This statistical processing of initial measurements has been used successfully to ascertain evolutionary relationships in Triatominae (Dujardin et al., 1999). Seven shape components were retained for species/populations characterization and discrimination, and these seven variables contributed to 93% of the total shape variation. Out of the two discriminant functions, the first one represented 84% of the variation, to which size was slightly (7%) contributing. Thus, on the basis of this model, the three specimens of *T. wygodzinskyi* were projected, and their

tentative attribution obtained by comparing Mahalanobis distances with the three species.

Because its morphology is very similar to *T. maculata*, *T. pseudomaculata* has remained misidentified for a long time before being ranked as a distinct species based on experimental crossings (Corrêa and Espínola, 1964). Our results obtained with MLEE (11 diagnostic loci and genetic distance ≈ 1.50), cytogenetics (the two species exhibit differences in heterochromatin content) and morphometrics strongly support that *T. maculata* and *T. pseudomaculata* do not exhibit close phylogenetic affiliation and belong to distinct lineages. This result is consistent with the proposal of Hypša et al. (2002) and De Paula et al. (2005) that made use of mitochondrial rDNA sequences (16S), but disagrees with the analysis of mitochondrial DNA sequences performed by Sainz et al. (2004), suggesting that *T. maculata* and *T. pseudomaculata* are closely related species. This discordance can be attributed to the misidentification of the specimens of *T. maculata* used by Sainz et al. (2004). These authors analyzed specimens from Sergipe (Brazil), which is the geographic location of *T. pseudomaculata* but not of *T. maculata*. In conclusion, the current opinion suggested by Schofield (1988) that both species originated as allopatric populations derived from a recent common ancestor can be discarded.

The existence of diagnostic loci (1 or 2) and genetic distances ≥ 0.11 between *T. pseudomaculata* populations and *T. arthurneivai* from São Paulo (Ta-SP) were consistent with the hypothesis of distinct species. This assumption is also supported by cytogenetic findings. The difference in heterochromatin content reported here (Fig. 1) reveals genetic differences between the species analyzed in a level similar to the ones observed among other triatomine species (Panzera et al., 1995; Pérez et al., 2002). Surprisingly, morphometrics shows a clear differentiation between the two geographic populations of *T. arthurneivai*: the specimens from SP are grouped with *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*, while the topotypes Minas Gerais (Ta-MG) form an independent and isolated group. Consequently, our results support the hypothesis that the population from SP should be regarded as a distinct species closely related to *T. pseudomaculata* and *T. wygodzinskyi*. It is likely that the field works dedicated to *T. arthurneivai* from the SP State had involved this *Triatoma* sp. (Corrêa et al., 1965; Forattini et al., 1968; Barretto and Ribeiro, 1981). Similarly, the phylogenetic analyses using rDNA sequences, which clustered *T. pseudomaculata* and *T. arthurneivai*, involved individuals from SP (*Triatoma* sp.) and not *T. arthurneivai* topotypes from MG (Hypša et al., 2002; De Paula et al., 2005).

Because morphometrics shows the projection of the three *T. wygodzinskyi* specimens over or close to *Triatoma* sp. from SP (Fig. 2) and both populations occur in the same region of southeastern Brazil, we put forward the hypothesis that they belong to the same species, i.e. *T. wygodzinskyi*. Nevertheless, the fact to compare topotypes of *T. arthurneivai* and *T. wygodzinskyi*, deposited in entomological collection for more than 50 years, with *Triatoma* specimens from SP freshly collected requires caution. New collecting and further studies

are necessary before establishing the taxonomic status of *Triatoma* sp. from SP. Lastly, the close evolutionary relationships between *T. pseudomaculata* and *Triatoma* sp. from SP (formerly *T. arthurneivai*) are clearly demonstrated by our isoenzyme study, which is in agreement with the molecular analyses of HYPŠA et al. (2002) and De Paula et al. (2005). The low genetic distances (0.11–0.15) (Table 3) indicate that both species belong to the same evolutionary lineage.

The current classification of Triatominae in species groups is based mainly on extensive phenotypical similarities rather than their evolutionary relationships and behavioral/ecological shared traits (Usinger et al., 1966; Carcavallo et al., 2000). If we support our classification only in morphological traits, the *maculata* group has to include all the species studied here. However, if we consider that the species composing a group must also share genetic traits, the existence of a *maculata* group is questionable. Only the arboricolous *T. pseudomaculata* and the rupicolous sister *Triatoma* sp. from the São Paulo State should be classified in a same evolutionary group.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq). We thank José Jurberg from the International Taxonomy Triatomine Reference Laboratory (LNIRTT), Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil, for the facilities to carry out this study.

References

- Barretto, M.P., Ribeiro, R.D., 1981. Estudo sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXVII. Observações sobre a ecologia do *Triatoma arthurneivai* Lent and Martins, 1940 (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Bras. Biol. 41, 317–320.
- Ben Abderrazak, S., Guerrini, F., Mathieu-Daudé, F., Truc, P., Neubauer, K., Lewicka, K., Barnabé, C., Tibayrenc, M., 1993. Isoenzyme Electrophoresis for Parasite Characterization. Methods in Molecular Biology, Protocols in Molecular Parasitology, vol. 21. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, pp. 361–382.
- Carcavallo, R.U., Curto de Casas, S.I., Sherlock, I.A., Girón, G., Jurberg, J., Galvão, C., Segura, C.A.M., Noireau, F., 1999. In: Carcavallo, R.U., Galindez Girón, I., Jurberg, J., Lent, H. (Eds.), Distribuição geográfica e dispersão altitudinal. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas, vol. III. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 747–792.
- Carcavallo, R.U., Franca Rodríguez, M.E., Salvatella, R., Curto de Casas, S.I., Sherlock, I.A., Galvão, C., Rocha, D.S., Galindez Girón, I., Otero Arocha, M.A., Martínez, A., da Rosa, J.A., Canale, D.M., Farr, T.H., Barata, J.M.S., 1998. In: Carcavallo, R.U., Galindez Girón, I., Jurberg, J., Lent, H. (Eds.), Habitats and Related Fauna. Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, vol. II. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 561–600.
- Carcavallo, R.U., Galindez Girón, I., Jurberg, J., Galvão, C., Lent, H., 1997. In: Carcavallo, R.U., Galindez Girón, I., Jurberg, J., Lent, H. (Eds.), Pictorial Keys for Tribes, Genera and Species for the Subfamily Triatominae. Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas, vol. I. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, pp. 107–244.
- Carcavallo, R.U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F., Galvão, C., 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. Entomol. Vect. 7, 1–99.
- Casini, C.E., Dujardin, J.P., Martínez, M., Bentos-Pereira, A., Salvatella, R., 1995. Morphometric differentiation between two geographic populations of *Triatoma infestans* in Uruguay. Res. Rev. Parasitol. 55, 25–30.
- Corrêa, R.R., Alves, U.P., Noda, J., 1965. Nota sobre o *Triatoma arthurneivai*. Seu criadouro extradomiciliar (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Bras. Malar. Doenças Trop. 17, 217–232.
- Corrêa, R.R., Espinola, H.N., 1964. Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral. Ceará. Arq. Hig. Saúde Públ. São Paulo 29, 115–127.
- Darroch, J.N., Mosimann, J.E., 1985. Canonical and principal components of shape. Biometrika 72, 241–252.
- De Paula, A.S., Diotaiuti, L., Schofield, C.J., 2005. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mol. Phyl. Evol. 35, 712–718.
- Dias-Lima, A.G., Menezes, D., Sherlock, I., Noireau, F., 2003. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). J. Med. Entomol. 40, 989–990.
- Dujardin, J.P., Steindel, M., Chavez, T., Machane, M., Schofield, C.J., 1999. Changes in the sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94, 565–569.
- Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Panzera, F., 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, Classe des Sciences Naturelles et Médicales, NS 24, pp. 162.
- Feliciangeli, M.D., Campbell-Lendrum, D., Martinez, C., Gonzalez, D., Coleman, P., Davies, C., 2003. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. Trends Parasitol. 19, 44–49.
- Forattini, O.P., 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. Rev. Saúde Públ. 14, 265–299.
- Forattini, O.P., Juarez, E., Rabello, E.X., 1968. Dados sobre a biologia do *Triatoma arthurneivai* no sudeste do Estado de São Paulo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Saúde Pública 2, 186–193.
- Hartl, D.L., Dykhuizen, D.E., 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. Ann. Rev. Genet. 18, 31–68.
- Hutcheson, H.J., Oliver, J.H., Houck, M.A., Strauss, R.E., 1995. Multivariate morphometric discrimination of nymphal and adult forms of the black-legged tick (Acari: Ixodidae), a principal vector of the agent of Lyme disease in Eastern North America. J. Med. Entomol. 32, 827–842.
- Hypša, V., Tietz, D.F., Zrzavý, J., Rego, R.O.M., Galvão, C., Jurberg, J., 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. Mol. Phyl. Evol. 23, 447–457.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bull. Am. Mus. Nat. Hist. 163, 127–520.
- Luitgards-Moura, J.F., Borges-Pereira, J., Costa, J., Zauza, P.L., Rosa-Freitas, M.G., 2005. On the possibility of autochthonous Chagas disease in Roraima, Amazon region, Brazil, 2000–2001. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 47, 45–54.
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, p. 512.
- Noireau, F., Gutierrez, T., Zegarra, M., Flores, R., Brenière, F., Cardozo, L., Dujardin, J.P., 1998. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. Trop. Med. Int. Health 3, 364–372.
- Panzera, F., Pérez, R., Panzera, Y., Alvarez, F., Scvortzoff, E., Salvatella, R., 1995. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). Chromosome Res. 3, 143–150.
- Pérez, R., Panzera, F., Page, J., Suja, J., Rufas, J., 1997. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). Chromosome Res. 5, 47–56.
- Pérez, R., Hernández, M., Caraccio, M., Rose, V., Valente, A., Valente, V., Moreno, J., Angulo, V., Sandoval, M., Roldán, J., Vargas, F., Wolff, M., Panzera, F., 2002. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas Disease. Inf. Gen. Evol. 2, 47–56.
- Richardson, B.J., Baverstock, P.R., Adams, M., 1986. Allozyme Electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies. Academic press, Orlando, FL, USA, p. 410.

- Sainz, A.C., Mauro, L.V., Moriyama, E.M., García, B.A., 2004. Phylogeny of Triatominae vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 121, 229–240.
- Schofield, C.J., 1988. Biosystematics of the Triatominae. *Biosystematics of Haematophagous Insects*, vol. 37. Clarendon Press, Oxford, UK, pp. 284–312.
- Silveira, A.C., Vinhaes, M., 1998. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31 (Suppl. 2), 15–60.
- Tonn, R.T., Otero, M.A., Mora, E., Espínola, H., Carcavallo, R.U., 1978. Aspectos biológicos, ecológicos y distribución geográfica de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) (Hemiptera, Reduviidae), en Venezuela. *Bol. Dir. Malariol. Saneamiento Amb.* 18, 16–24.
- Usinger, R.L., Wygodzinsky, P., Ryckman, R.E., 1966. The biosystematics of Triatominae. *Ann. Rev. Entomol.* 11, 309–330.
- Vinhaes, M.C., Dias, J.C.P., 2000. Doença de Chagas no Brasil. *Cad. Saúde Pública* 16 (Suppl. 2), 13–34.

Author's personal copy



Some considerations about the ecology of Triatominae

FRANÇOIS NOIREAU^{1,2}, ANA L. CARBAJAL-DE-LA-FUENTE¹,
CATARINA M. LOPES¹ and LILEIA DIOTAIUTI³

¹Departamento de Entomologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ
Avenida Brasil, 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²UR 016, Institut de Recherche pour le Développement (IRD)
911 avenue Agropolis, 34394 Montpellier, France

³Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Avenida Augusto de Lima, 1715
30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil

*Manuscript received on March 3, 2005; accepted for publication on March 30, 2005;
presented by LUCIA MENDONÇA PREVIATO*

ABSTRACT

Observations on the ecology of silvatic Triatominae are still fragmentary, principally because target species in control process are almost exclusively domestic. Report of silvatic species invading human dwellings must lead research to be focused on their original ecology, in order to assist in understanding their process of domestication and devising strategies for surveillance.

Key words: Chagas disease, Triatominae, silvatic environment, ecology.

INTRODUCTION

Chagas disease is ranked as one of the most important parasitic diseases in Central and South America in terms of social and economic impact (Schofield 1994). When in the early 1990s more than 16 million people were infected, control interventions successfully pursued in wide areas of Latin American are estimated to have reduced incidence of Chagas disease in Southern Cone countries by 60 up to 99% in Uruguay and Chile (WHO 1991, Dias et al. 2002, WHO/CTD 2004). The disease is caused by infection with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, mainly transmitted in the fecal droppings of infected

insect vectors. These are large blood-sucking bugs and form a subfamily of the Hemiptera named Triatominae. Their current classification is based mainly on the revision by Lent and Wygodzinsky (1979). According the more recent checklist of valid species, there are now 137 species placed in this Reduviid subfamily (Galvão et al. 2003). The great part of them is widespread in the Americas and maintains enzootic cycle involving wild mammals in a variety of biotopes. According to Rodriguero and Gorla (2004), the species richness of the New World Triatominae increases from the poles towards the equator, peaking over the 5°-10°S latitudinal band.

Several triatomine species have adapted to human dwelling, becoming vectors of Chagas disease. Control of disease relies primarily on interruption of transmission by elimination of these domestic vector populations. Its expected success is aided

Dedicated to the memory of Prof. Dr. Herman Lent.
Articles in honor of Prof. Dr. Herman Lent by initiative of Pedro L. Oliveira, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).
Correspondence to: Dr. François Noireau
E-mail: noireau@ioc.fiocruz.br

by some basic characteristics of Triatominae that make them especially vulnerable to control interventions. They are slowly reproducing insects, with a low capacity of active dispersal, and they have a low population genetic variability. Particularly important is the almost exclusively domestic nature of target species as *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* (Schofield 1994), with the exception of restricted areas in the Bolivian Andes and Chaco where wild populations of *T. infestans* have been reported (Noireau et al. 2005). Finally, except the eggs, all stages are susceptible to insecticides. However, resistance to deltamethrin was recently detected in Argentinean field populations of *T. infestans* (Gonzalez Audino et al. 2004).

In many areas of Latin America, report of silvatic species invading synanthropic structures leads research to be focused on their natural ecology and role in the transmission to man of *Trypanosoma cruzi*. Such researches still fragmentary must be expanded in order to assist in understanding the process of domestication and devising strategies for surveillance.

THE SYNANTHROPIC TRENDS

According to their epidemiological importance, the triatomines may be classified depending on their grade of association with man (Dias and Diotaiuti 1998). The species defined as primary (*R. prolixus* and *T. infestans*) are colonizing permanently the human dwelling, usually in high density, are clearly anthropophilic and present significant index of natural *T. cruzi* infection. Besides the primary vectors, many other triatomine species are displaying synanthropic trends. According to the expanse of their area of distribution, their potential for colonizing human dwelling and proved vectorial capacity, these originally wild species are denominated secondary species, such as *Triatoma brasiliensis* and *Panstrongylus megistus*, or vector candidates as *Triatoma sordida* and *Triatoma pseudomaculata*. The secondary species are generally autochthonous of the region and capable of invading and colonizing

the houses in the absence of a primary species (Dias and Diotaiuti 1998). Being native and ubiquitous, they occupy generally natural or artificial ecotopes close to the houses, are associated to wild or peridomestic animals and exhibit different grades of anthropophily. In particular situations, they can constitute large colonies inside the houses. Lastly, they are proved vectors in the transmission to man of *T. cruzi*. The vector candidates invade the peridomestic structures but are not capable of colonizing the human dwelling. Generally, the question of whether or not they can transmit *T. cruzi* to man is resolved (Noireau et al. 1999). Although anthropogenic environmental changes and succeeding damage to triatomine biotopes seem to promote dispersion and favor the synanthropic process of silvatic species, the basic mechanisms of adaptation of the insect to artificial ecotopes remain poorly understood. Finally, traditional control approaches involving household insecticide spraying are unlikely to be effective against these vectors that keep a silvatic habitat.

According to the occurring of a previous infestation by a primary species and its subsequent eradication, the process of domestication of a wild triatomine may be regarded as primary or secondary (Noireau et al. 1999). It is primary when occurs without any relation to a previous eradication of a primary vector, and secondary when silvatic insects take the place of domestic vectors (Forattini et al. 1984, Noireau et al. 1996). The ecological succession following the control of the domestic population may be due to wild triatomines pertaining to the same species, as it is the case of *Triatoma dimidiata* in Central America and some areas of Colombia, Ecuador and Northern Peru (Dumonteil et al. 2004). More commonly, it is due to other triatomine species until now restricted to silvatic environment (Forattini et al. 1984, Dias 1988).

COLLECTING METHODS

Observations on the distribution, ecology and behavior of triatomine silvatic population (as its association to a specific habitat, nutritional status, feed-

ing preferences, ability to complete the blood meal, dispersal ability and other behavioral features) are fundamental. They supply a “baseline behavioral pattern” of the species, for comparison purposes when further studies will be performed on other populations (for instance, populations displaying synanthropic behavior). Nevertheless, such studies about the wild ecology of triatomine species are still fragmentary, principally because collection of specimens and field observations are considered to be laborious and time-consuming.

The detection of triatomines in natural environment, necessary precondition for further studies, has recently benefited from the use of a simple trapping system (Noireau et al. 2002). For some species, this live-baited adhesive trap may provides the way to detect the presence of triatomines in various terrestrial and arboreal habitats (rock pile, hollow tree, palm tree...) and avoids the ecological damages caused, for example, by felling and dissection trees. Because only the starved bugs are attracted and captured, this system does not allow an estimating of the accurate density of insects and the population structure. Various lines of research are explored to improve the performance of the trap in the field and to design a new trapping system to be used for entomological vigilance after control interventions in intra- and peridomestic habitat. The efficiency of detection methods would benefit particularly from the use of chemical attractants, which would make traps easier to handle in the field and could help to reduce their size (Guerenstein and Guerin 2001).

SILVATIC HABITAT AND SPREAD

According to Gaunt and Miles (2000), links between the three most epidemiological important triatomine genera and sort of habitat do exist. So, species of the genus *Rhodnius* are primarily associated with palm tree, the genus *Panstrongylus* is predominantly found within burrows and tree cavities, and the genus *Triatoma* is associated with terrestrial rocky habitats or rodent burrows. If these assumptions are probably true for the genera *Rhodnius* and *Panstrongylus*,

they are more questionable for the genus *Triatoma*. So, some *Triatoma* species may be exclusively found in hollow trees and/or bird nests (*T. maculata*, *T. platensis*, *T. delpontei*) when others exhibit a clear preference for rocks or caves.

Species may display a close relationship with one ecotope (*Rhodnius brethesi* with the palm tree *Leopoldina piassaba*, *Psammolestes* species with nests of Furnariidae) when others exhibit a greater range of ecotopes (*Panstrongylus megistus*, *Triatoma dimidiata*). Particularly interesting is the case of some triatomine species that can be found in arboreal as well as rocky habitat, when the great majority of Triatominae do not exhibit this feature. It is the case of *T. infestans* and *T. sordida* whose populations of altitude live in rock-piles when those of lowland live in trees. Such species provide good models for studying the pressure of habitat on morphology, genetic traits and behavior of triatomines. The current theory suggests the occurrence of rapid morphological divergence in response to different ecological factors (Dujardin et al. 1999). Indeed, we can observe obvious chromatic differences between arboreal *T. infestans* (*melanosoma* and dark morph populations; Martinez et al. 1987, Noireau et al. 2000) and terrestrial specimens collected in rocky habitat in Bolivia (clear morphs similar to domestic insects). Nevertheless, this model cannot be generalized. So, arboreal and terrestrial wild *T. sordida* do not display chromatic differences. Similarly, the genetically closely related species *T. pseudomaculata* and *T. arthurneivai*, that are probably issued from a common ancestor and have undergo an ecological divergence (the first species is arboreal when the second is terrestrial), do not exhibit significant morphological differences.

The current spread of some target species to free areas is worrying. It is, for example, the case of *Triatoma infestans* that is spreading to warmer and humid areas in Bolivia (Noireau et al. 1996). The implementation of a landscape ecological approach and the applying of a spatial analysis using tools such as remote sensing and GIS can greatly enhance our ability to predict the spatial current distribution

of target species (silvatic foci as well as peridomes-
tic/domestic populations) but also their conceivable
future expansion (Gorla 2002, Graham et al. 2004).

SURVIVAL STRATEGY IN WILD TRIATOMINES

The environmental disturbance brought about by
man and succeeding damage of triatomine biotopes
result in a condition of chronic distress in wild tri-
atomine populations. This was clearly demonstrated
in *T. pseudomaculata* in Northeastern Brazil where
the silvatic insects exhibit a great weight deficit in
relation to peridomiciliary ones. This adverse con-
dition, that may lead the insect to apply a survival
strategy related to the election of habitat, breeding
behavior and host preference, is certainly the main
cause of flight dispersal and subsequent settlement
in artificial structures.

T. pseudomaculata lives in the caatinga of
Northeastern Brazil and is strictly arboricolous. It
can be collected in hollows of numerous tree species,
amongst which locally predominant species such as
Caesalpinia pyramidalis (caatingueira) and *Auxe-
mma oncocalyx* (pau branco). In the framework of
its survival strategy, this vector does not exhibit a re-
stricted association with one (or some) tree species.
But it is also found in nests of Furnariidae (*Pseudo-
seisura cristata*) (Dias-Lima et al. 2003) and, more
occasionally, in burrows of Dasypodidae. In our
study area in Bahia State, more than 50% of dis-
sected trees were positive for *T. pseudomaculata*.
The positive trees held small colonies of insects,
rarely exceeding 10 individuals. It may suggest that
females would lay a small quantity of eggs in a large
number of ecotopes for increasing their chance of
survival.

With relation to host preference, recent works
have pointed out the occurrence of alternative feed-
ing behavior in natural populations of Triatominae.
So, we observed wild *T. pseudomaculata*, *T. sordida*,
T. brasiliensis and *Psammolestes tertius* populations
of the caatinga frequently feeding hemolymph of in-
vertebrate (Carbajal de la Fuente et al. unpublished
data). More surprising, a colony of *Belminus her-*

eri collected from human dwellings in Colombia
exhibited also a strong propensity to hemolymphagy
(Sandoval et al. 2004). The importance and conse-
quences of this biological trait are still unknown.
Its occurrence might vary following the triatomine
species but, at the level of the species, would be in-
fluenced by environmental conditions (accessibility
to blood source). If fixed discrepancies were ob-
served between species or groups of species, this
behavior might help to better understand the evolu-
tionary background of Triatominae. Relationships
between hemolymphagy and population dynamics,
and vector-*T. cruzi* interaction, might be contem-
plated.

This habit is derived from the predaceous be-
havior in other Reduviidae. Nevertheless, when the
assassin bugs prey upon arthropods, pre-digest their
tissues and kill their prey, the Triatominae only im-
mobilize their prey and suck their fluids in the pro-
cess of hemolymphagy.

PERIDOMESTIC POPULATIONS

The survey of peridomestic populations and the
question of their control are actually among the more
difficult challenges. Some important questions re-
main about the understanding of domestic ecology
of triatomines. So, *T. brasiliensis* and *T. pseudomac-
ulata* are closely restricted to different ecotopes in
wild environment (rock-piles and arboreal habitat,
respectively; Dias-Lima et al. 2003). On the other
hand, synanthropic populations of the same species
give up this specificity. They compete for coloniz-
ing man-made structures and succeed in sharing the
same substrates as wood and baked clay (Carbajal
de la Fuente et al. unpublished data). The role
of peridomestic structures remains misunderstood
when occurs recolonization of insecticide treated
villages. They may be source of reinfestation by
residual populations, but also the earliest fixation
point of insects coming from the silvatic environ-
ment (Diotaiuti et al. 2000, Gurtler et al. 2004). The
estimating of gene flow between silvatic, peridomes-
tic and domestic populations is a priority for under-

standing and preventing reinfestation of insecticide treated houses.

CONCLUSION

When recent Chagas disease control activities are making substantial progress, the knowledge about silvatic triatomines, and particularly those in synanthropic process, is clearly insufficient. So, it took us one century after the discovery of Carlos Chagas to realize that triatomines, considered as obligated blood-sucking insects, could have with the hemolymphagy a common alternative feeding behavior. The recent advances of knowledge in the field of nutritional status and feeding habits might devise a means to distinguish silvatic bug populations in terms of their susceptibility to migrate. Combined with studies on orientation mechanisms and dispersal activity, they would greatly assist in understanding the process of domestication.

RESUMO

Conhecimentos sobre a ecologia de Triatominae silvestres são ainda incompletas, principalmente porque as espécies-alvo em processo de controle são exclusivamente domésticas. Registros de espécies silvestres invadindo as habitações humanas devem ser direcionados para a pesquisa sobre conhecimento de sua ecologia no ambiente natural, de modo que se possa compreender melhor o processo de domiciliação e se criarem novas estratégias para vigilância.

Palavras-chave: doença de Chagas, Triatominae, ambiente silvestre, ecologia.

REFERENCES

- DIAS JCP. 1988. Controle de vetores da doença de Chagas no Brasil e risco de reinvasão domiciliar por vetores secundários. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 387–391.
- DIAS JCP AND DIOTAIUTI L. 1998. Vectores secundarios de la enfermedad de Chagas en el Brasil y perspectivas para su control. In: GUHL F AND JARAMILLO CA (Ed.). *Curso Taller. Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis: Aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares*. Corcas Editores Ltda, Santafé de Bogotá, D.C., Colômbia, p. 154–159.
- DIAS JCP, SILVEIRA AC AND SCHOFIELD CJ. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin América. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603–612.
- DIAS-LIMA AG, MENEZES D, SHERLOCK I AND NOIREAU F. 2003. Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). *J Med Entomol* 40: 989–990.
- DIOTAIUTI L, FARIA FILHO OF, CARNEIRO FCF, DIAS JCD, PIRES HHR AND SCHOFIELD CJ. 2000. Aspectos operacionais do controle do *Triatoma brasiliensis*. *Cad Saude Publ* 16 (Supl. 2): 61–67.
- DUJARDIN JP, PANZERA P AND SCHOFIELD CJ. 1999. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 223–228.
- DUMONTEIL E, RUIZ-PIÑA H, RODRIGUEZ-FELIX E, BARRERA-PEREZ M, RAMIREZ-SIERRA MJ, RABINOVICH JE AND MENU F. 2004. Re-infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intra-domicile insecticide application in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 253–256.
- FORATTINI OP, RABELLO EX, FERREIRA OA, ROCHA E SILVA EO AND SANTOS JLF. 1984. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XXI. Comportamento de espécies triatomíneas silvestres na reinfestação do intra e peridomicílio. *Rev Saúde Pub* 18: 185–208.
- GALVÃO C, CARCAVALLO R, ROCHA DS AND JURBERG J. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclature and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1–36.
- GAUNT M AND MILES M. 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557–565.
- GONZALEZ AUDINO P, VASSENA C, BARRIOS S, ZERBA E AND PICOLLO MI. 2004. Role of enhanced detoxication in a Deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 335–339.
- GORLA DE. 2002. Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Ecol Austral* 12: 117–127.

- GRAHAM AJ, ATKINSON PM AND DANSON FM. 2004. Spatial analysis for epidemiology. *Acta Trop* 91: 219–225.
- GUERENSTEIN PG AND GUERIN PM. 2001. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. *J Exp Biol* 204: 585–597.
- GURLER RE, CANALE DM, SPILLMANN C, STARIOLO R, SALOMON OD, BLANCO S AND SEGURA EL. 2004. Effectiveness of residual spraying of peridomestic ecotopes with deltamethrin and permethrin on *Triatoma infestans* in rural western Argentina: a distinct-wide randomized trial. *Bull World Health Org* 82: 196–205.
- LENT H AND WYGODZINSKY P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat History* 163: 127–520.
- MARTINEZ A, OLMEDO RA AND CARCAVALLO RU. 1987. Una nueva subespecie argentina de *Triatoma infestans*. *Chagas* 4: 479–480.
- NOIREAU F, BRENIERE F, CARDOZO L, BOSSENO MF, VARGAS F, PEREDO C AND MEDINACELLI M. 1996. Current spread of *Triatoma infestans* at the expense of *Triatoma sordida* in Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 271–272.
- NOIREAU F, FLORES R, GUTIERREZ T, VARGAS F, BRENIERE F AND DUJARDIN JP. 1999. Triatominae en Bolivia: importancia actual de los candidatos vectores. In: ALFRED CASSAB J ET AL. (Ed.), *La Enfermedad de Chagas en Bolivia – Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002)*, La Paz: Ministerio de Salud y Previsión Social, OMS/OPS, IRD, IBBA, p. 127–133.
- NOIREAU F, BASTRENTA B, CATALÁ S, DUJARDIN JP, PANZERA F, TORRES M, PEREZ R, GALVÃO C AND JURBERG J. 2000. Silvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from field collection to characterization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 (Suppl 1): 119–122.
- NOIREAU F, ABAD-FRANCH F, VALENTE SAS, DIAS-LIMA A, LOPES CM, CUNHA V, VALENTE VC, PALOMEQUE FS, CARVALHO-PINTO CJ, SHERLOCK I, AGUILAR M, STEINDEL M, GRISARD EC AND JURBERG J. 2002. Trapping Triatominae in silvatic habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 61–63.
- NOIREAU F, ROJAS CORTEZ MG, MONTEIRO F, JANSEN AM AND TORRICO F. 2005. Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends Parasitol* 21: 7–10.
- RODRIGUERO MS AND GORLA D. 2004. Latitudinal gradient in species richness of the New World Triatominae (Reduviidae). *Global Ecol and Biogeogr* 13: 75–84.
- SANDOVAL CM, DUARTE R, GUTIERREZ R, ROCHA DS, ANGULO VM, ESTEBAN L, REYES M, JURBERG J AND GALVÃO C. 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 137–140.
- SCHOFIELD CJ. 1994. *Triatominae: biology and control*. Eurocommunica Publications Ed., West Sussex, UK, 76p.
- WHO. 1991. *Control of Chagas disease*. Technical Report Series no. 811, Geneva, 95p.
- WHO/CTD. 2004. Chagas. <http://www.who.int/ctd/chagas/epidemiio.htm>.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)