

Carlos Eduardo Almeida

**GENÉTICA POPULACIONAL DE  
*TRIATOMA BRASILIENSIS* NEIVA, 1911,  
NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL:  
IMPLICAÇÕES ECO-EPIDEMIOLÓGICAS**

Rio de Janeiro 2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**GENÉTICA POPULACIONAL DE *TRIATOMA BRASILIENSIS* NEIVA,  
1911, NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL:  
IMPLICAÇÕES ECO-EPIDEMIOLÓGICAS**

**POPULATION GENETICS ON *TRIATOMA BRASILIENSIS* NEIVA, 1911,  
IN THE STATE OF PARAÍBA, BRAZIL:  
ECO-EPIDEMIOLOGIC IMPLICATIONS**

por

**Carlos Eduardo Almeida**

Tese de doutorado a ser apresentada ao curso de pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz para obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de Entomologia.

Orientadores                      Jane Costa, Ph.D.  
   Raquel S. Pacheco, Ph.D.

**Laboratório de Biodiversidade Entomológica  
Laboratório de Sistemática Bioquímica  
Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz**

Rio de Janeiro - setembro de 2007

*Ao povo sertanejo;*

Dedico

“O sertanejo acorda,  
O céu o espera em espetáculo  
Um restinho de noite ainda teima ficar,  
Quer ver o dia em luz abrindo-se!  
É o sol  
A flor da luz,  
Que ora é espinho só dor...  
Bem depois ele é flor!  
Nessa hora ainda, o sertanejo,  
Olha para o céu  
Acredita em dias melhores,  
Hoje não!  
Ele espera!  
Encosta a enxada no chão,  
A semente cravada na terra  
Aguadas pelo seu suor  
Guarda-se para mais tarde,  
Assim também ele!  
Acende uma vela ao santo,  
Iluminar sua fé!  
Nos dias de espera,  
A esperança lhe espera  
Ela é paciente, o espera  
E compreende se ele desesperar...  
E o crepúsculo avizinha-se  
O sol quase indo,  
Ainda deixa uns teimosos raios  
De si para olhar a noite!  
E o céu já sem estrelas,  
Todas elas nos olhos do sertanejo  
Que está a olhar o céu!  
O sertanejo dorme,  
A natureza guarda para ele  
Um amanhã espetacular!”

“Cotidiano Sertanejo”  
Marluce Freire Nascasbez  
Sertaneja, Poetisa  
Textos & literatura, Ed. Carnaíba PE

A447 Almeida, Carlos Eduardo

Genética populacional de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, no Estado da Paraíba, Brasil : implicações eco-epidemiológicas / Carlos Eduardo Almeida.

– Rio de Janeiro, 2007.

xvii, 167 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2007.

Bibliografia: f. 132-167.

1. Triatoma – Paraíba. 2. Genética populacional. I. Título.

CDD: 595.754

## ***Agradecimentos***

À Fundação Nacional de Saúde, Funasa, pelo auxílio nos trabalhos em campo, que tornaram possível o desenvolvimento dessa tese;

À Diretoria do IOC, pelo excelente trabalho desenvolvido e dedicação ao Instituto Oswaldo Cruz;

À coordenadora vigente e aos ex-coordenadores do curso de Biologia Parasitária: Dra. Ana Gaspar, Dra. Ana Carolina Paula Vicente, Dra. Maria Nazareh Meirelles, Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira, pelo apoio e dedicação à formação dos pesquisadores deste Instituto;

Às orientadoras nacionais (Dra. Jane Costa e Dra. Raquel Pacheco), estrangeira (Dra. Ellen Dotson - *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) pelo apoio, incentivo e credibilidade;

Ao Dr. Ricardo von Sydow pelo apoio, especialmente durante o estágio no CDC;

Ao Dr. Stéphane Dupas (*Institut de Recherche pour le Développement* - IRD) por colaborar no manuscrito, proporcionando os rumos necessários ao desenvolvimento deste trabalho;

À Dra. Karen Haag (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pela criteriosa revisão da tese;

À Dra. Laura Ney, da Fundação Nacional de Saúde, por gentilmente providenciar toda estrutura para os trabalhos de campo e por sua dedicação para melhorar as condições de vida do povo sertanejo;

À Agnes, professora de ciências no colegial, que certamente exerceu papel fundamental no despertar de minha vocação;

À Luciane Wandermurem, da secretaria do Curso de Pós Graduação em Biologia Parasitária pela dedicação a este curso e paciência com os alunos;

Ao Dr. Alexandre Peixoto pelas sugestões para o aprimoramento das análises dos resultados e pelo exemplo de conduta e dedicação;

A LeeAnn Jones, Gena Groner e Audrey Lenhart pelo indispensável apoio no laboratório do CDC;

À Dra. Lynn Y. Huynh (CDC), e ao Dr. Alberto D'Avila (DBBM) pelo auxílio nas análises dos cromatogramas;

Ao. Dr. Márcio Felix (IOC), Dr. John Sved (Universidade de Sydney, Austrália) e Dra. Carine Brouat (Centro de Biologia e Gestão de Populações, França) pela cuidadosa leitura do manuscrito;

Ao Dr. Pedro Hernan Cabello pela presteza e forma simplificada com que apresentou esclarecimentos sobre os princípios básicos do AMOVA;

À Paula Marcet pela presença amiga durante o estágio no laboratório do CDC nos Estados Unidos da América;

À Dra. Marli Lima pelas produtivas discussões sobre ecologia de triatomíneos;

Aos amigos Gleidson, Ana, Nínive, Dani, Renata, Monique, Ademar, Ayr, Aline, Leile, Márcia, Vanessa, Marize e Fernanda, pela colaboração, imprescindível durante todo o desenvolvimento desse trabalho;

À amiga Paula Constancia Aderne Gomes pelo auxílio na confecção da apresentação da tese;

À Dra Maria Nazareh Meirelles, ex-coordenadora do Curso de Pós Graduação em Biologia Parasitária, à Rose Silva da Vice Presidência de Ensino e ao Dr Ricardo Ventura, ex-coordenador Geral da Pós Graduação, pelo apoio em todo o processo para a obtenção do estágio no exterior;

Aos meus pais, Abrahão e Maria, que são um exemplo de amor, luta e perseverança. Atuando sempre como um porto seguro nas minhas horas difíceis, fornecendo fé, amor, carinho e atenção.

À família Carnoli-Ferreira, especialmente ao mais novo membro (Tutukinho) que mesmo à distância traz doçura e esperança de um mundo melhor para seus pais e padrinho;



Às tias Cida e Tetê e para a prima Fernanda pelo carinho, amizade e infinita bondade;

Aos irmãos biológicos: Cris e Gui, e os de coração Tuís, Lílian, Mimi, Zefa, Nando, Karina, Sandrália, Pia, Fabinho, Arthur, Ivana, Ivo, Nekinha, Ventania, Dr. Pipa, Marluci, Marileca, Ci, Alex, Jaci e cia pelo apoio, incentivo, carinho e presença amiga, tornando minha vida mais feliz;

Trabalho realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES III) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Biodiversidade Entomológica** e no **Laboratório de Sistemática Bioquímica** do Instituto Oswaldo Cruz do Instituto Oswaldo Cruz, com as seguintes colaborações:

- Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta-GA;
- Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- Laboratoire Populations Génétique et Evolution, Institut de Recherche pour le Développement.

## RESUMO

O estado da Paraíba apresenta um dos mais altos índices de reinfestação por *Triatoma brasiliensis* após o tratamento domiciliar com inseticidas. A dificuldade para se controlar esta espécie tem sido atribuída à sua capacidade para ocupar os ambientes silvestre, peridomicliar e domiciliar. Uma das questões cruciais em estudos de genética de populações sobre triatomíneos é se populações ecotípicas, distanciadas umas das outras, trocariam migrantes mais frequentemente do que populações fisicamente aproximadas, diferenciadas por ecótopos. Com o intuito de reconhecer as populações que colonizam domicílios após as atividades de controle, a estrutura genética de *T. brasiliensis* foi analisada com o uso do gene mitocondrial (citocromo B) em diferentes localidades geográficas, ecótopos e períodos após o tratamento domiciliar com inseticidas no estado da Paraíba. Quatro diferentes localidades (distanciadas de 16 a 40 Km) foram amostradas. Altos valores de diversidade haplotípica foram registrados, atingindo 0,93. Todos os haplótipos encontrados no intradomicílio foram também encontrados no peridomicílio e no ambiente ruderal, ressaltando o papel destes ambientes como recursos de populações invasoras. Análises de variância molecular (AMOVA) demonstraram que o agrupamento de populações por localidade geográfica resultou em uma maior variação dentro das localidades ( $\Phi_{SC} = 0,15$ ) do que entre elas ( $\Phi_{CT} = 0,07$ ). Um padrão similar foi obtido quando as populações foram agrupadas por ecótopo ( $\Phi_{SC} = 0,17$  e  $\Phi_{CT} = 0,04$ ). O percentual de variação foi reduzido entre os sítios dentro dos grupos e elevado entre grupos ( $\Phi_{SC} = 0,08$ ,  $\Phi_{CT} = 0,16$ ), agrupando (i) as populações domiciliares de cada vila. (ii) todas as populações ruderais e (iii) a silvestre. Assim, dentro da área estudada *T. brasiliensis* está estruturado ecologicamente e em menor escala geográfica para populações domiciliares dentro de cada vilarejo. As populações provenientes dos ambientes ruderal e silvestre apresentaram perfis genéticos distintos, sendo que as populações ruderais apresentaram maior afinidade genética com as populações domiciliares. As reinfestações após o tratamento com inseticida foram compostas por populações distintas. São apresentadas evidências de que a recuperação de populações tratadas com inseticidas pôde infestar localidades adjacentes. Estes resultados indicam que as particularidades de recursos populacionais para reinfestações domiciliares devem ser consideradas no planejamento das atividades de controle.

## ABSTRACT

The state of Paraíba, Brazil, exhibits one of the highest reinfestation rates by *Triatoma brasiliensis* after domiciliary insecticide treatment. The difficulty of controlling this species has been attributed to its capacity to occupy the wild, peridomiciliary, and domiciliary environments. One of the key questions of population genetic studies on triatomines is whether ecotopic populations distant from each other would exchange migrants more often than physically close ones differing by ecotope. In order to recognize populations which colonize domiciles after control activities, the genetic structure of *T. brasiliensis* was analyzed by mitochondrial gene (cyt B) variation between geographic location and ecotopes in a short and long period after domiciliary insecticide treatment in the state of Paraíba, Brazil. Four different localities (ranging from 16 to 40 km apart) were sampled. High haplotype diversity values were recorded, reaching 0.93, the most in this study. All haplotypes found in intradomiciles were also found in both the peridomiciliary and ruderal ecotopes, highlighting the role played by these environments as sources of invasive populations. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that grouping populations according to the geographic location resulted in a higher variance within localities than among them. A similar pattern was obtained if we grouped populations by ecotope ( $\Phi_{SC} = 0.15$  and  $0.17$ ,  $\Phi_{CT} = 0.07$  and  $0.04$ , respectively). The percentage of variation was increased between groups and reduced between sites within groups ( $\Phi_{SC} = 0.08$ ,  $\Phi_{CT} = 0.16$ ) by grouping (i) the domiciliary populations from each village, (ii) all ruderal populations, and (iii) the sylvatic one. The data obtained showed that within the area studied *T. brasiliensis* is genetically structured both ecological and at smaller geographical scales. Populations from ruderal and sylvatic environments exhibited distinct genetic profiles and ruderal populations exhibited higher similarity with domiciliary populations. Reinfestations after insecticide treatment were composed by distinct populations. This study suggests that the recovery of insecticide-treated populations in some localities came from survivors from neighboring sites. Therefore, the variable population sources for domiciliary infestations should be considered for control measures.

# **ABREVIATURAS**

## **Localidades**

As letras 'A', 'B', 'C' e 'S' referem-se às localidades apresentadas no mapa. As localidades 'A', 'B' e 'C' foram divididas em duas sub-localidades definidas pelos números '1' e '2' (vide Figura 5)

## **Ecótopos**

As letras 'I', 'P', 'R' e 'S' correspondem aos ecótopos intradomiciliar, peridomiciliar, ruderal e silvestre, respectivamente.

## **Populações**

Exceto para a amostragem silvestre ('S'), o primeiro caractere indica a localidade ('A', 'B', 'C' ou 'S'), o segundo a sub-localidade ('1' ou '2') e o último, o ecótopo ('I', 'P' ou 'R'). Ex: 'A1P' = população peridomiciliar da sub-localidade 'A1'. Nas situações onde a amostragem intradomiciliar e peridomiciliar foram reunidas, utilizou-se o sufixo 'IP', também referido como "domiciliar". Ex: 'B2IP' = população intradomiciliar e peridomiciliar da localidade 'B2'.

## **Outras**

c.f. = com referência

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1.A DOENÇA DE CHAGAS: INFORMAÇÕES GERAIS E CENÁRIO ATUAL .....	1
1.2. INSETOS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS.....	5
1.2.1. <i>TRIATOMA INFESTANS</i> .....	7
1.2.2. <i>TRIATOMA DIMIDIATA</i> .....	10
1.2.3. <i>TRIATOMA SORDIDA</i> .....	12
1.2.4. <i>TRIATOMA PSEUDOMACULATA</i> .....	12
1.2.5. <i>PANSTRONGYLUS MEGISTUS</i> .....	14
1.2.6. <i>RHODNIUS PROLIXUS</i> .....	15
1.3. OUTRAS ESPÉCIES QUE VEM APRESENTANDO AMEAÇAS À SAÚDE PÚBLICA .....	16
1.4. A EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGA E O PROCESSO DE DOMICILIAÇÃO DOS TRIATOMÍNEOS .....	20
1.5. <i>TRIATOMA BRASILIENSIS</i> .....	24
1.5.1. MORFOLOGIA DE <i>TRIATOMA BRASILIENSIS</i> .....	24
1.5.2. ASPECTOS DA BIOLOGIA DE <i>TRIATOMA BRASILIENSIS</i> .....	25
1.5.3. INTERAÇÃO PARASITA-VETOR EM <i>TRIATOMA BRASILIENSIS</i> .....	28
1.5.4. ESTUDOS ECOLÓGICOS DE <i>TRIATOMA BRASILIENSIS</i> .....	29
1.5.5. ESTUDOS TAXONÔMICOS DE <i>TRIATOMA BRASILIENSIS</i> .....	30
1.5.6. BREVE RESUMO DO “COMPLEXO BRASILIENSIS”, BASEADO EM COSTA ET AL. (2007).....	33
1.5.6.1. <i>TRIATOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> NEIVA, 1911 .....	33
1.5.6.2. <i>TRIATOMA BRASILIENSIS MACROMELASOMA</i> GALVÃO, 1956. 35	
1.5.6.3. <i>TRIATOMA MELANICA</i> NEIVA E LENT, 1941 .....	37
1.5.6.4. <i>TRIATOMA JUAZEIRENSIS</i> (COSTA E FELIX, 2007).....	39
1.5.7. ASPECTOS OPERACIONAIS NO CONTROLE DE <i>TRIATOMA BRASILIENSIS</i> .....	41
1.6. A CAPACIDADE DE DISPERSÃO ATIVA DOS TRIATOMÍNEOS .....	43
1.7. MARCADORES MOLECULARES EM INSETOS.....	44
1.8. MARCADORES BASEADOS EM PCR.....	47
1.9. MARCADORES BASEADOS EM SEQUENCIAMENTO .....	49
1.10. GENÉTICA POPULACIONAL: PRINCIPAIS CONCEITOS E BREVE HISTÓRICO .....	52

1.11. FERRAMENTAS MOLECULARES E INSETOS VETORES, COM ENFOQUE PARA TRIATOMINAE.....	57
2. JUSTIFICATIVA.....	62
3. OBJETIVOS.....	63
3.1. OBJETIVO GERAL.....	63
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
4.1. CAPTURAS.....	64
4.2. INSETOS.....	68
4.3. EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA.....	74
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS HAPLÓTIPOS.....	75
4.5. NEUTRALIDADE E DEMOGRAFIA.....	76
4.6. GENEALOGIA.....	77
4.7. ESTRUTURA GENÉTICA.....	77
4.7.1. ISOLAMENTO POR DISTÂNCIA.....	77
4.7.2. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL VS. ECOLÓGICA.....	78
4.7.3. ESTRUTURA GENÉTICA ECO-ESPACIAL VS. TEMPORAL.....	79
4.8. ANÁLISE INTEGRADA DOS RESULTADOS.....	80
5. RESULTADOS.....	81
5.1. CAPTURAS.....	81
5.2. SEQÜÊNCIAS DE DNA.....	85
5.3. NEUTRALIDADE E DEMOGRAFIA.....	87
5.4. ESTRUTURA GENÉTICA.....	91
5.5. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL E ISOLAMENTO POR DISTÂNCIA.....	97
5.6. ESTRUTURA GENÉTICA ECOTÍPICA.....	100
5.7. ESTRUTURA GENÉTICA CONSIDERANDO-SE AMBAS AS FORÇAS..	101
5.8. INFLUÊNCIA DO FATOR TEMPORAL E DAS ATIVIDADES DE CONTROLE NA ESTRUTURA GENÉTICA DE <i>T. BRAS. BRASILIENSIS</i> .....	103
6. DISCUSSÃO.....	106
6.1. ECO-EPIDEMIOLOGIA DE <i>T. BRAS. BRASILIENSIS</i> .....	106
6.2. ANÁLISES DOS HAPLÓTIPOS.....	108
6.3. DESVIO DA NEUTRALIDADE E DEMOGRAFIA.....	109
6.4. ESTRUTURA GENÉTICA.....	111
6.4.1. ISOLAMENTO POR DISTÂNCIA E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL.....	112

6.4.2. ESTRUTURA GENÉTICA ECOLÓGICA .....	114
6.4.3. ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR PARA DEFINIÇÃO DAS FORÇAS ECOLÓGICAS E ESPACIAIS ENVOLVIDAS NA ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE <i>T. BRAS. BRASILIENSIS</i> .....	116
6.4.4. INFLUÊNCIA DO FATOR TEMPORAL NA ESTRUTURA GENÉTICA ECO-ESPACIAL DE <i>T. BRAS. BRASILIENSIS</i> .....	117
6.5. IMPLICAÇÕES NO CONTROLE VETORIAL.....	119
7. CONCLUSÕES .....	121
8. SUGESTÕES .....	122
9. ARTIGO DA TESE ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	123
9.1. INFERRING FROM CYT B GENE THE <i>TRITOMA BRASILIENSIS</i> NEIVA, 1911 (HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE) GENETIC STRUCTURE AND DOMICILIARY INFESTATION IN THE STATE OF PARAÍBA, BRAZIL.....	123
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	132



# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> NEIVA, 1911 .....	34
FIGURA 2. <i>TRITOMA BRASILIENSIS MACROMELASOMA</i> GALVÃO, 1956.....	36
FIGURA 3. <i>TRITOMA MELANICA</i> NEIVA E LENT, 1941 .....	38
FIGURA 4. <i>TRITOMA JUAZEIRENSIS</i> (COSTA E FELIX, 2007).....	40
FIGURA 5. SÍTIOS DE COLETA PARA OS ESPÉCIMENS DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> NAS QUATRO LOCALIDADES ('A', 'B', 'C' E 'S') NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL. EXCETO PARA 'S' (PONTO SILVESTRE), CADA LOCALIDADE FOI DIVIDIDA EM DUAS SUB-LOCALIDADES ('1' E '2').....	65
FIGURA 6. INTADOMICÍLIO ONDE EXEMPLARES DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> FORAM COLETADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DA LAGOA TAPADA, PARAÍBA.....	69
FIGURA 7. AMBIENTE PERIDOMICILIAR ONDE EXEMPLARES DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> FORAM COLETADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DA LAGOA TAPADA, PARAÍBA. ....	70
FIGURA 8. AMBIENTE RUDERAL ONDE EXEMPLARES DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> FORAM COLETADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DA LAGOA TAPADA, PARAÍBA. ....	71
FIGURA 9. AMBIENTE SILVESTRE ONDE EXEMPLARES DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> FORAM COLETADOS NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DA LAGOA TAPADA, PARAÍBA. ....	73
FIGURA 10. GENEALOGIA DE GENES CONSTRUÍDA POR PARCIMÔNIA MÁXIMA MOSTRANDO A RELAÇÃO ENTRE OS 29 HAPLÓTIPOS DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> BASE .90	
FIGURA 11. ÁRVORE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE DISTÂNCIAS LINEARES PAR-A-PAR FST DOS SÍTIOS POPULACIONAIS DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> . OS PONTOS DE COLETA NO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL SÃO MOSTRADOS NA FIGURA 5. O SUFIXO 'I' E 'P' SÃO REFERENTES A POPULAÇÕES COLETADAS EM INFESTAÇÕES BEM ESTABELECIDAS NO INTRADOMICÍLIO E PERIDOMICÍLIO, ESPECTIVAMENTE. ....	93
FIGURA 12. ÁRVORE <i>NEIGHBOR-JOINING</i> DE DISTÂNCIAS LINEARES PAR-A-PAR (FST) DE POPULAÇÕES DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> . O SUFIXO 'IP' REFERE A POPULAÇÕES COLETADAS EM INFESTAÇÕES BEM ESTABELECIDAS NO PERI E INTRADOMICÍLIO.....	95
FIGURA 13. DISTANCIA EUCLIDEANA REPRESENTANDO A DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA VS. GEOGRÁFICA DE UM ÚNICO PAR DE POPULAÇÕES DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> .....	99

# ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. TAMANHO AMOSTRAL (N), DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA (Hd) E NÚMERO DE CADA HAPLÓTIPO ENCONTRADO EM CADA SÍTIO. ....	84
TABELA 2. SÍTIOS VARIÁVEIS NOS 510 PB DO GEN CYT B PARA OS 29 HAPLÓTIPOS DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> COLETADOS AO LONGO DA ÁREA DE ESTUDO. ...	86
TABELA 3. POPULAÇÕES ECOTÍPICAS, GEOGRÁFICAS OU SÍTIOS, TAMANHO AMOSTRAL (N) ESTIMATIVAS DA VARIABILIDADE E TESTES DE NEUTRALIDADE PARA O FRAGMENTO DO GENE DO CITOCROMO B PARA COLETAS DE <i>T. BRAS. BRASILIENSIS</i> NO ESTADO DA PARAÍBA. ....	89
TABELA 4. COMPARAÇÃO DE FST PAR-A-PAR PARA POPULAÇÕES DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> DOMICILIARES, RUDERAIS E SILVESTRES DE QUATRO LOCALIDADES DO ESTADO DA PARAÍBA, BRASIL. ....	94
TABELA 5. COMPARAÇÃO DE FST PAR-A-PAR PARA POPULAÇÕES DE <i>TRITOMA BRASILIENSIS BRASILIENSIS</i> DOMICILIARES (INTRA + PERIDOMICILIAR).....	96
TABELA 6. COMPONENTES DE VARIAÇÃO PARA AMOVA, PERCENTAGEM DE VARIAÇÃO EXPLICADA EM CADA NÍVEL HIERÁRQUICO ESPACIAL/ECOTÓPICO E ÍNDICES DE FIXAÇÃO PARA SÍTIOS AGRUPADOS DE DIFERENTES MANEIRAS.....	102
TABELA 7: COMPONENTES DE VARIAÇÃO PARA AMOVA, PERCENTAGEM DE VARIAÇÃO EXPLICADA EM CADA NÍVEL HIERÁRQUICO ESPACIAL/TEMPORAL E ÍNDICES DE FIXAÇÃO PARA POPULAÇÕES AGRUPADAS DE ACORDO COM SINAIS DE RECURSOS POPULACIONAIS PARA INFESTAÇÕES (PROVENIENTES DE RECURSOS DOMICILIARES OU RUDERAIS/SILVESTRES).....	105

# 1. Introdução

## 1.1. A doença de Chagas: informações gerais e cenário atual

O marco inicial e histórico nos estudos da doença de Chagas deu-se em 1909, quando Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, em fato inédito na medicina, apontou os primeiros casos humanos da doença em Minas Gerais, determinou o agente etiológico (*Trypanosoma cruzi*) e aspectos básicos do seu ciclo de vida, identificou as principais espécies vetoras e reservatórios silvestres, descrevendo assim a doença que recebeu seu nome.

Na América Latina, estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi* e 100 milhões expostas ao risco de infecção (WHO 2002). Devido aos altos índices de morbi-mortalidade, em meados da década passada esta enfermidade foi considerada a quarta moléstia de maior impacto social no Brasil, com cerca de três milhões de pacientes sintomáticos. Estima-se que 25% dos habitantes de áreas rurais em toda América Latina estejam em risco de contrair esta moléstia (Dias 1995, Morel e Lazdins 2003, SWG 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO 2002), mais de 80% dos casos da doença são atribuídos à transmissão vetorial. O restante dos casos é atribuído à transfusão sangüínea (16%), à transmissão congênita, oral e ao transplante de órgãos (2%), e a acidentes de laboratório (<1%).

A via digestiva parece ser de ocorrência freqüente entre os animais e alguns casos humanos têm sido confirmados e associados a graves quadros agudos da doença de Chagas. Em 2005, 37 pacientes foram infectados após ingerir caldo de cana em Florianópolis, capital de Santa Catarina. Na região Amazônica acredita-se que a via oral também seja responsável por grande

parte das infecções por *T. cruzi* (Nery-Guimarães 1968, Shikanai-Yasuda et al. 1991, Valente et al. 1999, Lewinsohn 2005).

Esta enfermidade, também conhecida como Tripanosomíase Americana, é uma antroponose, cujas patologias humanas mais sérias são alterações cardíaca, digestiva e do sistema nervoso. Em seu ciclo natural, *T. cruzi* infecta mamíferos e apresenta como hospedeiros invertebrados várias espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae (vetores). A doença é quase exclusiva de áreas rurais onde os insetos vetores podem contaminar-se principalmente nos reservatórios naturais de *T. cruzi*, entre os quais os mais comuns são os gambás (didelfídeos) e tatus (dasipodídeos). Entretanto, mamíferos domésticos (ex: gatos e cachorros), bem como humanos, também podem atuar como reservatórios importantes do parasita. Os triatomíneos podem alimentar-se de sangue de aves, que não mantêm *T. cruzi*, não sendo, portanto, considerados reservatórios. Contudo, especialmente galiformes são importantes recursos alimentares para várias espécies de triatomíneos no peridomicílio, proporcionando a manutenção de numerosas colônias de insetos vetores (WHO 2002).

Em humanos, o ciclo natural pode se iniciar no ato da picada, quando formas tripomastigotas metacíclicas provenientes dos excretas dos triatomíneos penetram pela lesão provocada pela picada ou pelas mucosas (Chagas 1909, WHO 2002). Após a infecção e estabelecimento parasitário, aproximadamente 70% dos indivíduos continuam assintomáticos e 30% desenvolvem manifestações patológicas (Ferreira et al. 1997). Na fase crônica, a patologia mais importante do ponto de vista médico-social é a cardiopatia

chagásica crônica, sendo a principal manifestação associada à morbimortalidade na doença de Chagas (Dias 1995).

Através da dissecação de múmias provenientes dos vales Andinos e Peruanos, foram detectadas infecções por *T. cruzi* ocorridas há cerca de 7.000 A.C. (Aufderheide et al. 2004). Silva (1985) apresentou indícios de que esta doença tenha sido uma patologia comum no sertão brasileiro logo após a colonização, indicada no passado principalmente pela forma clínica de megaesôfago. Nos anos 70 já haviam no Brasil mais de cinco milhões de brasileiros infectados por *T. cruzi*, estimando-se 100 mil casos novos por ano e uma mortalidade superior a 10 mil casos anuais. Apenas 5% dos bancos de sangue faziam o controle dos doadores e mais de 700 municípios tiveram suas casas infestadas por triatomíneos. Assim, em continuidade a um programa criado em 1991, denominado “Iniciativa do Cone Sul”, uma série de ações objetivando o controle desta moléstia foram estabelecidas no Brasil em cooperação com o Chile, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai (Schofield e Dias 1999).

De 1991 a 1997, o programa de controle da doença de Chagas no Brasil cobriu cerca de dois milhões de unidades domiciliares rurais com borrifações com inseticidas, alcançando sucesso marcante em uma série de localidades antes consideradas altamente endêmicas. Foi também instalada a seleção sorológica nos bancos de sangue. As capturas do principal vetor da doença de Chagas na ocasião (*Triatoma infestans* Klug, 1834), que atingiram a marca de mais de 80 mil exemplares coletados no ano de 1979, caíram para pouco mais de 40 exemplares em 2005. Desapareceram os jovens e crianças infectados, chegou-se a 100% de controle nos bancos de sangue. A prevalência de

positividade para a infecção baixou de 5-7% para somente 0,65% nos candidatos à doação. Assim, em junho de 2006, a Organização Panamericana de Saúde (OPS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) concederam o certificado de eliminação da transmissão da doença de Chagas por *T. infestans* e pela via transfusional ao Brasil (Dias 2006).

O sucesso obtido pelo Brasil sob o ponto de vista médico e social fez com que a “Iniciativa do Cone Sul” estimulasse campanhas de controle em outros países (Dias e Schofield 1999). O Paraguai, a Bolívia e o Peru seguiram modelo similar e também alcançaram sucessos marcantes. Desta forma, foi demonstrado que este modelo de cooperação internacional é eficiente e uma iniciativa semelhante vem sendo implantada desde 1997 na Região andina e na América Central. O México e a Região amazônica permanecem como os principais desafios operacionais. Projeções indicam que a vigilância vetorial e a detecção prévia, bem como o devido cuidado de pessoas já infectadas pela doença de Chagas são formas eficazes para se controlar a emergência e reemergência dessa moléstia (Dias et al. 2002).

O tratamento quimioterápico para a doença de Chagas ainda apresenta resultados insatisfatórios e há três décadas vem sendo baseado em nitroimidazóis e nitrofuranos. Atualmente, a droga mais usada tem sido o benzonidazol, alcançando índices de cura de 76% na fase aguda da doença (Cançado 1999). Resultados recentes em camundongos demonstraram que o benzonidazol também previne o desenvolvimento de cardiomiopatia severa na fase crônica da doença, entretanto, além de altamente tóxico para mamíferos, esta droga não apresentou êxito na eliminação do parasita (Garcia et al. 2005).

Apesar do recente destaque da transmissão transfusional e oral da doença de Chagas, a transmissão vetorial é considerada, ainda hoje, o principal mecanismo de infecção desta moléstia em humanos (Schmunis 1999a,b; Dias 2006).

Uma vez que o tratamento quimioterápico ainda não apresenta resultados satisfatórios, e que a transmissão através do inseto vetor ainda é considerada a forma mais comum de se contrair a doença de Chagas, o monitoramento vetorial é tido como uma forma saudável, no senso estrito da palavra, bem como econômica de combater-se a doença de Chagas (Dias 2006).

### **1.2. Insetos vetores da doença de Chagas**

Em 1590, o Padre Reginaldo Lizárraga fez menção a insetos grandes que sugavam sangue humano, os quais ele havia visto durante suas viagens de inspeção a conventos religiosos em países como Peru, Bolívia e Chile (Caso 1954). Mais tarde, no início do século XIX, Charles Darwin (1845) fez um breve registro em seu diário de anotações, conhecido como “A Viagem do Beagle”, informando a existência de triatomíneos na América do Sul. Trechos das anotações diziam:

... na aldeia de Lujan de Cuyo na Argentina experimentei um ataque (nenhum outro nome seria mais apropriado) de “benchuca” ...

... insetos ápteros, medindo cerca de uma polegada que antes de sugar são bastante magros, mas que depois, ficam redondos e inchados com o sangue ingerido ...

Algumas décadas após a viagem de Darwin foi descoberto que estes insetos poderiam atuar como vetores de uma das mais importantes doenças tropicais do mundo (Chagas 1909), existindo indicações de que Charles Darwin, tenha também sido vitimado pela patologia transmitida por esse grupo de insetos (Bernstein 1984).

Os vetores da doença de Chagas pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, que compreende insetos geralmente grandes, facilmente reconhecíveis por apresentarem um par de asas tipo hemélitros e aparelho bucal picador-sugador. Este último, quando em repouso, aloja-se em uma bainha ou probóscida que se mantém fletida ventralmente sob a cabeça e o prótórax, o qual é bem desenvolvido neste grupo de insetos. No mesonoto, o escutelo é característico por seu formato triangular situado entre a base das asas. Os triatomíneos apresentam registros fósseis com cerca de 230 - 280 milhões de anos (Lent e Wygodzinsky 1979). A primeira espécie deste grupo foi descrita como *Cimex rubrofasciatus*, que foi posteriormente designada como *Triatoma rubrofasciata* (De Geer 1773) por Laporte (1833).

Os triatomíneos são vulgarmente conhecidos como barbeiros, vinchucas, chirimachas, chupões, procotós, e muitos outros nomes. Estes insetos situam-se na família Reduviidae, que agrupa, em sua maioria, percevejos predadores distribuídos por várias subfamílias. Segundo Lent e Wygodzinsky (1979), todos os triatomíneos são hematófagos obrigatórios durante todos os estádios ninfais e adulto, mostrando indícios de uma estreita co-evolução com vertebrados. Segundo Schofield et al. (1999), a hematofagia obrigatória resultou de uma modificação evolutiva a partir de uma hematofagia facultativa em ancestrais predadores que habitaram ninhos de animais, no entanto, não se conhece



precisamente este(s) táxon(s) e tal questão é dificultada pela carência de registros fósseis (Schofield 2000, Galvão et al. 2003).

Galvão et al. (2003) listaram 137 espécies de triatomíneos distribuídas pelas tribos Triatomini Jeannel, 1919, Rhodniini Pinto, 1926, Cavernicolini Usinger, 1944, Bolboderini Usinger, 1944 e Alberproseniini Martinez e Carcavallo, 1977, sendo que na tribo Triatomini encontra-se a maioria das espécies descritas, que foram agrupadas nos seguintes gêneros: *Triatoma* Laporte, 1832; *Eratyrus* Stal, 1859; *Panstrongylus* Berg, 1879; *Linshcosteus* Distant, 1904; *Paratriatoma* Barber, 1938; *Dipetalogaster* Usinger, 1939 e *Mepraia* Mazza, Gajardo e Jorg, 1940.

A lista contendo 137 espécies de triatomíneos apresentada por Galvão et al. (2003) já não mais corresponde ao cenário atual. Um exemplo disso foi apresentado recentemente: a redescrição de *Triatoma melanica* (Costa et al., 2006) com *status* específico e a descrição de uma espécie nova para o “complexo brasiliensis”: *T. juazeirensis* (Costa e Felix, 2007). Entretanto, o cenário dos vetores incriminados como responsáveis pela manutenção da endemia chagásica permanece abrangendo *T. infestans*, *T. dimidiata* (Latreille, 1811), *T. sordida* (Stal 1859), *T. pseudomaculata* Corrêa e Espínola, 1964, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 e *T. brasiliensis* Neiva, 1911. Exceto para *T. brasiliensis*, que será tratado detalhadamente em outro capítulo, uma breve revisão sobre cada um destes vetores será apresentado na ordem supracitada:

### **1.2.1. *Triatoma infestans***

Na história da doença de Chagas, *T. infestans* foi incriminado pela transmissão do maior número de casos da doença de Chagas. Devido à sua

importância epidemiológica, esta espécie foi amplamente estudada, sendo aqui apresentada mais detalhadamente. Mais informações sobre sua associação com essa moléstia no Brasil são apresentadas no tópico “A epidemiologia da doença de Chaga e o processo de domiciliação dos triatomíneos”.

Lent e Wygodzinsky (1979) postularam que populações silvestres de *Triatoma infestans* estavam restritas aos vales Andinos, onde esta espécie apresenta como principais ecótopos as fendas entre as rochas, os ocos em árvores caídas e pedregais, freqüentes refúgios de marsupiais, aves e roedores. Mais da metade dos exemplares silvestres de *T. infestans* coletados recentemente por Cortez et al. (2007) nos vales andinos de Cochabamba estavam infectados por *T. cruzi*.

Quando as autoridades de saúde brasileiras estavam determinadas a tomar medidas para controlar a doença de Chagas, *T. infestans* foi apontado como o mais importante vetor, e Silva (1985) indicou sua introdução recente de no Brasil, baseado em relatos científicos sobre a doença de Chagas desde 1909. Esta espécie foi amplamente distribuída por vários países da América do Sul até o final da década de 90, com altos índices de infestação domiciliar, especialmente na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile e Equador (Moncayo 2003).

A ampla distribuição geográfica de *T. infestans* foi atribuída ao transporte passivo ocorrido durante migrações humanas, já que se trata da espécie mais bem adaptada ao ambiente intradomiciliar, onde pode se alojar nas rachaduras das paredes, no telhado, entre as roupas, sob camas, entre outros micro-habitats (Lent e Wygodzinsky 1979).

A introdução efetiva de piretróides sintéticos nas campanhas de controle de triatomíneos domiciliados a partir da década de 1980 obteve sucesso para

*T. infestans* principalmente porque esta espécie (ou a “linhagem” domiciliada) parece apresentar baixa variabilidade genética o que predispõe suscetibilidade a inseticidas e capacidade limitada para colonizar diferentes habitats (Dujardin et al. 1987, 1988; Brenière et al. 1997, Giordano et al. 2005).

Através de abordagens morfométricas e moleculares foi proposto que *T. infestans* apresenta-se como um subcomplexo de espécies composto também por *T. platensis* Neiva, 1913, *T. melanosoma* Martínez, Olmedo e Carcavallo, 1987 e *T. delpontei* Romanã e Abalos, 1947 (Bargues et al. 2006). *Triatoma platensis* tem distribuição geográfica conhecida no Paraguai, Uruguai e Argentina, sendo uma espécie que habita quase exclusivamente ninhos de aves (furnarídeos e psitacídeos), mas que também pode colonizar galinheiros, onde já foi reportado o encontro de híbridos naturais com *T. infestans* (Pereira et al. 1996).

*Triatoma delpontei* é também ornitófilo e arboreal, distribuído pela Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina, sem relevância na epidemiologia chagásica. Esta espécie demonstra uma estreita relação com uma espécie de psitacídeo (*Myiopsitta monachus*) de hábito gregário (Salvatella 1986).

*Triatoma melanosoma* foi originalmente descrito como subespécie de *T. infestans*. Posteriormente, este táxon foi elevado à categoria específica por Lent et al. (1994) e, recentemente, sinonimizado com *T. infestans* por Gumiel et al. (2003). Este morfotipo é exclusivamente encontrado na Argentina e difere de *T. infestans sensu stricto* pela coloração enegrecida de seu exoesqueleto. Dois outros padrões cromáticos silvestres foram recentemente descritos na Bolívia: o primeiro foi encontrado em ocos de árvores no Chaco e o segundo em pedregais nos vales Andinos (Noireau et al. 1997, Cortez et al. 2007).

Um estudo filogeográfico do “subcomplexo infestans” foi desenvolvido com o uso de genes ribossomais (ITS-2) e tentou explicar a rota migratória e evolutiva de seus integrantes, concluindo que, possivelmente, o centro de origem e dispersão do táxon ancestral ocorreu nos vales andinos da Bolívia, seguindo duas linhas de dispersão: a primeira possivelmente seguiu através dos Andes bolivianos e peruanos e a segunda por áreas de baixa altitude do Chile, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil (Bargues et al. 2006).

A hipótese de que os vales Andinos teriam sido o centro de origem e dispersão desta espécie (Bargues et al. 2006), já havia sido postulada (Dujardin et al. 1998), sendo acatada e seguida por vários outros autores (ex: Schofield 1988), entretanto, o achado de um novo morfotipo silvestre de *T. infestans*, descrito por Cortez et al. (2007) em regiões intermediárias entre o Chaco e Andes bolivianos, associado a outros dados sobre a ecologia desta espécie no Chaco boliviano (Carcavallo et al. 2000), sugeriram que, possivelmente, a população andina poderia ter sido originada por expansões demográficas de populações do Chaco ou intermediárias entre os Andes e Chaco bolivianos.

### **1.2.2. *Triatoma dimidiata***

Trata-se de uma espécie muito variável geneticamente, com ampla distribuição geográfica. Acevedo et al. (2000) indicou que *T. dimidiata* foi originária de áreas intermediárias entre o sul do México com norte da Guatemala. Sua distribuição geográfica abrange a Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, todos os países da América Central e sul do México (c.f. Dujardin et al. 2000).

Atualmente é considerado o principal vetor na Guatemala, El Salvador, Nicarágua e Costa Rica, é o segundo mais importante vetor em Honduras e Colômbia. Esta espécie ocupa uma variedade ampla de ecótopos, como pilhas de rochas, cavernas ocupadas por morcegos e árvores ocas e abrigos de mamíferos. Os espécimes freqüentemente chegam ao intradomicílio transportados pelo próprio homem através de feixes de lenha (Zeledon e Rabinovich 1981). Através de citometria, Panzera et al. (2006) demonstrou que, na verdade, *T. dimidiata* trata-se de um complexo de espécies com potenciais epidemiológicos distintos. Estudos recentes desenvolvidos na Costa Rica e México através de RAPD-PCR, microsatélites e morfometria mostraram que uma variante desta espécie mantém fluxo gênico significativo entre domicílios (Melgar et al. 2007). Já em Yucatan, Península do México, um padrão heterogêneo foi observado com notável fluxo gênico entre os diferentes ecótopos (Dumonteil et al. 2007). Estes achados reforçaram observações prévias de que para o controle ideal desta espécie é necessário levar em conta sua variabilidade genética e diversidade de habitats (Zeledón et al. 1973 e Monroy et al. 2003).

Recentemente, Zeledón e Rojas (2006) basearam-se nas características biológicas e comportamentais de *T. dimidiata* para desenvolver um projeto piloto em áreas da Costa Rica onde esta espécie apresentou altos índices de infestação. O método foi basicamente a remoção de objetos que poderiam servir como abrigo para *T. dimidiata*. A eficiência do manejo do peridomicílio foi evidente, uma vez que um ano após a intervenção nenhum inseto foi capturado nos domicílios monitorados.

### **1.2.3. *Triatoma sordida***

Este triatomíneo é autóctone no Brasil, mas sua distribuição estende-se até o chaco argentino e boliviano (Forattini et al. 1971a,b; Forattini 1980). Trata-se de espécie amplamente distribuída em ambientes domiciliares e silvestres por todo o cerrado, incluindo as áreas de transição do Maranhão, Piauí, Bahia, Pantanal e do Chaco Oriental, onde é encontrada principalmente sob as cascas de árvores (Foratini 1980). Noireau et al. (1999a,b) evidenciaram uma espécie críptica de *T. sordida* no chaco boliviano.

*Triatoma sordida* é considerada espécie predominantemente peridomiciliar, mas capaz de colonizar domicílios e formar numerosas colônias intradomiciliares, o que incluiu esta espécie entre as prioridades para campanhas de controle de triatomíneos no Brasil. Os índices de captura de *T. sordida* têm preocupado as autoridades de saúde em áreas de ocupação agrícola nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. (Diotaiuti et al. 1995, Silva et al. 2005, Oliveira e Silva 2007, Pelli et al. 2007).

A partir da intensificação das campanhas de controle e eliminação dos focos de *T. infestans*, a infestação peridomiciliar assumiu maior importância, e a persistência das infestações neste ambiente por *T. sordida* vem sendo encarada como desafio a ser enfrentado no controle de triatomíneos (Diotaiuti et al. 1995).

### **1.2.4. *Triatoma pseudomaculata***

Esta espécie é distribuída no semi-árido de todos os Estados do nordeste brasileiro e, devido ao seu comportamento predominantemente peridomiciliar, tem sido capturada em alta densidade em unidades domiciliares, geralmente associada a galináceos (Lent e Wygodzinsky 1979). Uma vez que

as aves são refratárias ao agente etiológico da doença de Chagas, *T. pseudomaculata* não havia sido considerada como espécie importante na epidemiologia da doença de Chagas, com base também nos resultados de Perlowagora-Szumlewicz e Moreira (1994), os quais demonstraram que esta espécie apresenta baixos índices de metaciclogênese. Entretanto, registros de captura intradomiciliar de triatomíneos no semi-árido nordestino demonstraram que esta espécie, juntamente com *T. brasiliensis* deveria ser considerada como prioridade para as campanhas de controle da doença de Chagas no nordeste brasileiro (Dias et al. 2000).

Souza et al. (1999) apresentaram algumas atribuições vetoriais, até então inesperadas, para esta espécie no Brasil: focos de infestação intradomiciliar de *T. pseudomaculata* foram observados em habitações rudimentares, conhecidas como “favelas”, localizadas em área periurbana da cidade de Sobral no Ceará. Esta área é adjacente a focos silvestres de *T. pseudomaculata* na Caatinga. As habitações humanas que foram invadidas por esta espécie foram caracterizadas como área peridomiciliar estreita, sendo os domicílios muitas vezes construídos sem nenhum espaço entre eles, o que pode facilitar ainda mais o transporte ativo de uma unidade domiciliar a outra.

Utilizando armadilhas luminosas Carbajal de la Fuente et al. (2007) demonstraram que mais de um exemplar de *T. pseudomaculata* possivelmente chegam diariamente até os domicílios atraídos por fontes de luz artificial na região da caatinga. Esta espécie apresenta-se morfologicamente similar a *T. maculata* (Erichson 1848), o que levou Schofield (1988) a postular que esta última havia sido originada no norte da América do Sul por transporte passivo de *T. pseudomaculata* por pássaros migratórios, o que não foi acatado por

Hypša et al. (2002) devido aos alto grau de diferenciação genética. Dos Santos et al. (2007) desenvolveram estudos isoenzimáticos, citogenéticos e morfométricos para esclarecer o significado das similaridades morfológicas observadas entre *T. pseudomaculata* e *T. maculata*, utilizado também duas outras espécies afins: *T. arthurneivai* Lent e Martins, 1940 e *T. wygodzinskyi* Lent 1951. As informações genéticas observadas confirmaram a adequada manutenção do *status* taxonômico específico para ambas e o alto grau de diferenciação genética mencionado por Hypša et al. (2002).

#### **1.2.5. *Panstrongylus megistus***

Trata-se de um dos mais importantes vetores de *T. cruzi* no Brasil, apresentando ampla distribuição geográfica, altos índices de infecção por *T. cruzi* e potencial para colonizar domicílios (c.f. Dujardin et al. 2000). Steindel et al. (1994) registraram colônias intradomiciliares em Florianópolis, Santa Catarina, apresentando 8,6% (25/31) de positividade para sangue humano, detectado através do teste de precipitina. Esta espécie está associada com habitats tropicais caracterizados por altos níveis de umidade, ocorrendo em todas as florestas brasileiras, com exceção da Amazônica (Forattini 1980). Barbosa et al. (1999) efetuaram comparações entre populações de *P. megistus* domiciliares da Bahia; domiciliares e silvestres de Minas Gerais; e predominantemente silvestres de Santa Catarina. As diferenças nos parâmetros biológicos, citogenéticos e morfológicos estudados foram insuficientes para permitir a caracterização destas populações. Contudo, análises de padrões da sensila antenal evidenciaram diferenças entre elas. Análises fenéticas e de padrões eletroforéticos da saliva também revelaram diferenciação populacional.



Uma vez que a distribuição desta espécie sobrepõe às áreas ocupadas por todas as florestas tropicais brasileiras, com exceção da amazônica (Foratini 1980), Aragão (1961) indicou que a aridez constitui um fator limitante na distribuição desse inseto. Entretanto, esta espécie foi capaz de apresentar infestações numerosas em zonas semi-áridas do nordeste brasileiro (Silveira e Rezende 1994). Dias et al. (2000) mencionaram que os focos intradomiciliares desta espécie no semi-árido puderam ser eliminados porque, possivelmente, as linhagens na área de infestação não eram autóctones.

No oeste do estado de Minas Gerais foram observadas algumas situações de persistência de focos domiciliares de *P. megistus* frente às medidas de controle. A intensificação da frequência do tratamento químico domiciliar e da pesquisa triatomínica foram capazes de reduzir as reinfestações. Assim, postula-se que invasões domiciliares a partir de focos domiciliares residuais em expansão tenham sido responsáveis pela persistência às medidas de controle (Villela et al. 2006).

#### **1.2.6. *Rhodnius prolixus***

Uma reconstrução, combinando estudos históricos e biogeográficos sugerem que *R. prolixus* foi o primeiro triatomíneo domiciliado da América do Sul, chegando posteriormente às áreas semelhantes à savana (llanos), tendo sido disperso por atividades humanas (Dujardin et al. 1998, Schofield e Dujardin 1999, Zeledón 2004).

Seqüências do DNA mitocondrial (gene do citocromo B), de populações de *R. prolixus* provenientes da Venezuela, Colômbia, Honduras, Guatemala e Brasil, foram estudadas por Monteiro et al. (2003), sugerindo a introdução recente de linhagens domiciliares de *R. prolixus* nestes países por ações

antrópicas. A distribuição geográfica desta espécie tem sido alvo de controvérsia porque a validade taxonômica dos exemplares analisados em estudos prévios vem sendo questionada, pois *R. prolixus* e *R. robustus* Larrousse, 1927, são morfologicamente indistinguíveis. Recentemente, Pavan e Monteiro (2007) apresentaram uma abordagem capaz de diferenciar estas duas espécies através de PCR *multiplex* (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando diferentes *primers* espécie-específicos para o gene do citocromo B.

Por se tratar de uma espécie facilmente mantida em condições de laboratório, *R. prolixus* tem sido amplamente explorada para estudos sobre a biologia, fisiologia e bioquímica de insetos (ex: Grillo et al. 2007). Uma iniciativa internacional foi implementada para o sequenciamento de seu genoma (GSC 2007). Este triatomíneo é considerado o principal vetor na Venezuela, onde ocorre em 590 (79,1%) dos municípios, uma área de 650.789 Km<sup>2</sup> (71,1%) do território nacional, e ameaça cerca de 14.000.000 (72%) habitantes. Neste país, o índice de infestação domiciliar por este vetor já alcançou 5,2 % em 2000 (Rodrigues-Bonfante et al. 2007).

### **1.3. Outras espécies que vem apresentando ameaças à saúde pública**

Após o controle de *T. infestans* no Brasil, outras espécies, até então, consideradas de importância secundária, passaram a invadir, ou mesmo a colonizar, ecótopos domiciliares, emergindo como prioridades para as campanhas de controle. Além de *P. megistus* e *T. pseudomaculata*, já tratadas anteriormente, *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *T. brasiliensis* também foram agrupadas entre as espécies que apresentam este tipo de sucessão (Silveira e Resende 1994, Costa 1999; Almeida et al. 2000; Costa et al. 2003a).

Dados levantados pela Funasa entre 1975 e 1997, indicaram um crescente processo de invasão peri e intradomiciliar de *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) no Rio Grande do Sul (RS), que após o controle de *T. infestans* passou a ser o triatomíneo mais capturado neste Estado. Atualmente, *T. rubrovaria* é tratado como prioridade no monitoramento vetorial neste estado. Estudos bionômicos, ecológicos e isoenzimáticos foram desenvolvidos com o intuito de se ampliar os conhecimentos de aspectos relacionados à potencialidade vetorial desta espécie. Os resultados obtidos através do teste de precipitina indicaram ecletismo alimentar para *T. rubrovaria* e o soro anti-roedor apresentou o mais alto índice de positividade na maioria das localidades. Entretanto, foi registrado 1,28% de positividade para sangue humano (Almeida et al. 2000, 2003a).

Os dados sobre o tempo decorrido entre o fim do repasto e a defecação mostraram que *T. rubrovaria* atingiu índices similares aos observados por outros autores para vetores de comprovada importância epidemiológica, como *T. infestans*. *Triatoma rubrovaria* também apresentou períodos de resistência ao jejum comparáveis a outros vetores de reconhecida importância epidemiológica, e realizou vários repastos sangüíneos durante o período ninfal, demonstrando assim, características biológicas que podem vir a influenciar positivamente na capacidade de resistir aos efeitos residuais de inseticidas e de infectar-se com *T. cruzi*, respectivamente (Almeida et al. 2003b, 2005).

*Triatoma rubrovaria* apresenta diferentes morfotipos. Através de análises isoenzimáticas foi possível evidenciar o isolamento reprodutivo para a população proveniente do município de Santiago (RS), o que pode indicar a existência de populações apresentando diferentes perfis de potencialidade

vetorial (Almeida et al. 2002). Através do sequenciamento das regiões espaçadoras ITS (*Internal Transcribed Spacer 1 e 2*) do gene 5,85 do rDNA e de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)-PCR, Pacheco et al. (2003, 2007) ampliaram os estudos sobre a estrutura genética para esta espécie. Seus resultados, além de corroborar a indicação sobre a variabilidade genética das populações de *T. rubrovaria* no RS, ainda indicaram que as populações provenientes da Argentina e Uruguai não mantêm, ou mantêm baixos níveis de fluxo gênico com as diferentes populações brasileiras.

Valente e Valente (1993) e Coura et al. (1999) efetuaram uma análise sobre a disseminação da doença de Chagas na Amazônia, chamando a atenção para os altos índices de infecção natural dos reservatórios e vetores silvestres, até mesmo no município de Belém, capital do Estado do Pará. Nesta região, as espécies vetoras são consideradas predominantemente silvestres, entretanto, ocasionalmente invadem o domicílio e peridomicílio e acabam se alimentando de sangue humano. Foram observados indícios de sinantropização em Muaná (Pará), onde cerca de 100 espécimes de *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), apresentando 25% de infecção natural, foram encontrados associados a porcos domésticos, em áreas peridomiciliares. Pelo menos 20 exemplares destes insetos foram capturados no intradomicílio e haviam deixado marcas de picada nos moradores. Além das possibilidades de disseminação da doença de Chagas já mencionadas, estes autores chamaram atenção para o hábito da população amazônica de ingestão de carne de animais silvestres, tais como a mucura (gambá) e também do tatu e diversos outros mamíferos sabidamente reservatórios de *T. cruzi*.

Coura et al. (1999) mencionaram que as migrações humanas e o desmatamento são fatores que podem favorecer o endemismo da doença de Chagas na região amazônica. Inquéritos sorológicos realizados por estes autores demonstraram um alto percentual de soropositividade para anticorpos anti *T. cruzi* em animais silvestres (marsupiais, quirópteros, roedores, edentados e primatas) da Amazônia brasileira. Foi também relatado que 20,7% das pessoas soropositivas (coletores de piaçava) reconheceram os triatomíneos como insetos presentes em seu ambiente de trabalho, entre estas, 30% informaram que haviam sido picadas por estes insetos. Além de relatar a presença de triatomíneos, os indivíduos soropositivos também mencionaram a ocorrência de picadas nas cabanas utilizadas como abrigo nestas áreas.

De acordo com Coura et al. (1994) e Galvão et al. (2003), 18 espécies de triatomíneos ocorrem na Amazônia brasileira: *Alberprosenia malheroi* Atzingen e Serra, 1987, *Belminus laportei* (Lent et al., 1995), *Cavernicola lenti* Barrett e Arias, 1985, *C. pilosa* Barber, 1937, *Eratyrus mucronatus* Stal, 1859, *Microtriatoma trinidadensis* (Lent, 1951), *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1911), *P. lignarius* (Walker, 1873), *P. megistus*, *P. rufotuberculatus* Champion, 1899, *Rhodnius amazonicus* Almeida, Santos e Sposina, 1973, *R. brethesi* Matta, 1919 *R. paraensis* Sherlock, Guitton e Miles, 1977, *R. pictipes* Stal, 1872, *R. prolixus*, *R. robustus*, *Triatoma maculata* e *T. rubrofasciata*. Dentre as espécies relacionadas, *R. brethesi* merece uma atenção especial devido à possibilidade de estar envolvido em um foco de transmissão silvestre da doença de Chagas em coletores de piaçava no Alto Rio Negro, Amazonas (Dias et al. 2002).

*Triatoma maculata* é considerado vetor secundário na Venezuela. Em 1992 este triatomíneo foi encontrado no peridomicílio e domicílio em 477 (64%) do total de municípios deste país, ocupando uma área de 613.084,2Km<sup>2</sup> (67%) do território nacional, com uma população de risco de 12.717.594 (72%) habitantes. Esta espécie já foi encontrada infectada por *T. cruzi* neste país, onde está amplamente distribuída no ambiente silvestre (Rodrigues-Bonfante et al. 2007).

Um levantamento da fauna de triatomíneos foi efetuado por Luitgards-Moura (2001) no Estado de Roraima. As espécies coletadas em ordem decrescente de frequência foram *T. maculata* (predominantemente em galinheiros), *R. pictipes*, *R. robustus* (ambos somente em palmeiras) e *Panstrongylus geniculatus* (no interior de casas). Numerosas colônias peridomiciliares de *T. maculata* foram detectadas em Roraima e estudos bionômicos sobre esta espécie foram desenvolvidos por Luitgards-Moura (2001). Seus resultados demonstraram que *T. maculata* possui características que podem favorecer a infecção e transmissão de *T. cruzi*. Duas técnicas sorológicas detectaram positividade em somente 0,66% de 1.821 moradores investigados. Deste total, nove casos positivos foram detectados para pessoas também naturais de Roraima. Contudo, Luitgards-Moura (2001) não considerou a doença de Chagas como uma endemia local, mas mencionou a presença de elos da cadeia epidemiológica que podem vir a permitir a instalação do ciclo de transmissão na ausência de vigilância.

#### **1.4.A epidemiologia da doença de Chagas e o processo de domiciliação dos triatomíneos**

Pessoa (1962) abordou a íntima associação entre a domiciliação de triatomíneos e a epidemiologia da doença de Chagas, onde a transmissão vetorial é favorecida pela coabitação entre o vetor e o homem. Silveira e Rezende (1994) classificaram os triatomíneos de acordo com seu *status* de domiciliação e sinantropia, relacionando-os com o potencial vetorial. Forattini (1980) levantou uma série de discussões sobre a origem do fenômeno da domiciliação. As opiniões divergem desde um simples oportunismo frente à escassez das fontes naturais de alimento até um possível processo gradual de adaptação, sujeito à seleção natural.

Baseado em informações biogeográficas, Forattini (1980) mencionou que o processo de domiciliação de *T. infestans* já havia sido consolidado no período pré-colombiano. Schofield (1988) apresentou outras evidências de que a aproximação de *T. infestans* com o homem tenha favorecido sua dispersão para outras áreas já colonizadas, seguindo as migrações tribais pré-incaicas da Bolívia ao sul do Peru e norte do Chile. Segundo este autor, no início de 1900, possivelmente *T. infestans* seguiu o circuito de importação e exportação do café, passando pelo Paraguai e Argentina até chegar a São Paulo.

Posteriormente, *T. infestans* seguiu duas rotas independentes de ocupação e desmatamento de florestas litorâneas, colonizando o sul e nordeste brasileiros. Sua ocupação nestas regiões causou o maior número de casos de infecção pela doença de Chagas já registrado na história desta moléstia no Brasil (Silveira e Vinhaes 1999, Dias et al. 2000, 2002).

Segundo Silveira e Rezende (1994), *T. rubrovaria* e *R. neglectus*, ambas encontradas naturalmente infectadas, agrupam-se entre as espécies que vêm ocupando nichos deixados vagos pela eliminação de *T. infestans*,

respectivamente, no Rio Grande do Sul (RS) e em algumas áreas do Estado de Goiás e Tocantins. *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 foi classificada como espécie que apresenta risco de transmissão de *T. cruzi* devido à constatação da existência de colônias intradomiciliares nos Estados do Ceará (Silveira e Rezende 1994), tendo este achado sido recentemente reafirmado por Sarquis et al. (2006) em peridomicílios, e particularmente, do Rio Grande do Norte. Estes mesmos autores classificaram *T. infestans* e *T. rubrofasciata* como espécies “introduzidas” e estritamente domiciliadas no Brasil. Estas espécies não possuem focos naturais no Brasil, o que fez com que esses autores classificassem-nas como espécies que apresentam maior facilidade para a eliminação.

Assim, como observado para *T. infestans*, *T. rubrofasciata* teve sua dispersão favorecida pela interação entre o evento da domiciliação e atividades humanas. Esta espécie foi considerada de distribuição pantropical, sendo postulado que populações provenientes do Velho Mundo alcançaram o Novo Mundo durante o período entre os séculos XVII e XX através de embarcações (Schofield 1988, Gorla et al. 1997, Patterson et al. 2001, Hypsa et al. 2002). Entretanto, hábito de alimentar-se principalmente em roedores minimizam seu potencial de transmissão da doença de Chagas (Brazil 1986).

Na biologia evolutiva, o termo adaptação descreve o processo pelo qual uma característica, devido ao aumento que confere no valor adaptativo, foi moldada por forças específicas de seleção natural fixando a variação genética (Futuyma 1995). Segundo Bock (1959), características pré-adaptativas são aquelas que não evoluíram em antecipação a uma futura, mas que atuam positivamente para a consolidação de um novo caráter. Para triatomíneos,



Aragão (1983) cita o ecletismo alimentar como uma das características pré-adaptativos ao ecótopo domiciliar.

Em 1980, Forattini já havia elaborado hipóteses para explicar o processo de domiciliação dos triatomíneos, mencionando que:

... a partir do desenvolvimento da domiciliação e do progredir das alterações do meio, instala-se o isolamento domiciliar que tenderá cada vez mais, à diferenciação desse comportamento. Compreende-se assim a possibilidade de evolução no sentido de populações acentuada ou mesmo estritamente sinantrópicas ...

Alguns autores (Forattini 1980, Aragão 1983, Silveira e Vinhaes 1999, Dias et al. 2000) mencionam que a adaptação ao ambiente antrópico pode ter facilitado a dispersão de dois dos mais importantes vetores da doença de Chagas da América Latina: *T. infestans* e *P. megistus*. Aragão (1983) mencionou que tal evento aconteceu porque o ecótopo domiciliar minimiza as diferenças ambientais, sendo relativamente uniforme mesmo em diferentes condições climáticas.

Segundo revisão realizada por Schofield et al. (1999), o processo de domiciliação em triatomíneos pode ser encarado como uma extensão da rota evolutiva de predador para sugador em ninhos-abrigo, onde o habitat domiciliar representa simplesmente um novo tipo de abrigo de vertebrado. Segundo estes mesmos autores, existem indicações de que o fenômeno da domiciliação trate-se de uma especialização. Em conclusão, Schofield et al. (1999) mencionaram que, embora tenham sido desenvolvidas razoáveis explicações para o

processo de domiciliação, as pesquisas ainda estão distantes da elucidação dos mecanismos que dirimem este evento, indicando que talvez, estejamos diante de um dos maiores desafios nos estudos de triatomíneos para as próximas décadas.

### **1.5. *Triatoma brasiliensis***

Como *T. brasiliensis* é o organismo utilizado nesta tese, uma breve revisão sobre diferentes aspectos já estudados para esta espécie é apresentada.

#### **1.5.1. Morfologia de *Triatoma brasiliensis***

Com os avanços na tecnologia de Microscopia Eletrônica de Varredura, estudos detalhando estruturas anatômicas de *T. brasiliensis* ofereceram grande progresso no conhecimento de sua morfologia até o final da década de 90 e uma ampla variedade de informações sobre as estruturas anatômicas desta espécie foi apresentada. Os trabalhos que seguem exemplificam estes estudos.

Barth e Muth (1958) e Barth (1962) desenvolveram um estudo anátomo-histológico do exocório dos ovos e ilustraram comparativamente as mandíbulas de oito espécies de triatomíneos, incluindo *T. brasiliensis*. Lucena e Rego (1969) ofereceram mais detalhes dos ovos, caracterizando as microestruturas do seu exocório.

Em seguida, Lent e Jurberg (1978) selecionaram as seis espécies do gênero *Triatoma* mais encontradas no intradomicílio (dentre as quais *T. brasiliensis*), para a caracterização das estruturas externas da genitália. Jurberg et al. (1986) forneceram mais informações sobre a estrutura dos ovos e

sobre a morfologia das ninfas de *T. brasiliensis* com o uso de microscopia ótica e de varredura.

Rosa et al. (1992a,b) caracterizaram estruturas anatômicas relacionadas ao dimorfismo sexual das ninfas de 5º estágio, apresentando também detalhes dos espiráculos de *T. brasiliensis* através da microscopia eletrônica de varredura. Rosa et al. (1995) ilustraram as cerdas abdominais de *T. brasiliensis* e outras cinco espécies no 5º estágio, ressaltando caracteres morfológicos para distinção das espécies.

Costa et al. (1997a) desenvolveram análises comparativas das estruturas genitais externas, do exocório dos ovos e análises morfométricas de quatro diferentes morfotipos de *T. brasiliensis*. Os resultados obtidos através das análises das genitálias apontaram variações intrapopulacionais, dentro de um mesmo morfotipo e ausência de caracteres diferenciais entre os quatro padrões cromáticos. Entretanto, as análises do exocório e opérculo dos ovos através da microscopia eletrônica de varredura evidenciaram padrões morfológicos distintos. A morfometria também apresentou resultados estatisticamente significativos para a diferenciação entre estas populações.

### **1.5.2. Aspectos da biologia de *Triatoma brasiliensis***

A biologia desta espécie também tem sido amplamente explorada desde a década de 1970 e os trabalhos relacionados a seguir sumarizam estes estudos.

Brasileiro (1982) observou as relações entre o sangue ingerido no 5º estágio e a muda imaginal; Costa e Perondini (1973) registraram o período de resistência ao jejum para ninfas e adultos, bem como acompanharam a perda de peso corporal durante este período. Brasileiro e Perondini (1974)

observaram o tempo de sucção e a repleção de ninfas de 4º e 5º estádios, ilustrando graficamente que a quantidade de sangue ingerida aumenta progressivamente até os 30 minutos de sucção e a partir daí tende a uma estabilização até o término da sucção. Nestas duas fases de desenvolvimento a quantidade média de sangue ingerido é de 140 mg para o 4º estágio e de 270 mg para o 5º estágio, tendo sido demonstrado que *T. brasiliensis* suga, em média, de 3,5 a 4,6 vezes seu próprio peso, respectivamente. Perondini et al. (1975) estudaram a capacidade de oviposição das fêmeas de *T. brasiliensis* antes de qualquer repasto após a muda imaginal (autogenia), demonstrando que fêmeas virgens e fecundadas são capazes de realizar posturas antes da alimentação. Perlowagora-Szumlewicz (1975) estudou vários parâmetros biológicos de *T. brasiliensis* comparativamente com outras espécies de triatomíneos, tais como período de desenvolvimento, taxa de eclosão dos ovos, curva de sobrevivência das fêmeas, número de ovos depositados por fêmea e período de oviposição, entre outros aspectos, sendo ainda hoje um dos estudos biológicos mais abrangentes e detalhados, tanto em número de espécies como em número de parâmetros abordados.

Perlowagora-Szumlewicz (1975) já havia atentado para a perda do potencial biótico de insetos mantidos em colônias, observando parâmetros como a redução da expectativa de vida das fêmeas criadas em laboratório por longos períodos, que foi significativamente distinto de espécimes recém-chegados do campo. As fêmeas de *T. brasiliensis* viveram, em média, 325 dias na primeira geração nascida em laboratório. Fêmeas provenientes de colônias mantidas por quatro anos apresentaram o mesmo ciclo com somente 230 dias (tempo de vida médio), tendo sido observado o mesmo fenômeno para as

outras três espécies analisadas. Brasileiro (1982 e 1984) estudou a fecundidade e a fertilidade das fêmeas. Nestes estudos foi comparada a fertilidade de fêmeas virgens e de fêmeas acasaladas (uma ou várias vezes), mostrando que o acasalamento estimula a oviposição e reduz a longevidade. Posteriormente, este autor observou que a fertilidade (número de ovos depositados) e a taxa de eclosão não eram influenciadas pelo número de cópulas. Silva (1990) observou os períodos de incubação, pré-postura e desenvolvimento de *T. brasiliensis* a 25° e 30° C, observando uma destacada relação inversamente proporcional entre os dois parâmetros (às mais altas temperaturas, menores foram os períodos). Pinto et al. (1992) estudaram a influência da temperatura da fonte alimentar (26° e 30° C) no comportamento de seis espécies de triatomíneos (incluindo *T. brasiliensis*) e observaram que 80% do total de triatomíneos estudados desenvolveram-se melhor em temperaturas de 30° C. Marcondes e Nascimento (1992) demonstraram a influência das condições luminosas na mortalidade das fêmeas e na postura, indicando que para a manutenção de colônias em laboratório, *T. brasiliensis* torna-se mais prolífico quando o tempo de exposição a luz simula ao observado no ambiente natural.

Costa e Marchon-Silva (1998) apresentaram os primeiros estudos biológicos comparativos entre diferentes populações de *T. brasiliensis*, com o intuito de esclarecer o significado biológico das variações cromáticas observadas. Além de apresentar mais informações sobre o período intermuda e resistência ao jejum, estes autores demonstraram diferenças significantes entre as populações estudadas.

Soares et al. (2000) estudaram os seguintes parâmetros comparativos entre *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*: período de incubação dos ovos, intervalo entre a eclosão ou mudas e o primeiro repasto, número de repastos, tempo de desenvolvimento, mortalidade, tempo para iniciar a alimentação, duração da alimentação, capacidade de ingestão de sangue, ocorrência de defecação após o repasto e velocidade do repasto. Ambas as espécies apresentaram características favoráveis à transmissão de *T. cruzi*. Contudo, dados obtidos em laboratório sugeriram uma geração anual para *T. pseudomaculata* e duas para *T. brasiliensis*, o que implicaria em maior potencial para infestação domiciliar para esta última.

Estudos mais recentes indicaram que, em condições de laboratório a 24°C, *T. brasiliensis* leva em média 160 dias para alcançar a maturidade sexual. Foi observado que, em média, as fêmeas alimentadas em aves depositam 1,2 ovos por dia, apresentando uma média de 140 ovos viáveis durante o todo o período reprodutivo (Guarneri et al. 2000, Soares et al. 2000).

### **1.5.3. Interação parasita-vetor em *Triatoma brasiliensis***

Perlowagora-Szumlewicz et al. (1988) desenvolveram estudos com nove espécies de triatomíneos para avaliar um bom modelo experimental na aplicação do teste de xenodiagnóstico. Os melhores resultados foram obtidos para *R. neglectus* e *T. rubrovaria* enquanto os resultados para *T. infestans* e *T. dimidiata* apontaram baixas taxas de positividade. *Triatoma brasiliensis* apresentou uma situação intermediária, assim como *R. prolixus*. Aspectos da interação parasita-vetor também foram avaliados por Garcia et al. (1984) que discutiram diversos processos morfogenéticos de *T. cruzi* que ocorrem no trato digestivo do triatomíneo, utilizando quatro espécies como modelo, inclusive *T.*

*brasiliensis*. Perlowagora-Szumlewicz e Moreira (1994) estudaram a influência de alguns vetores na metaciclogênese *in vivo*. Neste estudo, nove espécies de triatomíneos foram comparadas. *R. neglectus* e *R. prolixus* obtiveram taxas altas de metaciclogênese de 50% e 37%, respectivamente. *T. brasiliensis* apresentou uma taxa de metaciclogênese de 3%.

Peptídeos (lisosinas e defensinas) envolvidos na resposta imunológica do trato digestivo de *T. brasiliensis* tiveram seu DNA codificante seqüenciado (Araújo et al. 2006). Outros fragmentos de DNA codificante das glândulas salivares de *T. brasiliensis* foram seqüenciados para acrescentar informações sobre biomoléculas com funções diversas (ex: anticoagulante) de triatomíneos. Assim, peptídeos candidatos a alérgenos foram apontados. Foram identificados outros oito peptídeos salivares e, entre eles, um obteve alta homologia para o vasodilator de tabanídeos. Foi também sugerido que análises dos componentes salivares possam vir a auxiliar na elucidação de mecanismos de co-evolução entre os triatomíneos e seus hospedeiros vertebrados (SantAnna et al. 2002, Santos et al. 2007).

#### **1.5.4. Estudos ecológicos de *Triatoma brasiliensis***

Segundo Lent e Wygodzinsky (1979), no ambiente silvestre, *T. brasiliensis* é encontrada em pedregais. Durante o dia esta espécie permanece geralmente sob amontoados de rochas, chamados pela população local de “serrotes”. Neste ambiente, os vertebrados homeotérmicos silvestres mais frequentemente encontrados são roedores, especialmente mocós (*Kerodon rupestris*), preás (*Cavia aperea*) e punarés (*Thrichomys apereoides*).

As características microclimáticas dos refúgios naturais de *T. brasiliensis* foram observadas em ecótopos silvestres, domiciliares e peridomiciliares no

Estado de Ceará, Brasil. Foi evidenciado que para esta espécie os parâmetros ambientais representam fatores determinantes na escolha do microambiente, podendo o inseto estar limitado a ambientes quentes e secos, com pouca amplitude térmica. Assim, as fendas nas paredes no interior de casas no semi-árido nordestino representam um ambiente adequado às preferências de *T. brasiliensis*, devido à similaridade com os parâmetros climáticos dos refúgios nos pedregais silvestres (Lorenzo et al. 2000).

Costa et al. (1998) desenvolveram estudos ecológicos sobre diferentes populações de *T. brasiliensis*, demonstrando diferenças marcantes quanto ao encontro destas populações nos diferentes ecótopos. A “população” melânica, por exemplo, foi predominante no ambiente silvestre, ao passo que outras foram freqüentemente encontradas no peri e intradomicílio.

Informações sobre o alcance de vôo de *T. brasiliensis* são importantes para um estudo de genética de populações e suscitam estudos mais detalhados (c.f. Avise 2000). Carbajal de La Fuente et al. (2007) estimaram que mais de três exemplares de *T. brasiliensis* podem chegar a domicílios a cada semana atraídos por luzes artificiais.

Sinais de comportamento gregário, utilizando as fezes como sinais específicos foram apontados por Vitta et al. (2007), demonstrando que ninfas de *T. brasiliensis* parecem preferir se agregar próximas às fezes da própria espécie do que de fezes de *T. pseudomaculata*.

#### **1.5.5. Estudos taxonômicos de *Triatoma brasiliensis***

*Triatoma brasiliensis* foi descrito por Neiva em 1911. Posteriormente, Neiva e Lent (1941) descreveram um novo padrão cromático de *T. brasiliensis* no Estado de Minas Gerais proveniente do município de Espinosa, atribuindo



*status* sub-específico a este táxon: *T. bras. melanica*. Em seguida, Galvão (1956) descreveu mais um morfotipo como nova subespécie, *T. bras. macromelasoma*, com base em exemplares coletados em Juazeiro e Petrolina, nos estados da Bahia e Pernambuco, respectivamente. Entretanto, Lent e Wygodzinsky (1979), sinonimizaram as subespécies, alegando que formas intermediárias entre os diferentes padrões podiam ser encontrados, passando a tratá-las como *T. brasiliensis*.

Costa et al. (1997a, 1997b) e Costa e Marchon-Silva (1998) efetuaram estudos morfológicos, biológicos, ecológicos e moleculares sobre diferentes populações de *T. brasiliensis* coletadas em Caicó (RN), Espinosa (MG), Petrolina (PE) e Juazeiro (BA), denominadas populações ‘brasiliensis’, ‘melânica’, ‘macromelasoma’ e ‘juazeiro’, respectivamente. Seus resultados mostraram que *T. brasiliensis* se apresentou como uma espécie politípica, constituída por diferentes populações alopátricas com potenciais epidemiológicos distintos. Nas coletas realizadas, as populações brasiliensis, macromelasoma e juazeiro foram observadas tanto em ambientes naturais quanto em artificiais, enquanto a população melânica foi registrada quase exclusivamente para ecótopos silvestres. Quanto aos percentuais de infecção natural por *T. cruzi*, 15% dos espécimes da população brasiliensis e 6,6% dos de melânica foram encontrados infectados. Não foi detectada infecção natural nos espécimes das populações macromelasoma e juazeiro. Os autores indicam a população brasiliensis como a mais importante em termos epidemiológicos, por aliar a mais ampla distribuição geográfica com as altas taxas de infecção natural.

Resultados obtidos através de modelagem ecológica (Costa et al. 2002) reforçaram a sugestão de que *T. brasiliensis* trata-se de um complexo de espécies. Através de cruzamentos experimentais foi evidenciada a incompatibilidade reprodutiva para F3 entre as populações brasiliensis e melanica (Costa et al. 2003b), que também apresentaram a maior distância genética através dos estudos isoenzimáticos (Costa et al. 1997b). Finalmente, a variação de um fragmento do DNA mitocondrial (Cytb) através da abordagem de NCPA (*Nested Clade Phylogeographic Analises*) demonstrou que as populações acima mencionadas foram um resultado de expansão populacional (da população 'brasiliensis') seguida por fragmentação ocorrida no passado e que a diferenciação ocorreu através do isolamento por distância geográfica (Monteiro et al. 2004).

Com base na análise multidisciplinar (Costa 1997, Costa et al. 1997a, 1997b, 1998, 2002, 2003b e Monteiro et al. 2004) e na consistência destes padrões cromáticos concluiu-se que os diferentes morfotipos representam, na verdade, duas espécies e duas subespécies, constituindo um complexo de espécies.

Assim, Costa et al. (2007) sugerem que as duas subespécies: *T. bras. brasiliensis* e *T. bras. macromelasoma*, sejam reconsideradas. O padrão cromático referente à subespécie *T. bras. melanica* foi elevada à categoria de espécie (Costa et al. 2006). Um novo padrão cromático detectado nos estudos acima mencionados apresentou diferenciações suficientes para que uma nova espécie pudesse ser descrita (Costa e Felix 2007). Um breve resumo dos achados obtidos através dos estudos acima mencionados é então, apresentado.

### **1.5.6. Breve resumo do “complexo brasiliensis”, baseado em Costa et al. (2007)**

#### **1.5.6.1. *Triatoma brasiliensis brasiliensis* Neiva, 1911**

Esta subespécie (Figura 1) tem distribuição geográfica confirmada para os estados de Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba. Nos estados de Alagoas, Sergipe, Tocantins e Goiás estudos mais detalhados precisam ser realizados para a confirmação da ocorrência desta subespécie. O comprimento total dos machos oscilou entre 21 e 23 mm e da fêmea entre 22 e 25 mm, nos exemplares analisados por Costa et al. (2007).

Nesta subespécie, a coloração é geral amarelo-acastanhada, colarinho amarelado no centro; pronoto com faixas longitudinais amarelas, alargando-se para fora das carenas medianas, desde a margem posterior do lobo posterior até o lobo anterior, onde se estreitam; membrana do hemiélitro clara, com leve tonalidade escura nas células internas; trocânteres predominantemente amarelos, fêmures com anel mediano largo; machos com fosseta esponjosa nas tíbias anteriores e medianas, ausente nas fêmeas.

Esta subespécie pode ser encontrada em ecótopos variados; no ambiente silvestre (pedregais), no peridomicílio (galinheiros, currais, cercas de madeira, muros de pedra, etc.). Em alguns casos pode proporcionar altas infestações intradomiciliares.



**Figura 1. *Triatoma brasiliensis brasiliensis* Neiva, 1911**

**1.5.6.2. *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956**

Com distribuição geográfica somente para o estado de Pernambuco, esta subespécie (Figura 2) apresenta coloração geral negro-amarelada, colarinho negro; pronoto com faixas amareladas não triangulares, estendendo-se da porção posterior do lobo anterior até a porção posterior do lobo posterior, mas não atingindo sua margem, ou com uma linha clara sobre as carenas medianas; membrana do hemiélitro com células internas parcialmente enegrecidas. Os machos dessa subespécie apresentam fosseta esponjosa nas tíbias anteriores e medianas. Machos e fêmeas medem, em média, 21 a 22 mm, respectivamente.

É uma subespécie predominante no peridomicílio, mas pode também infestar o interior dos domicílios, formando numerosas colônias.



**Figura 2. *Triatoma brasiliensis macromelasoma***  
Galvão, 1956

**1.5.6.3. *Triatoma melanica* Neiva e Lent, 1941**

Apresenta distribuição geográfica registrada para os municípios de Espinosa e Porteirinha (ao norte do Estado de Minas Gerais) e Urandi (ao sul do Estado da Bahia, respectivamente).

A coloração geral (Figura 3) apresenta-se enegrecida com relação aos outros membros do complexo, com áreas amarelado-alaranjadas, colarinho negro; pronoto com faixas triangulares partindo da margem posterior do lobo posterior, mas não atingindo o lobo anterior; membrana do hemiélitro com células internas totalmente negras; trocânteres escuros, fêmures com manchas claras não formando anel nítido; fosseta esponjosa ausente nas fêmeas, estando presente apenas nas tíbias anteriores dos machos.

Trata-se do único membro do complexo com hábitos exclusivamente silvestres (pedregais) e podendo, eventualmente, invadir os domicílios, principalmente durante os períodos mais secos. Ainda não foi encontrada colonizando os domicílios.



**Figura 3. *Triatoma melanica* Neiva e Lent, 1941**



**1.5.6.4. *Triatoma juazeirensis* (Costa e Felix, 2007)**

Esta espécie (Figura 4) ocorre no semi-árido ao norte do estado da Bahia, e sua cor geral é negra com partes amareladas a acastanhadas; pronoto, em geral, inteiramente negro, podendo apresentar um par de pequenos pontos castanhos na parte anterior da carena submediana; membrana do hemiélitro com células internas parcialmente enegrecidas; fêmures inteiramente negros; machos com fosseta esponjosa nas tíbias anteriores e medianas, ausente nas fêmeas. Esta espécie é facilmente encontrada no ambiente silvestre (pedregais) e no peridomicílio, podendo também infestar o intradomicílio.



**Figura 4. *Triatoma juazeirensis* (Costa e Felix, 2007)**

### **1.5.7. Aspectos operacionais no controle de *Triatoma brasiliensis***

Lucena (1960) observou a densidade relativa de diferentes fases de desenvolvimento das quatro principais espécies de triatomíneos domiciliados em Pernambuco: *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. maculata* e *T. rubrofasciata*. Este autor enfatizou que, para *T. brasiliensis*, as formas jovens foram predominantes durante sete meses do ano, de dezembro a julho. A partir de agosto, até novembro o percentual de adultos torna-se superior, indicando que esta espécie apresenta um único ciclo anual em campo. Dias et al. (2000) mencionaram que *T. brasiliensis* foi, provavelmente, o principal responsável pelo índice de 0,8% de soropositividade para a doença de Chagas em indivíduos com menos de dez anos, uma vez que o inquérito havia sido efetuado de 1997 a 1998, período posterior ao controle de *T. infestans* no nordeste do Brasil (cuja eficácia foi observada já no final da década de 80).

Diotaiuti et al. (2000) demonstraram que em torno de quatro meses após o tratamento químico domiciliar, 9,7% das unidades domiciliares permaneciam positivas para captura de *T. brasiliensis* no estado do Ceará. A estrutura etária de *T. brasiliensis* nas avaliações realizadas após a borrifação indicou a ocorrência de um único ciclo anual, com predominância dos adultos nos meses de junho e julho. Os números para capturas nas unidades domiciliares um ano após a borrifação foram estatisticamente superiores aos obtidos antes da borrifação. Desta forma, Diotaiuti et al. (2000) desenvolveram experimentos de suscetibilidade ao piretróide (deltametrina) usado no controle de *T. brasiliensis* com a progênie da população intradomiciliar, proveniente do município de

Crateús-CE. Seus resultados não indicaram a existência de uma linhagem resistente ao inseticida utilizado.

Posteriormente, Costa et al. (2003a) examinaram dados de captura de triatomíneos em 12 estados brasileiros de 1993 a 1999, coletados pela Funasa, com especial atenção a *T. brasiliensis sensu lato*. As principais variáveis analisadas foram o índice de captura e o índice de infecção natural por *T. cruzi*. Os dados compreenderam um total de 1.591.280 triatomíneos de 21 espécies, capturados em domicílios dentro da área de distribuição geográfica de *T. brasiliensis*. Deste total, 422.965 (26.6%) foi composto por *T. brasiliensis*. O percentual de exemplares desta espécie infectados por *T. cruzi* foi superior a 3% nos estados de Alagoas, Minas Gerais e Rio Grande do Norte.

Desde o ano de 2000, Sarquis et al. (2004), Souza et al. (2004), Pacheco et al. (2005) e Sarquis et al. (2006) vêm desenvolvendo um estudo detalhado em uma pequena cidade do estado do Ceará (Jaguarana), abrangendo pesquisas triatomínicas e caracterização molecular de vetores e *T. cruzi*. Cento e cinquenta e oito domicílios foram analisados de novembro de 2000 a abril de 2002. *Triatoma brasiliensis* foi o triatomíneo mais capturado nas unidades domiciliares, representando um percentual de 74-93% do total (3.082 exemplares). Deste total, 15% dos exemplares apresentaram infecção natural por *T. cruzi* (Sarquis et al. 2004). Pacheco et al. (2005) realizou a tipagem (através de RAPD e isoenzimas) das amostras de *T. cruzi* e detectou heterogeneidade genética, com incidência da cepa considerada predominante no ambiente silvestre (zimodema 1).

### 1.6. A capacidade de dispersão ativa dos triatomíneos

Para a compreensão de eventos em genética populacional, deve-se levar em conta o tamanho populacional e a capacidade de dispersão do táxon estudado. Sob o ponto de vista eco-genético (aplicado ao grupo dos triatomíneos), o conhecimento dos fatores que induzem o vôo também é importante para se efetuar inferências sobre o processo de invasão domiciliar destes vetores.

Vários estudos indicaram que os triatomíneos podem ser passivamente dispersos pelo homem, ou por aves (c.f. Schofield et al. 1999). Para *T. brasiliensis*, no entanto, não foram apresentados relatos de transporte passivo. Desta forma, para inferências sobre a dispersão será levada em conta principalmente a capacidade de vôo, por se tratar de um processo natural de dispersão. Como também não existem estudos sobre o alcance de seu vôo, as inferências sobre este aspecto serão baseadas em estudos desenvolvidos para *T. infestans*, *T. sordida* e *P. megistus*. Ressalta-se que a espécie que apresenta um maior número de trabalhos sobre este aspecto (*T. infestans*) é filogeneticamente relacionado à *T. brasiliensis* (Hypsa et al. 2002).

Schweigmann et al. (1988) mencionaram que *T. infestans* pode voar por um raio de cerca de 1,5 a 2 km (Schweigmann et al. 1988), de seu recurso original. Além do limitado alcance de vôo para triatomíneos, estudos para *T. sordida* e *P. megistus* demonstraram que o vôo é estimulado pelo baixo status nutricional e pela temperatura. Entretanto, mesmo em condições “favoráveis” para o vôo, uma limitada parcela da população inicia o vôo (Soares e Santoro 2000). Estes últimos autores evidenciaram uma associação significativa da atividade da enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase com a parcela da

população que voa. Gurevitz et al. (2006, 2007) indicaram que, para *T. infestans*, a parcela da população que voa não foi significativamente estimulada por baixos status nutricionais, mas sim pelo desenvolvimento de músculos alares, cujos fatores determinantes não são ainda bem conhecidos. Estes autores ainda sugerem que o conceito clássico de que triatomíneos voam principalmente devido ao baixo *status* nutricional pode ter sido gerado por experimentos utilizando colônias mantidas por muitas gerações em laboratório para outras espécies.

Desta forma, tanto o limitado alcance de vôo, quanto a limitada parcela da população que voa são fatores que podem atuar positivamente na deriva genética, sendo importantes para o entendimento da estrutura genética de triatomíneos e são dependentes do tamanho populacional.

### **1.7. Marcadores moleculares em insetos**

A variação genética é uma condição fundamental para que haja evolução. Chetverikov (1926, 1927) foi um dos primeiros a demonstrar a análise genética de populações naturais, utilizando insetos como modelo (*Drosophila* spp.). Insetos representam o táxon mais diversificado do planeta, apresentando capacidade de adaptação a habitats em uma magnitude que nenhum outro grupo animal alcançou. Habitam quase todos os ecossistemas, inclusive alguns ecossistemas marinhos, como é o caso das larvas dos quironomídeos do gênero *Pontomyia*, que estão distribuídos pelo oeste do pacífico (Cheng 1976). Tal diversidade fez com que alguns insetos se aproximassem do homem através de uma delicada associação, que muitas vezes não foi benéfica para o homem, como é o caso dos vetores da doença de Chagas.

Antes da facilidade no acesso às ferramentas moleculares, questões taxonômicas eram muitas vezes respondidas através de estudos biológicos em laboratório. Espínola (1971), por exemplo, demonstrou a incompatibilidade genética entre *T. brasiliensis* e *T. petrochiae* Pinto e Barreto 1925, realizando cruzamentos entre elas. Os resultados obtidos mostraram que os dois *taxa* estudados se tratavam de espécies distintas.

Progressos significantes têm sido obtidos no entendimento da diversidade genética e ecologia dos insetos com a utilização de princípios clássicos, através de marcadores genéticos (fenotípicos) visualizáveis (ex: coloração, cerdas, genitália). Muito embora marcadores morfológicos apresentem baixo custo e aplicabilidade quase imediata, eles sofrem algumas limitações na prática. Marcadores fenotípicos não são relativamente freqüentes, podem ser influenciados pelo meio ambiente e são de mais difícil conversão para algoritmos matemáticos. Para aplicabilidade e credibilidade, especialmente em estudos de genética populacional, mas também em filogenética, um bom marcador morfológico deve apresentar a informação de como se dá a herança (Behura 2006).

A citogenética oscila entre uma ferramenta morfológica e molecular, pois enovelados de moléculas de DNA (cromossomos) são marcados e avaliados quanto à forma, número, composição química, peso molecular e padrão de hereditariedade. Esta técnica avançou consideravelmente com os progressos na microscopia ótica e eletrônica, tratando-se de uma abordagem importante e muito informativa para entendimento da variação genética em insetos. Em triatomíneos, estudos sobre o número e forma dos cromossomos, de regiões específicas (ex: heterocromatina C) e quantificação do DNA total têm

demonstrado importante aplicabilidade especialmente em estudos taxonômicos, mas também em um contexto filogenético e de genética de populações, embora menos amplo (Panzera et al. 2004, 2006 e 2007).

Com os primeiros avanços das técnicas moleculares, marcadores protéicos foram difundidos e trouxeram avanços significantes para a entomologia. Em 1966, Harris observou que 30% dos *loci* de cinco populações de *Drosophila pseudoobscura* Frolova e Astaurov, 1929 eram polimórficos. Em 1969, Shaw fez uma sinopse destas interpretações protéicas, num âmbito genotípico. Avise (1975) refinou estes achados, apresentando mais evidências de que os padrões de bandas eletroforéticos de aloenzimas (ou isoenzimas) em gel ou poliacrilamida poderiam ser convertidos para informação genética, identificando alelos de um determinado gene. O uso de marcadores protéicos na entomologia médica tem demonstrado destacada aplicabilidade na identificação de populações de insetos resistentes aos inseticidas (ex: Maa e Terriere 1983), na caracterização de patógenos (ex: Pacheco et al. 2005) e em estudos de genética populacional (ex: Costa et al. 1997, Almeida et al. 2002b).

Com o desenvolvimento de marcadores baseados em DNA, um nível maior de polimorfismo pôde ser encontrado do que em marcadores protéicos. Tal fato se dá por uma série de motivos, por ex: mutações, especialmente em introns, mas também em éxons podem prover mais informações em nível de DNA que o seu produto (a proteína) e mutações silenciosas também podem ser detectadas. Somado ao fato de que as amostras de DNA são menos susceptíveis a degradação do que proteínas, marcadores de DNA tornaram-se as ferramentas mais indicadas para mensurar diferenças genéticas entre populações e espécies. As técnicas baseadas na avaliação das bandas de



amplificação de fragmentos de DNA são conhecidas por marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ou *PCR-based*. As técnicas que envolvem seqüenciamento de DNA são conhecidas como marcadores baseados em seqüenciamento, ou *sequencing-based* (c.f. Avise 1994, 2000, 2004; Heckel 2003).

### **1.8. Marcadores baseados em PCR**

A técnica de PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphisms*) foi desenvolvida por Grimont e Grimont (1986) e foi o primeiro marcador molecular usado em estudos de *linkage*. A técnica de amplificação randômica de polimorfismos em DNA (RAPD - *Randon Amplified Polimorfic DNA*) foi inicialmente desenvolvida por Willian et al. (1990) e ganhou popularidade devido às facilidades no desenvolvimento laboratorial e na conversão da informação genética para algoritmos matemáticos. Entretanto, críticas quanto sua reprodutibilidade fizeram decair sua popularidade a partir de meados da década de 90. A abordagem de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), desenvolvida por Vos (1995), vem crescendo em popularidade, sendo considerada uma das alternativas mais indicadas por geneticistas para estudos populacionais (Schlotterer 2004).

O processo para obtenção de resultados através da técnica de AFLP consiste no “corte” do DNA genômico através de duas enzimas de restrição e os adaptadores são imediatamente ligados às extremidades livres. Cada extremidade do fragmento adaptado consiste da seqüência de nucleotídeo dos adaptadores, mais a porção da seqüência de atuação da enzima de restrição. Esta extremidade de seqüência (conhecida) atua como o sítio de iniciação do AFLP. Em resumo, a técnica de AFLP é dividida em três passos básicos: 1)

Digestão do DNA celular total com uma ou mais enzimas de restrição e ligação da enzima a adaptadores em todos os fragmentos, 2) Amplificação seletiva de alguns destes fragmentos com dois primers através de PCR, correspondendo aos sítios adaptadores e de restrição, e 3) Eletroforese e separação das amplificações em gel, seguido por visualização dos padrões de bandas. Na técnica de RAPD os passos são simplificados e a amplificação do DNA é realizada com um *primer* único de seqüência arbitrária. Em seguida, as bandas são observadas através de eletroforese. Como marcadores de heranças dominantes, as informações obtidas em ambas as técnicas não permitem a detecção de heterozigotos. Apesar disso, no que se refere ao baixo custo e facilidade de execução, a técnica de AFLP foi comparada à técnica de isoenzimas, com a vantagem de oferecer mais bandas polimórficas e de ter como matéria prima (o DNA) uma molécula mais estável (Schlotterer 2004, Zimnoch-Guzowska et al., 2000 Mueller et a. 1999, Powell et al., 1996, Gerber et al., 2000).

O método PCR-RFLP consiste na amplificação de um segmento conhecido de DNA, para posterior digestão com enzimas de restrição, que reconhecem e “cortam” sítios específicos da seqüência amplificada, gerando fragmentos menores que podem ser separados por eletroforese em gel. A origem dos polimorfismos detectados são mutações pontuais no sítio de reconhecimento ou inserções deleções, que alteram este sítio. Trata-se de uma técnica capaz de detectar heterozigotos, entretanto é muito trabalhosa e pouco informativa, pois detecta um *locus* por PCR, o que restringiu notavelmente seu uso em estudos de genética populacional (Schlotterer 2004, Zimnoch-

Guzowska et al., 2000, Mueller e Wolfenbarger 1999, Powell et al., 1996, Gerber et al., 2000).

Finalmente, os microsátélites, são seqüências curtas (1 a 6 pb), repetidas em *tandem*, distribuídas aleatoriamente no genoma dos eucariotos. São também conhecidos por SSR (*Simple Sequence Repeats*), STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Sites*) e SSRP (*Simple Sequence Repeat Polymorphisms*). Apresentam-se flanqueados por seqüências únicas, podendo ser amplificados individualmente através de PCR. Desta forma são (geralmente) unilocus e apresentam comportamento co-dominante, onde os heterozigotos podem ser identificados. Devido a sua natureza altamente repetitiva e da pequena extensão da unidade de repetição, apresentam alto grau de polimorfismo. São marcadores muito freqüentes e encontram-se distribuídos ao acaso, apresentando ampla cobertura no genoma. Desta forma podem estar associados a seqüências expressas (Jarne e Lagoda 1996).

Até meados da década de 90, os microsátélites tornaram-se os mais populares e promissores marcadores genéticos em genética populacional de insetos devido ao alto potencial para detectar *loci* polimórficos. Apesar do rápido crescimento em popularidade na entomologia, recentes estudos demonstraram que esta técnica tem aplicabilidade limitada para estudos filogenéticos e que o número de *loci* polimórficos para insetos é possivelmente menor do que foi suposto no ápice de sua popularidade (Schlotterer 2004).

### **1.9. Marcadores baseados em sequenciamento**

Duas décadas após o desenvolvimento do primeiro método (1974) para o sequenciamento de DNA por um grupo americano, através de uma cooperação internacional, cientistas sequenciaram todo genoma de *Drosophila*

*melanogaster*. O sequenciamento do genoma de outras 27 espécies está em andamento, incluindo um triatomíneo (*R. prolixus*). Calculando a velocidade com que a tecnologia de sequenciamento de DNA vem avançando, Behura (2006) conjecturou que em 20 anos um inseto será imerso em uma solução em um tubo e, em relativamente curto tempo, o seqüenciador apresentará todo genoma do inseto, ou no mínimo uma grande porção dele.

O DNA ribossômico (rDNA) dos eucariotos é constituído por uma família multigênica, responsável pela síntese dos RNAs ribossomais e está organizado em unidades repetitivas (RU) em *tandem* nas regiões organizadoras nucleolares (NORs). Cada RU consiste de seqüências altamente conservadas codificadoras dos rRNAs 18S, 5,8S e 28S, intercaladas com regiões não codificadoras menos conservadas. Na maioria dos animais existem de 100 a 500 cópias das unidades repetitivas do rDNA no genoma nuclear (c.f. Hoy 1994). Cada (RU) é composta por uma região promotora ETS (*External Transcribed Spacer*), uma região codificadora do rRNA 18S, uma região interna não codificadora ITS-1 (*Internal non coding Transcribed Spacer*), uma região codificadora do rRNA 5,8S, uma segunda região não codificadora ITS-2, uma região codificadora do rRNA 28S e, finalmente, por uma região não codificadora intergênica IGS (*Intergenic non Transcribed Spacer*). Em 1997, Colman e Mai, estudando associações genéticas entre algas flageladas sugeriram que os ITS 1 e 2 seriam marcadores moleculares adequados para organismos muito relacionados devido ao nível de polimorfismo exibido e, atualmente, este marcador tem ampla aplicação no estudo de insetos vetores (ex: Pacheco et al. 2003, 2007; Bargues et al. 2006).

Tradicionalmente, o DNA mitocondrial foi mais usado em insetos do que o ITS, tanto no estudo de associações específicas, quanto populacionais devido a algumas características peculiares como a herança (em geral) uniparental (Meyer 1993). Mais especificamente, fragmentos de DNAMt têm sido usados para inferências sobre a história e evolução fenotípica de populações que divergiram recentemente, como por exemplo as “populações” do complexo *brasiliensis* (Monteiro et al. 2004). Uma das vantagens em usar o DNAMt em animais para estudos populacionais é que ele possui uma taxa de evolução maior do que os genes do DNA nuclear (Brown 1980, Perler et al. 1980; Brown et al. 1982). O DNAMt é também muito utilizado devido à facilidade em isolá-lo, ao grande número de cópias por célula, seu tamanho pequeno, sua organização simples e pela quase total ausência de recombinação (c.f.: Avise et al. 1984, Hayashi et al. 1985).

O uso do DNA mitocondrial como um marcador estritamente neutro tem sido controverso (ex: Rand e Kann 1996). Baseado em testes de neutralidade de dados moleculares de 14 manuscritos, Fry (1999) sugeriu que dentro das espécies existam um excesso de haplótipos raros e que estes haplótipos carregam parte das mutações deletérias. Ballard e Kreitman (1995) apontaram que a seleção em qualquer parte do DNAMt tem influência na estrutura da população porque a carência de recombinação faz com que o genoma da mitocôndria seja particularmente susceptível a este tipo de efeito. Contudo, Ballard e Kreitman (1995) enfatizaram que a deriva genética possivelmente é a força prevalente na evolução da mitocôndria.

**1.10. Genética populacional: principais conceitos e breve histórico**

A definição do termo populações sob um âmbito ecológico poderia ser: um grupo de indivíduos da mesma espécie vivendo em uma área restrita, o que ocorre devido ao intercruzamento. Sob o ponto de vista genético, uma população seria um grupo de indivíduos que compartilha um determinado “pool” genético, o que permite o intercruzamento. A genética populacional é a ciência que estuda a diferenciação dentro e entre populações e tenta mensurar estas variações, buscando as causas que levaram à diferenciação (c.f. Futuyma. 1995).

As diferenciações estudadas em genética de populações são mutações que, quando se acumulam, resultam em evolução. Por isso, a genética de populações está também proximamente associada aos estudos evolutivos, uma vez que a evolução depende de mudanças nas frequências gênicas. Em poucas palavras poderíamos definir a genética de populações como a ciência que tenta analisar matematicamente mecanismos de fluxo gênico e evolução. Espécies geralmente apresentam perfis naturais de estruturação populacional em diferentes áreas e o entendimento da estrutura genética pode ser importante para a elucidação de fenômenos naturais, bem como para o manejo de espécies ameaçadas de extinção e organismos danosos ao homem (c.f. Avise 2000).

A diversidade genética mantida por uma espécie ao longo de sua distribuição geográfica é determinada por interações ecológicas e processos evolutivos. As características de uma espécie (ex: tendências para a dispersão, sistemas de acasalamento e tempo para formar novas gerações) determinam o grau com que mutações, derivas genéticas e seleção natural irão influenciar na

variação dentro da população, bem como no grau de diferenciação entre populações. Desta forma, ao estudar a estruturação genética de determinado organismo é necessária a correlação entre a ecologia e parâmetros de sua história natural (c.f. Futuyma 1995).

Charles Darwin ficou conhecido como o pai da teoria da evolução, onde seus achados para a elaboração de sua teoria podem ser resumidos em três princípios: (i) o princípio da variação: entre indivíduos de uma população existe variação morfológica, fisiológica e comportamental; (ii) o princípio da hereditariedade: a prole é mais parecida com seus pais do que com indivíduos não relacionados e (iii) o princípio da seleção: algumas formas têm mais sucesso para sobreviver e reproduzir que outras formas em um dado ambiente.

Depois da absorção das teorias da seleção natural de Charles Darwin e de herança mendeliana, Fisher incorporou parte dos achados de Hardy e Weinberg, trazendo em 1918 um artigo frequentemente usado para representar “o nascimento” da genética populacional. Neste trabalho, Fisher demonstrou que através de modelos matemáticos era possível mensurar correlações entre populações. Em subseqüentes trabalhos Fisher desenvolveu o método de Análise de variância (ANOVA), com modelos estatísticos que possibilitaram a avaliação da estrutura genética em populações naturais. Durante o período de 1930 a meados de 1960, especialmente Fisher e Wright, com a contribuição de outros naturalistas, introduziram uma série de outros modelos matemáticos para análise de processos evolutivos e sobre a manutenção da variação genética em populações, que são os princípios de genética populacional. A proposta inicial de F estatística de Wright foi baseada na comparação de freqüências de variações alélicas entre populações. Contudo, observou-se que

dados moleculares podem também fornecer informações para inferências sobre mutações em genes não observados no estudo em si. Foram então criados os coeficientes de diferenciação. O modelo de alelos infinitos proposto por Kimura também representou uma contribuição fundamental para os avanços no conhecimento sobre a variação genética (Kimura e Crow 1964).

A abordagem de avaliação de variação entre e dentro de grupos de populações (a estatística  $\Phi_{ST}$ ,  $\Phi_{IS}$  e  $\Phi_{IT}$ ) foi originalmente introduzida por Weir e Cockerham (1984). Em 1992, Excoffier apresentou um método derivado do ANOVA, onde foi possível avaliar a diferenciação genética diretamente de dados moleculares (AMOVA: análise de variância molecular). Segundo Excoffier (1992) esta técnica tem mais resolução do que as estatísticas F convencionais, especialmente quando os níveis de diversidade (ou variação nucleotídica) são altos. Trata-se de um importante e relativamente recente método estatístico que permite o parcelamento hierarquizado da variação genética entre populações (ou grupos) de acordo com as hipóteses testadas, e os resultados são estimados por indicadores  $\Phi$ -estatística. Os cálculos de  $\Phi$ -estatística do AMOVA são paralelos e seguem a mesma lógica dos F-estatística, sendo também conhecidos como “Wright-derivados” (Peakall et al. 1995).

Assim, a abordagem de AMOVA possibilitou estimar a diferenciação populacional, analisando diferenças entre moléculas mais eficientemente do que o modelo usual de frequências alélicas, que foi a base dos estudos até então. O método de AMOVA foi primariamente desenhado para análises em marcadores dominantes (RAPD ou AFLP), e adaptado para estudos de



haplótipos, com o pressuposto da ausência de recombinação genética, como o caso de estudos utilizando DNAm em geral (Stewart e Excoffier 1996).

Os métodos estatísticos tradicionais (como a parcimônia, neighbour-joining e máxima verossimelhança) para estimativa das relações entre *taxa* apresentam uma série de dificuldades para reconstrução da genealogia de genes a nível populacional porque foram desenhados para reconstrução filogenética. Por exemplo: estes métodos assumem que o haplótipo ancestral não existe mais na população. Porém, a teoria da coalescência (modelo de sítios infinitos) espera que o haplótipo ancestral seja muito freqüente em uma amostragem. Além disso, os métodos acima mencionados (geralmente) requerem um grande número de variáveis para uma reconstrução acurada das relações entre as variantes e os estudos populacionais geralmente carecem desse nível de variáveis (Watterson e Guess 1977; Donnelly e Tavaré 1986; Crandall e Templeton 1993). Desta forma, Clement et al. . (2000) desenvolveram um programa (TCS) que possibilita a construção de uma rede genealógica (*network*) baseada nos métodos de parcimônia estatística desenvolvidos por Templeton et al. (1992), que também fornece a informação do total na amostragem que representa cada haplótipo.

Nos últimos anos, a facilidade para o acesso aos seqüenciadores automatizados tem proporcionado a obtenção rápida e precisa de informação genética e, conseqüentemente, grandes mudanças e aprimoramento de tecnologias aplicáveis em genética de populações. Segundo Wakeley (2004), modelos teóricos e técnicas computacionais apropriadas para lidar com dados moleculares estão em rápido desenvolvimento.

Os métodos para estudos de genética populacional vêm recebendo grande contribuição de cientistas interessados no estudo de genética de populações de espécies ameaçadas de extinção. Para a manutenção da espécie, a diversidade genética é considerada como bom fator. Quanto à estrutura genética, grandes e múltiplas populações de uma espécie que estão em qualquer grau de contato umas com as outras representam uma boa situação para manutenção da espécie, bem como da variação (c.f. Avise 1994).

A correlação entre os eventos históricos e de diversidade na estruturação genética começou a ser amplamente explorada após a década de 1990. Segundo Bernatchez (2001), várias abordagens são necessárias para inferências sobre a história demográfica de uma espécie. Algumas abordagens foram desenvolvidas para avaliar a estrutura genética (ex: AMOVA, teste de Mantel, teste de Tajima), enquanto outras, como a *Nested Clade Phylogeographic Analyses* (NCPA) são voltadas para testar hipóteses sobre a história evolutiva da estrutura observada, ou seja, diferenciar o fluxo gênico recente do fluxo histórico. Esta última metodologia tem sido largamente usada em filogeografia (c.f. Sezonlin et al. 2006).

O teste de Mantel (1967) para matrizes de correspondência foi otimizado por Smouse et al. (1992) com a opção do teste de permuta aleatória para avaliação da consistência dos resultados. Esta abordagem permite o teste estatístico de correspondência entre quaisquer matrizes de distância genéticas, geográficas, fenotípicas, entre outras. A mais popular aplicabilidade deste teste tem sido observada, especialmente para avaliar a hipótese de isolamento por distância (IBD) para o qual a matriz dos valores de  $F_{ST}$  pode ser comparada

com a matriz de distância geográfica para as respectivas populações (Slatkin 1985, 1993, 1995).

Desta forma, a interpretação de conexões e barreiras para o fluxo gênico em populações atuais e inferências sobre história filogeográfica suscitam cuidadoso planejamento de amostragem, bem como escolha dos marcadores moleculares e das abordagens para as análises propostas.

#### **1.11. Ferramentas moleculares e insetos vetores, com enfoque para Triatominae**

Antes do advento dos marcadores moleculares, estudos sobre a morfologia externa proporcionaram contribuição significativa para o conhecimento dos vetores da doença de Chagas. Até então, inferências genéticas foram baseadas em informações da morfologia externa, biologia e citogenética (ex: Schreiber et al. 1977). Em 1979, Lent e Wygodzinsky apresentaram uma extensa obra sobre a taxonomia dos triatomíneos, trazendo também informações filogenéticas, bionômicas e ecológicas, além de refinar e apresentar novas descrições específicas. Mesmo após os achados moleculares, considera-se ainda hoje a taxonomia clássica (baseada em caracteres morfológicos) como uma forma segura de se identificar os triatomíneos, pois possibilita aplicação imediata e segura, na maioria dos casos (Abad-Franch e Monteiro 2005).

A utilização da morfometria como fonte de informação genética foi apresentada para o grupo interessado em estudos sobre triatomíneos antes da “explosão” na utilização das ferramentas moleculares (ex: Harry 1994) e a morfologia do exocório dos ovos (ex: Lucena 1969, Barata 1998) também foi explorada com este fim, bem como estruturas cuticulares (ex: Carcavallo et al. 1997) e da sensila (ex: Catalá et al. 1996). Uma nova e promissora ferramenta

baseada em informações da morfologia externa tem sido apresentada para estudos de genética populacional em triatomíneos: a morfometria geométrica, com a utilização de análises discriminantes que puderam inclusive encontrar diferenças marcantes entre populações de triatomíneos provenientes de diferentes ecótopos (Borges et al. 2005, Dujardin et al. 2002).

Actis et al. (1964) transferiu os conhecimentos sobre eletroforese de isoenzimas de protozoários e modelos já utilizados com sucesso para drosófilas para a primeira tentativa de utilizar caracteres moleculares para solucionar questões taxonômicas em triatominae, comparando isoenzimaticamente espécies do complexo *T. sordida*. As análises isoenzimáticas foram impulsionadas pelos achados de Dujardin e Tibayrenc (1985) sobre a variação genética de *T. infestans*. Desde então, contribuições diversas têm sido oferecidas usando esta ferramenta em taxonomia, filogenia e genética populacional.

Tartarotti e Ceron (2005) constataram a diferenciação entre várias espécies de triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Fragmentos de ITS têm fornecido grande contribuição para elucidar relações filogenéticas entre diferentes espécies, ao passo que o DNA mitocondrial tem sido usado tanto em um âmbito filogenético, quanto populacional (Behura 2006).

Os estudos citogenéticos em triatomíneos trouxeram contribuições significativas para a compreensão da variação genética dentro do grupo. *Triatoma infestans*, por exemplo, apresenta 10 pares de autossomos e um par de cromossomos sexuais (XY em machos e XX nas fêmeas). Uma análise citogenética foi realizada por Schreiber e Pellegrino (1950) para *T. infestans* e

outras espécies, incluindo *T. brasiliensis*. Variações na quantidade e posição da heterocromatina C foram evidenciadas em populações naturais desta espécie do Uruguai e em populações criadas em laboratório, provenientes do Brasil, Paraguai, Argentina e Chile (Panzera et al. 2004). A indicação de polifiletismo para o gênero *Triatoma* foi reforçada com os estudos citogenéticos que demonstraram que as espécies das Américas Central e do Norte apresentam o modelo  $X_1X_2Y$ , que na América do Sul só foi observado para os gêneros *Panstrongylus* e *Eratyrus*. A quantificação total do genoma também tem sido útil na avaliação da diferenciação de 13 espécies pertencentes a cinco gêneros: *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* (Panzera et al. 2007).

Através de dois genes mitocondriais, Lyman et al. (1999) demonstraram que as duas maiores tribos previamente propostas pela taxonomia clássica para a subfamília Triatominae (Triatomini e Rhodniini) posicionaram em clados claramente suportados estatisticamente. Estes autores ainda indicaram o monofiletismo para os gêneros *Psamolestes* e *Rhodnius*.

A questão da origem e evolução do grupo Triatominae (especialmente do clado das Américas Central e do Norte) permanece controversa. Uma rigorosa análise combinando informações morfológicas, biológicas, ecológicas, comportamentais de todos integrantes da subfamília foi desenvolvida (Tietz 2000). Seguindo esta mesma linha, Hypsa et al. (2002) utilizaram os genes 12 e 16S do DNA ribossomal numa tentativa de reconstituir a história evolutiva dos triatomíneos, com o uso de 57 espécies representando as três tribos da subfamília: *Rhodniini*, *Linchosteini* e *Triatomini*. O representante asiático do velho mundo (*Linshcosteus*) posicionou-se como espécie irmã do grupo

“rubrofasciata”, suportando a hipótese de monofiletismo para o grupo dos triatomíneos. Assim, estes autores sugeriram uma série de revisões, como por exemplo: a reinclusão do gênero *Linshcosteus* na tribo Triatomini, inclusão de *Psamolestes* no gênero *Rhodnius* e a inclusão do “complexo *T. spinolai*” no gênero *Mepraia* (*M. spinolai*, *M. garjadoi*, *M. eratyrisiformis*, e *M. breyeri*).

Vários outros trabalhos foram desenvolvidos para resolução de questões filogenéticas e taxonômicas, trazendo importantes informações, tais como: o tratamento de *T. brasiliensis* como um complexo de unidades evolutivas distintas (Costa et al. 1997a, Monteiro et al. 2004); a necessidade de rebaixar o status taxonômico de *T. melanosoma* (Monteiro et al. 2004); a designação de vetores introduzidos no Cone Sul (*T. infestans*, [Dujardin et al. 1998] ) e América Central (*Rhodnius prolixus*, [Panzeria et al. 2004] ); a estrutura panmítica de *T. sordida* (grupo 1) na Bolívia (Noireau et al. 1999); a atenção para a possível identificação equivocada de *R. prolixus* e *R. colombiensis* (Monteiro et al. 1999); a caracterização de uma espécie críptica de *T. sordida* (Noireau et al. 1999a,b) e a avaliação da variabilidade genética vs. cromática de *T. rubrovaria* (Almeida et al. 2002a,b, Pacheco et al. 2003, Pacheco et al. 2007).

Entretanto, os trabalhos com a utilização de ferramentas moleculares em genética populacional têm sido desenvolvidos em sua maioria em um contexto filogeográfico (ex: Monteiro et al. 1999, Monteiro et al. 2004) e contam-se ainda atualmente poucos trabalhos direcionados a identificação das populações de triatomíneos que invadem e colonizam domicílio.

Apesar dos avanços na técnica de microsátélites, ainda admite-se que a comparação de seqüências de DNA possa apresentar contribuição segura e

eficiente para se quantificar a variação de populações naturais, como já havia sido apontado por Kreitman em 1983. Contudo, embora os métodos para o sequenciamento de DNA estejam viabilizados desde 1977, até 1990 o uso de seqüências de DNA teve pouco impacto na genética de populações em triatominae. Isto se deu porque os esforços (em termos de recursos financeiros e tempo) necessários para a obtenção de seqüências de DNA de um relativo grande número de alelos não era ainda substancial. A introdução do PCR (Saiki et al. 1985; 1988) permitiu sequenciamento direto dos produtos de PCR (ao invés da clonagem), o que tem produzido uma mudança revolucionária no campo da genética de populações. Estudos neste sentido no grupo dos triatomíneos já trouxeram informações significantes, como por exemplo, a estrutura genética de *T. rubida*, *T. infestans*, e *T. dimidiata* (Pfeiler et al. 2006, Peres de Rosas et al. 2007 e Dumonteil et al. 2007).

## 2. Justificativa

Dias et al. (2000) e Oliveira-Filho et al. (2000) mencionaram que *T. brasiliensis* apresenta uma alta pressão de reinfestação após o tratamento químico domiciliar, permanecendo como um desafio para as campanhas de controle vetorial no nordeste brasileiro. Costa et al. (2003a) demonstraram que no estado da Paraíba são encontradas as mais altas taxas de infestação por *T. brasiliensis*. Silveira et al. (2001a,b) determinaram o tempo e condições para a reposição das condições de transmissão da doença de Chagas por *T. brasiliensis* em áreas submetidas ao tratamento químico domiciliar no semi-árido da Paraíba, fornecendo subsídios para a definição das áreas a serem analisadas. As informações sobre a genética de populações de *T. brasiliensis* podem auxiliar na elucidação da origem dos focos de reinfestações, no diagnóstico de populações que persistem às atividades de controle e sobre a plasticidade adaptativa de *T. brasiliensis* nos seus diferentes ecótopos.



### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

- Investigar a estrutura genética de *T. brasiliensis* em uma esfera espacial, temporal e ecotípica no estado da Paraíba, utilizando-se informações de um gene do DNA mitocondrial: citocromo B (Cyt B).

#### 3.2. Objetivos específicos

- Fornecer informações sobre a genealogia e processo de diversificação de *T. brasiliensis* na área estudada;
- Comparar o papel das variáveis geográficas e ecotípicas na estrutura genética de *T. brasiliensis*;
- Avaliar a variabilidade genética através do gene Cyt B do DNAm de diferentes populações de *T. brasiliensis*, como indicador de plasticidade adaptativa e susceptibilidade às medidas de controles;
- Reconhecer o perfil das populações que invadem e colonizam os domicílios em diferentes sítios geográficos no estado da Paraíba;
- Elucidar o papel das populações peridomiciliares, ruderais e silvestres nos processos de infestação domiciliar;
- Verificar a variação genética de populações coletadas em diferentes “momentos” das atividades de controle vetorial;
- Analisar as implicações epidemiológicas da estrutura genética eco-espaciotemporal de *T. brasiliensis*;
- Apresentar informações úteis para o monitoramento do processo de reinfestação domiciliar de *T. brasiliensis*.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Capturas.

As capturas foram efetuadas de 2001 a 2004 entre as coordenadas  $06^{\circ}51'29,23''$  e  $07^{\circ}00'25,31''$  a oeste; e  $38^{\circ}22'59,58''$  e  $38^{\circ}00'49,08''$  ao sul. Todos os pontos de coleta estão incluídos numa seção referendada pela Funasa como Distrito Sanitário de Souza. Os sítios amostrados localizaram-se principalmente dentro do município de São José da Lagoa Tapada, mas estenderam-se a áreas limítrofes com os municípios de Souza (ao norte) e Nazarezinho (a oeste). As localizações geográficas e distâncias entre os pontos foram obtidas com o uso do programa GPS Trackmaker (Junior 2003, Figura 5).

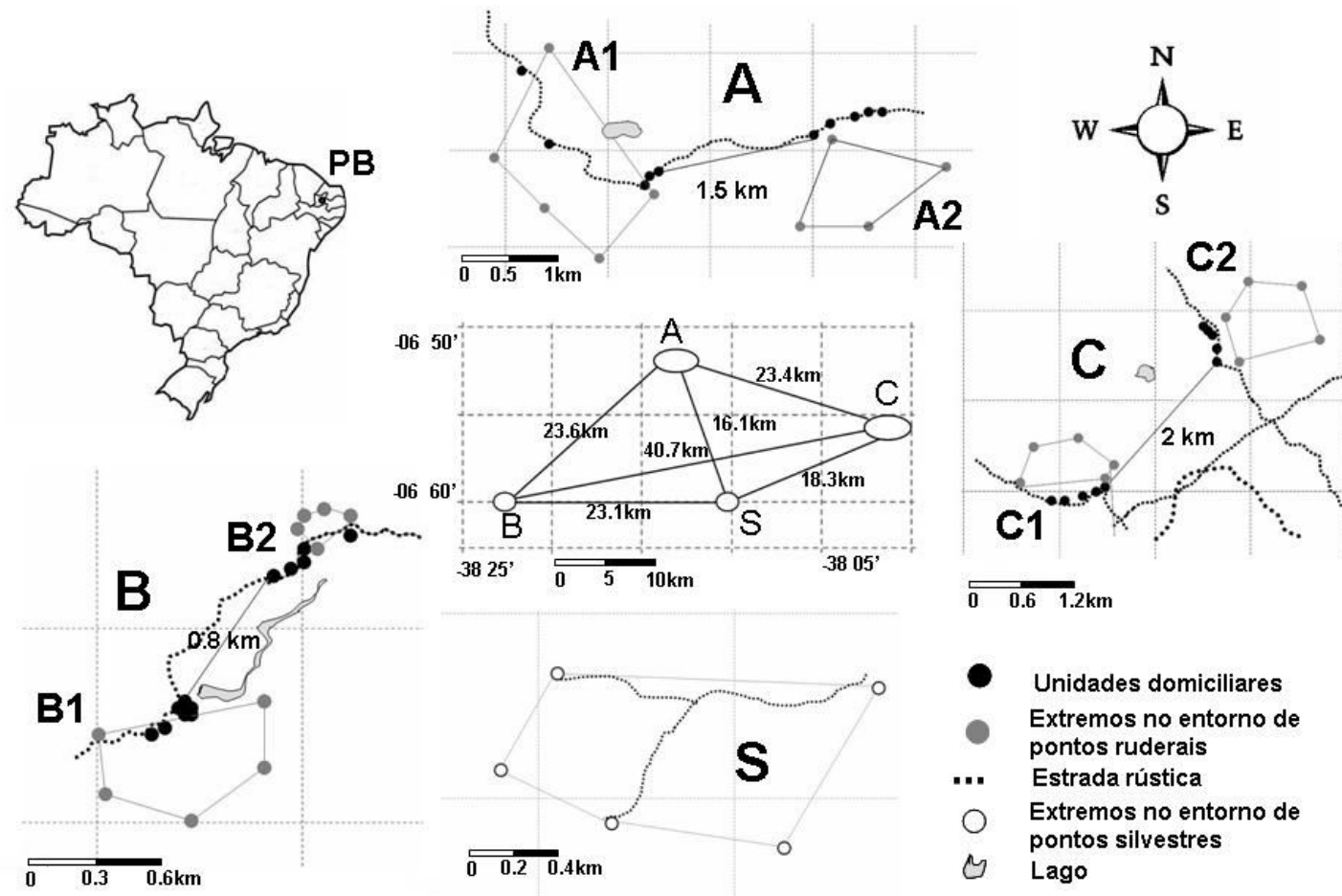


Figura 5. Sítios de coleta para os espécimens de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* nas quatro localidades ('A', 'B', 'C' e 'S') no estado da Paraíba, Brasil. Exceto para 'S' (ponto silvestre), cada localidade foi dividida em duas sub-localidades ('1' e '2').

Silveira et al. (1999a,b) mencionaram que, em geral, seis meses após as borrifações domiciliares com inseticidas dá-se início ao processo de reinfestação por *T. bras. brasiliensis*. Esta observação foi baseada em um estudo amplo monitorando o processo de infestação por este vetor (e também por *T. pseudomaculata*) em todos os municípios do estado da Paraíba. Estes estudos forneceram também a base para a escolha da área onde foi registrada a maior pressão de reinfestação após a borrifação com o inseticida.

A população coletada de seis meses a 1,2 anos após a borrifação das casas com inseticidas foi considerada como “a população coletada dentro de um curto período após o tratamento químico domiciliar”. Segundo Silveira et al. (1999a,b), devido ao curto tempo decorrido entre a última borrifação e captura, espera-se que estas populações encontrem-se em processo de restabelecimento da infestação.

Foram efetuadas coletas na mesma área geográfica dentro de 2,9 a 3,5 anos após o tratamento com inseticidas, capturando-se insetos em unidades domiciliares que não receberam tratamento químico dentro deste período. Os insetos coletados dentro deste último período foram denominados como “a população coletada em um longo período após o tratamento químico domiciliar”. Segundo Silveira et al. (1999a,b), espera-se que as populações domiciliares coletadas dentro deste período sejam provenientes de infestação já restabelecidas.

Para a definição dos sítios de captura foi desenvolvido um reconhecimento da área, com o uso do GPS e foi efetuada uma consulta nos registros de captura domiciliar de triatomíneos fornecidos pelo Distrito Sanitário de Souza. Desta forma, foram escolhidos pontos com alta incidência de positividade para capturas de triatomíneos nos últimos três anos.

Os ambientes não habitados (selvagens) não são tratados com inseticidas, mas também foram amostrados em ambos os períodos e foi utilizada a terminologia “dentro de um curto/longo período após a borrifação” com referência ao período de coleta domiciliar, uma vez que coletas domiciliares e silvestres foram efetuadas simultaneamente.

#### **4.2. Insetos**

Os insetos foram rotulados de acordo com o ecótopo (intradomiciliar, peridomiciliar, ruderal e silvestre). Foram considerados como ecótopos intradomiciliares ('I') os ambientes de unidades domiciliares fechados por portas, compreendendo casas ou anexos, onde principalmente humanos circulam (Figura 6). Nestes ambientes os triatomíneos foram usualmente encontrados refugiados em fendas nas casas de barro, sob camas ou atrás de objetos encostados nas paredes.



**Figura 6.** Intadomicílio onde exemplares de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* foram coletados no município de São José da Lagoa Tapada, Paraíba. **A:** casa de barro; **B:** fenda na parede de barro onde foram encontrados exemplares de *T. bras. brasiliensis*.



Os ecótopos peridomiciliares ('P') encontraram-se usualmente dentro de um raio de 50 m das casas, onde animais domesticados dormem ou são criados (Figura 7). A maioria dos triatomíneos foi capturada em galinheiros e currais de porcos ou cabras no peridomicílio. Quando analisados conjuntamente, os insetos coletados no peri e intradomicílio são aqui chamados de população domiciliar.



**Figura 7. Ambiente peridomiciliar onde exemplares de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* foram coletados no município de São José da Lagoa Tapada, Paraíba.**



Foi considerado como início do ecótopo ruderal ('R) a partir de 50 m fora do raio dos domicílios. O ambiente ruderal usualmente alcançou de 1 a 2 km de distância dos domicílios (Figura 8). Uma unidade ruderal foi amostrada para cada vila. Neste ambiente a vegetação nativa foi substituída por pastos ou culturas agrícolas, ambos de vida curta.



**Figura 8. Ambiente ruderal onde exemplares de *Triatoma brasiliensis* foram coletados no município de São José da Lagoa Tapada, Paraíba.**

A população local (sertaneja) caça o que restou da fauna nativa para se alimentar e proteger os animais domesticados neste habitat. Desta forma, animais domesticados, especialmente caprinos, eqüinos e bovinos, são

facilmente observados nesse ambiente, mas animais silvestres homeotérmicos são raramente avistados entre as pilhas de rochas onde os triatomíneos foram coletados.

No ambiente silvestre ('S') nenhum domicílio pôde ser avistado em um raio de aproximadamente 200 m (Figura 9). Este ecótopo difere do ambiente ruderal principalmente porque o ambiente silvestre não foi transformado em pasto ou área agrícola. Animais silvestres foram os mais comumente vistos nos ecótopos onde triatomíneos foram coletados. Um roedor filogeneticamente relacionado com o preá (Lacher 1981), conhecido vulgarmente como mocó (*Kerodon rupestris*), foi o animal homeotérmico mais avistado entre as rochas.



**Figura 9. Ambiente silvestre onde exemplares de *Triatoma brasiliensis* foram coletados no município de São José da Lagoa Tapada, Paraíba.**

As capturas domiciliares foram efetuadas durante o dia, usando desalojantes (neopinamina a 0,2%), quando necessário. Durante o mesmo período e com o mesmo grupo de trabalho da Funasa foram efetuadas capturas noturnas e manuais nas áreas não habitadas ('R e 'S').

Uma única área de coleta silvestre foi amostrada. Com exceção da área silvestre, cada localidade foi dividida em duas seções (ou vilas), aqui denominadas '1' e '2' (Figura 5). Em seguida, a amostragem foi separada de acordo com o ecótopo e ponto geográfico para definição dos sítios, que foram definidos por três caracteres. O primeiro foi usado para definir a localidade ('A', 'B' ou 'C'), o segundo, a sub-localidade ('1' ou '2'), e o sufixo, o ecótopo ('I', 'P'

ou 'R', Tabela 1). O sufixo 'IP' foi usado quando as amostras intra e peridomiciliares de uma dada localidade foram unificadas.

Todos os triatomíneos coletados em estádios imaturos foram levados ao laboratório, mantidos em condições controladas de temperatura e umidade ( $27\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $60\pm 3\%$  RH) e alimentados semanalmente em camundongos até a muda imaginal. Os espécimes adultos foram então identificados de acordo com as características taxonômicas propostas por Lent & Wygodzinsky (1979), Galvão (1956), Costa et al. (2006) e Costa e Felix (2007).

#### **4.3. Extração e amplificação do DNA**

Os insetos foram mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento. Cada exemplar foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido para individual maceração das patas em um tudo de eppendorf, com o auxílio de um pilão plástico esterilizado. O protocolo Wizard Genomic Purification Kit (Promega, Madison, WI) foi usado para a extração, seguindo os procedimentos indicados no kit Promega para tecidos animais.

Uma região de 510 pares de bases do gene mitocondrial (Cyt B) foi amplificada através de PCR, usando os primers CYTB7432F, 50-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC, e CYTBR, 50-ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG (Lyman et al. 1999; Monteiro et al. 2003, 2004) e as reações foram conduzidas em um Eppendorf Master Gradient Thermocycler (Brinkman Instruments, Westbury, NY).

Foram empregados os seguintes ciclos: desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min, em seguida 30 ciclos de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos, pareamento à  $47^{\circ}\text{C}$  por 30 s, e extensão à  $72^{\circ}\text{C}$  por um minuto; seguido de uma extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por dez minutos e em temperatura de espera ( $4^{\circ}\text{C}$ ) indefinidamente.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídeo e em seguida seqüenciados usando um BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit' (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com o protocolo do *kit*, que inclui um outro ciclo de reações de PCR para seqüenciamento.

Ambas as fitas foram seqüenciadas diretamente e ambas as direções com primers de amplificação, usando em um seqüenciador automatizado *Applied Biosystem Model 3100*. As seqüências consenso foram editadas e alinhadas usando o programa SEQMAN program<sup>32</sup> e alinhadas através do programa Alignment Clustal viabilizado pelo Mega<sup>3.33</sup>.

#### **4.4. Análises estatísticas dos haplótipos**

Para avaliar o polimorfismo populacional, foi observada a diversidade nucleotídica baseada em sítios polimórficos ( $\theta$  - diversidade total) e a diversidade nucleotídica baseada na média das diferenças par-a-par entre as seqüências ( $\pi$  - pi), para cada população, implementadas pelo programa Arlequin (Excoffier et al. 2005). Aplicou-se também a diversidade haplotípica, viabilizada pelo programa DNA SP 4.0 (Rozas et al. 2003). Os cálculos mencionados foram baseados em equações propostas por Nei (1987). Baseado em modelo de alelos infinitos, a diversidade haplotípica propõe uma analogia à heterozigose para valores obtidos através de marcadores co-dominantes. Em linhas gerais, os valores obtidos pela diversidade haplotípica são definidos como a probabilidade que dois haplótipos têm de se mostrarem diferentes na amostragem.

#### 4.5. Neutralidade e Demografia

Segundo Kimura e Ohta (1971) e Kimura (1983), a maioria das análises de variabilidade genética assume que as populações estão em equilíbrio de mutação, fluxo gênico e deriva. Contudo, esses pressupostos nem sempre refletem à amostragem (Amos e Harwood 1998).

As variações estão sujeitas a forças de seleção, e podem também demonstrar uma estrutura muito uniforme, se a população rapidamente expandiu em tamanho após um evento de gargalo de garrafa (Walker et al. 1998). Desta forma, a hipótese nula de neutralidade ou detecção de eventos demográficos foram avaliadas usando o teste  $D$  da estatística de Tajima (1989a,b),  $F_s$  de Fu (1997, 1999) e a estimativa de Chakraborty (1990).

O teste de Tajima ( $D$ ) é baseado no número nos sítios segregantes, diferenças nucleotídicas par-a-par e tamanho amostral. Os testes de  $F_s$  e Chakraborty seguem uma mesma linha e confrontam o número de alelos esperados com número de alelos observados, mas segundo Fu (1997),  $F_s$  é mais sensível a expansões demográficas, que geralmente levam a valores altos e negativos. O número de haplótipos esperados em um modelo neutro para o teste Chakraborty foi apresentado porque este teste funciona também com indicador de mistura (heterogeneidade) populacional. Segundo Ramos-Onsins e Rozas (2002), quando os testes de Tajima, Fu e Chakraborty são analisadas em conjunto, pode-se reforçar hipóteses alternativas além do desvio da neutralidade, como as de eventos demográficos. Todos os testes foram desenvolvidos e submetidos à permuta aleatória através do programa Arlequin (Excoffier et al. 2005).

Uma vez que panmixia é um dos pressupostos das estatísticas de testes de neutralidade, foram aplicados os testes de Tajima, Fu e Chakraborty



primeiramente para toda a amostragem. Em seguida, foi testada a hipótese de que populações ecotípicas e geográficas não são panmíticas, aplicando os testes de neutralidade para cada população proposta individualmente. Assim, uma última etapa, os testes de neutralidade foram aplicados para cada sítio eco-geográfico.

#### **4.6. Genealogia**

Uma genealogia de genes (*network*) foi construída usando a parcimônia máxima proposta por Templeton et al. (1992), implementada pelo programa TCS 1.2 (Clement et al. 2000). Não é esperado que o DNA mitocondrial de insetos sofra recombinação genética, portanto, as reticulações na rede genealógica são interpretadas como homoplasias. Monteiro et al. (2004) apresentou um estudo filogeográfico de *T. brasiliensis*, utilizando o mesmo fragmento aqui utilizado, onde foi demonstrada alta frequência de sítios homoplásicos, que estes autores consideraram como sítios hipervariáveis (hot spots), devido ao reconhecimento de mais de uma mutação para os mesmos sítios. Assim, as reticulações foram resolvidas seguindo prognósticos teóricos sobre a estrutura comum da rede genealógica propostos por Crandall e Templeton (1993) e Posada e Crandall (2001). A rede genealógica foi codificada em dois modos para visualizar as diferenças entre grupos, sendo que cada codificação concordou com a estrutura de interesse: uma rede demonstra a proporção de haplótipos por ecótopo e a outra por localidade.

#### **4.7. Estrutura genética**

##### **4.7.1. Isolamento por distância**

O teste de isolamento por distância (IBD) foi aplicado pela comparação do FST par-a-par com as distâncias geográficas par-a-par transformadas em

logaritmos e a significância foi determinada pelo teste de Mantel (1.000 permutações), utilizando o programa Arlequin (Excoffier et al. 2005). Desta forma, foi investigada a evidência de IBD usando matrizes de distâncias lineares  $F_{ST}$  ( $F_{ST} / [1 - F_{ST}]$ ) de acordo com Slatkin (1985, 1993, 1995) para correlação (distância Euclideana). Quando o teste de IBD foi aplicado a nível intra localidade, as distâncias geográficas não foram logaritimizadas e tampouco o  $F_{ST}$  foi linearizado, objetivando sumarizar todas as informações em um mesmo gráfico.

#### **4.7.2. Estrutura genética espacial vs. ecológica**

A estatística  $F$  de Wright (1946, 1951, 1978) é largamente usada para caracterizar a estrutura genética de populações. As diferenças par-a-par (Wright 1978) das populações foram calculadas com o coeficiente de diferenciação ( $F_{ST}$ ) para inferências sobre o fluxo gênico. Assim, o  $F_{ST}$  foi calculado entre todos os pares de populações.

A distribuição da diversidade (estrutura genética) foi estimada pela Análise de Variância Molecular (AMOVA; Excoffier et al. 1992). O total da variação genética foi dividido de acordo com as hipóteses para observar a diferenciação entre indivíduos dentro de uma população e entre diferentes populações, ou grupo de populações. Desta forma, a variação entre e dentro das coletas foi observada através de uma análise hierárquica de (co)variância molecular. Os testes de AMOVA foram submetidos a 1.000 permutações aleatórias.

As estruturações foram impostas nos dois modos que tem sido hipotetizados como limitantes do fluxo gênico em triatomíneos: a distância física e barreiras ecóticas. Primeiramente foi testada a hipótese nula de que a estrutura genética não esteve associada com os ecótopos, agrupando todas as



populações de acordo com sua localização geográfica. Em seguida, as populações foram agrupadas de acordo com os ecótopos.

A comparação entre as proporções de variação explicada por cada partição provê informação sobre o papel relativo da geografia vs. ecologia na estrutura populacional de *T. bras. brasiliensis*.

#### **4.7.3. Estrutura genética eco-espacial vs. temporal**

Um segundo nível de amostragem foi desenhado para investigar a diferenciação temporal. Os insetos coletados em um curto período após a borrifação (entre 0,5 a 1,2 anos) foram considerados como a população “em processo de restabelecimento” da infestação. As populações coletadas dentro de 2.9 a 3.5 anos após o tratamento com inseticida (a população usada para inferências sobre a estrutura genética geográfica vs. ecotípica) foram consideradas grupos bem estabelecidos. Estudos prévios (Silveira et al. 1999a,b) demonstraram que este último “gap” de tempo é suficiente para o restabelecimento das infestações domiciliares para a área de estudo.

A diversidade genética e os valores de  $F_{ST}$  foram calculados usando populações coletadas em ambos os períodos após a borrifação com inseticida. Levando-se em conta os sinais de diferenciação genética, foram testados agrupamentos de todas as combinações possíveis para uma AMOVA, usando populações domiciliares e ruderais coletadas em ambos os períodos, com o intuito de acessar a influência eco-espacial vs. temporal na estrutura genética de *T. bras. brasiliensis*. A informação sobre quais populações poderiam formar um grupo consistente com a população coletada em um curto período após a borrifação forneceria pistas da origem da população que inicia a infestação e se

alguma população domiciliar mantém o perfil original após o estabelecimento da infestação.

#### **4.8. Análise integrada dos resultados**

Em um primeiro nível de estudo, foram analisadas as estruturas genéticas geográficas vs. ecotípicas. Em um segundo nível, os sinais de estruturação genética eco-espacial foram confrontados com as informações da variação genética temporal. Os indicadores de diversidade haplotípica, e de isolamento por distância foram levados em conta para inferências sobre os possíveis focos de populações invasoras. As particularidades ecológicas de cada ponto estudado também foram consideradas para inferências sobre a estrutura genética e possível papel de processos demográficos de *T. bras. brasiliensis* em um contexto eco-epidemiológico.

## 5. Resultados

### 5.1. Capturas

Um total de 263 insetos foi utilizado para acessar a estrutura genética eco-espacial e 98 exemplares foram usados para avaliar a estrutura genética eco-espaciotemporal dos insetos coletados nas localidades ('A', 'B', 'C' e 'S'; Figura 5). Destes, 37 insetos foram coletados no ambiente silvestre, que foi restrito a uma área no extremo sul, porque não foi encontrado nenhum outro ponto exibindo as características silvestres entre os pontos 'A', 'B' e 'C'. Para este estudo procurou-se dividir a amostragem de forma a obter insetos representantes do maior número de domicílios possível. Foi possível obter exemplares provenientes de, no mínimo, cinco diferentes unidades domiciliares para cada sub-localidade. Nenhuma barreira geográfica evidente (ex; rios, lagos, montanhas, depressões) foi avistada entre localidade e sub-localidades.

Cinco pontos de coleta domiciliar foram amostrados na sub-localidade 'A1', onde 27 exemplares (16 do intra e 11 do peridomicílio, respectivamente) foram coletados. Quinze exemplares do ambiente ruderal foram coletados em 'A1'. Nesta localidade foi registrado o maior alcance (superior a 1 km) entre domicílios dentro da mesma sub-localidade. Na localidade 'A2', 15 exemplares foram capturados no intradomicílio e 12 no peridomicílio, provenientes de cinco unidades domiciliares. Mais quatorze exemplares foram provenientes do ambiente ruderal nesta sub-localidade. Um quilômetro e meio separa os dois pontos mais próximos entre domicílios das sub-localidades 'A1' e 'A2'. Estas sub-localidades estão entre os limites dos municípios de São José da Lagoa Tapada e Souza.

Na sub-localidade 'B1' foram obtidos 11 insetos do intradomicílio e 18 no peridomicílio, provenientes de sete unidades domiciliares. Foram coletados mais 16 exemplares no ambiente ruderal. Na sub-localidade 'B2' foram amostradas seis unidades domiciliares, apresentando 11 e quatorze exemplares, respectivamente. Quatorze exemplares foram coletados no ambiente ruderal nesta sub-localidade. Foi registrado o menor alcance entre as duas unidades domiciliares mais próximas (0,8 km) para estas sub-localidades. Estes pontos encontram-se no extremo oeste do município de São José da Lagoa Tapada, em áreas limítrofes com o município de Nazarezinho.

Na sub-localidade 'C1', sete e dez exemplares foram coletados no intra e peridomicílio, respectivamente, provenientes de seis unidades domiciliares. Quatorze exemplares foram coletados no ambiente ruderal nesta sub-localidade. Na sub-localidade 'C2', somente oito e nove exemplares puderam ser encontrados no intradomicílio de cinco unidades domiciliares. Entre estas duas sub-localidades foi registrada a maior distância entre os dois domicílios mais próximos de cada sub-localidade (cerca de 0,2 km). Estas localidades estão ao sudeste do município de São José da Lagoa Tapada.

Após a captura, os insetos foram separados de acordo com o ecótopo e sub-localidade, permitindo definir 18 sítios, com número amostral alcançando de sete a 18 indivíduos (Tabela 1).

Os 37 exemplares de *T. bras. brasiliensis* coletados no ambiente silvestre foram provenientes de área geográfica restrita ao sul do município de São José da Lagoa Tapada. A má conservação da estrada de acesso a este ambiente parece ter influenciado nas diferenças associadas à ocupação humana, pois no ponto silvestre não foram observadas acentuadas alterações ambientais, como

observado nos demais pontos, tais como: pastagens, predominância de animais domesticados, culturas agrícolas, entre outras.

Tabela 1. Tamanho amostral (N), diversidade haplotípica (Hd) e número de cada haplótipo encontrado em cada sítio. Nas oito primeiras e seis seguintes linhas dentro dos retângulos estão as amostras obtidas para o intradomicílio e peridomicílio, respectivamente. Os valores para as amostras coletadas dentro de um curto (0,5-1,2 anos) período após o tratamento com inseticidas estão entre parênteses. Coletas ruderais para este mesmo período estão entre colchetes. Os haplótipos sombreados foram exclusivos para os ambientes ruderais ou silvestre.

Sítios	'A1I'	'A1P'	'A1R'	'A2I'	'A2P'	'A2R'	'B1I'	'B1P'	'B1R'	'B2I'	'B2P'	'B2R'	'C1I'	'C1P'	'C1R'	'C2I'	'C2P'	'C2R'	'S'
N	16(10)	11(21)	15[67]	15	12	14	11	18	16	11	14	14	7	10	14	8	9	11	37
Hd	0,78(0,62)	0,84(0,69)	0,90[0,85]	0,77	0,80	0,92	0,18	0,40	0,88	0,69	0,58	0,91	0,67	0,93	0,88	0,68	0,81	0,84	0,93
I			4[7]	1	1	2				2	1	2						1	2
II	5	3(1)	1	6	2	1			1										
III	5(2)	(8)	2[10]	4	1					4	9	5							
IV	4(6)	3(9)	1[2]	3	4	1	10	14	4	5	2	2				4		1	
V			[7]				1		1					2	5				1
VI	1(2)		1										4	1		1	3	4	
VII	1	(1)		1									1	2		3	3	1	
VIII													2	2	1				
IX		1	[6]			2		1	2					1	1				
X											2	2							
XI		(1)												1			1		
XII														1	1		2		
XIII		3(1)	1[19]		4	1		2	4						1			3	
XIV		1	2[2]			3		1											
XV			[1]						1										
XVI																		1	3
XVII									2			1							1
XVIII			3[9]			2									1				8
XIX															1				1
XX									1										1
XXI												1							2
XXII			[4]			2						1			2				3
XXIII															1				3
XXIV																			3
XXV																			1
XXVI																			3
XXVII																			2
XXVIII																			2
XXIX																			1

A primeira letra ('A', 'B', 'C', ou 'S', veja Figura 5) refere à localidade. Os seguintes números à sub-localidade e a última letra ao ecótopo onde as amostras foram coletadas: 'I' = intradomiciliar; 'P' = peridomiciliar; 'R' = ruderal; e 'S' = silvestre.

Os totais analisados para o intra e peridomicílio alcançaram de nove a 18 e de sete a 16 exemplares, respectivamente. Populações ruderais foram representadas por 11 a 16 insetos. Não foi possível dividir a amostragem silvestre em sítios devido à homogeneidade ecológica observada ao longo do alcance geográfico amostrado e ao pequeno número amostral ( $n=37$ ). Desta forma, a coleta silvestre pode corresponder aqui à população espacial ou ecotípica.

Em ambos os ambientes ruderais e silvestres os triatomíneos capturados durante trabalho de campo noturno pareciam estar procurando por alimento ou cópula fora dos pedregais. Apesar da similaridade ambiental, os insetos foram facilmente capturados no ambiente ruderal em todas as localidades. Foi necessário cerca de cinco vezes mais esforço para obter o mesmo número de insetos no ambiente silvestre.

Ainda na localidade 'A1', 31 exemplares foram coletados em unidades domiciliares em um curto período após a borrifação (0,5 a 1,2 anos). Destes, 10 foram provenientes do intradomicílio, 21 do peridomicílio e 67 do ruderal, que foram destinados à análise eco-espaciotemporal. Nenhuma outra localidade demonstrou positividade para captura domiciliar neste período.

## 5.2. Seqüências de DNA

Vinte e nove haplótipos foram encontrados ao longo da área de amostragem. Os sítios polimórficos são mostrados na Tabela 2. Foram registradas substituições em 34 dos 510 sítios nucleotídicos. Dentre estas, 32 foram substituições transacionais e duas transversais. Como é comum para DNAm de insetos a frequência dos nucleotídeos foi baseada em Adenina (A) e Timina (T). (frequência T = 0,31, Citosina = 0,25, A = 0,31 e Guanina = 0,13).

Tabela 2. Sítios variáveis nos 510 pb do gen Cyt B para os 29 haplótipos de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* coletados ao longo da área de estudo.

Haplótipos	2	2	3	4	6	7	7	8	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4		
	4	7	6	6	9	2	5	1	1	6	7	8	0	2	4	4	6	7	7	9	0	2	2	4	8	8	9	9	0	1	2	5	7	9	
	.	.	.	.	.	.	.	.	7	0	1	0	1	9	4	9	1	3	6	2	5	4	7	2	3	7	1	6	8	4	0	3	2	8	
I	T	G	C	C	T	A	A	G	C	G	T	T	C	G	A	T	A	A	T	T	T	T	C	G	T	T	T	G	T	A	A	T	G	C	
II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	
IV	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
VI	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
VII	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
VIII	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
IX	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	
X	C	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	
XI	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	
XIII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XIV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XV	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XVI	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XVII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	
XVIII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
XIX	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XX	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.		
XXI	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XXII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	
XXIII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XXIV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XXV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XXVI	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XXVII	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XXVIII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
XXIX	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	



### 5.3. Neutralidade e demografia

Altos valores de diversidade haplotípicas ( $H_d$ ) foram registrados ao longo das quatro localidades, alcançando de 0,75 (total da localidade 'B') a 0,93 (total da localidade 'S'). Esta última (população silvestre) apresentou a mais alta diversidade entre todas as populações em todos os níveis, como segue: (i) amostragem total; (ii) total por localidade; (iii) populações ecotípicas (totais para intradomicílio, peridomicílio e ruderal) e (iv) populações subdivididas por ecótopo e sub-localidades (Tabela 1).

Exceto para a população silvestre ( $D = -1,62$ ,  $P = 0,04$ ), nenhum valor significativamente diferente de zero, indicando possível desvio da neutralidade ( $P < 0,10$ ) foi revelado para nenhum dos sítios ( $D$  total =  $-1,28$ ). Entretanto, se a amostragem ruderal é analisada como um todo, verifica-se um valor de  $D$  de Tajima significativamente diferente de zero ( $D = -1,29$ ,  $P = 0,04$ ). Exceto para a população intradomiciliar em 'B1' ( $D = -1,43$ ,  $P = 0,08$ ), todos demais sítios intradomiciliares apresentaram valores de  $D$  positivos (total intradomiciliar de  $D = 1,15$ ). Os valores positivos foram notavelmente altos para populações intradomiciliares em ambas as sub-localidades em 'C' e para 'B2' ( $D = 1,56$ ,  $1,53$  e  $1,46$ ; para o total intradomiciliar em 'B2', 'C2' e 'C1'; respectivamente). Os altos valores negativos de  $D$  foram observados para populações ruderais em todos os níveis, alcançando de  $-0,23$  a  $-1,46$  para 'A2' e total ruderal para 'C', respectivamente (Tabela 3). Para o teste de  $F_u$ , também foram observados valores significantes de  $F_s$  para a amostragem silvestre e ruderal (amostragem total).

A amostragem total da localidade 'B' foi a única a apresentar um número de haplótipos significativamente maior do que o esperado, apontando para a heterogeneidade nesta população de acordo com o teste de Chakraborty.

A rede genealógica de haplótipos apresentou ramificações sutis, com um número máximo de sete passos mutacionais entre os haplótipos (Figura 10).

Os valores de  $\pi$  e  $\theta$  demonstraram uma escalascendo do intra, peri ao ambiente ruderal (analisados como um todo). O ambiente ruderal apresentou valores intermediários entre o peridomicílio e ambiente ruderal. Mas este primeiro apresentou a mais alta diversidade haplotípica observada tanto para o nível populacional, como para das amostragens como um todo.

Tabela 3. Populações ecotípicas, geográficas ou sítios, tamanho amostral (N) estimativas da variabilidade e testes de neutralidade para o fragmento do gene do citocromo B para coletas de *T. bras. brasiliensis* no estado da Paraíba.

	Popul# ou sítio	N	sítios polimó#	Al# obse#	Teste D de Tajima para neutralidade		Teste Fs de Fu para Neutralidade			Teste de Chakraborty para Neutralidade	
					$\pi/\theta$	D de Tajima	P	Fs	P	Al# Esp# (Chakraborty)	P (k <alelos)
Ecotípicas	‘I’ total	68	8	8	2,39/1,67	1,12	0,12	0,70	0,68	10,4	0,86
	‘P’ total	74	16	14	2,80/3,28	-0,43	0,12	-2,47	0,16	14,6	0,63
	‘R’ total	84	26	22	3,0/5,20	-1,29	<b>0,04</b>	-8,98	<b>0,00</b>	27,3	0,93
Geográ#	‘A’ total	83	14	11	2,40/2,80	-0,41	0,42	-0,97	0,39	16,1	0,96
	‘B’ total	84	19	14	2,94/3,79	-0,66	0,27	-1,91	0,25	9,1	<b>0,04</b>
	‘C’ total	59	21	16	2,76/4,51	-1,22	0,10	-4,98	0,03	16,8	0,65
Eco# Geo#	‘S’	37	20	16	2,47/4,79	-1,62	<b>0,04</b>	-8,33	<b>0,00</b>	17,1	0,71
Sítios	‘A1I’	16	7	5	2,25/2,10	0,25	0,65	0,63	0,66	5,8	0,78
	‘A1P’	11	5	5	1,81/1,70	0,25	0,63	-0,62	0,33	5,8	0,79
	‘A1R’	15	9	8	2,55/2,75	-0,29	0,42	-2,22	0,09	8,5	0,71
	‘A2I’	15	6	5	1,98/1,84	0,26	0,63	0,18	0,55	5,5	0,71
	‘A2P’	12	6	5	2,00/1,98	0,03	0,57	-0,22	0,44	5,4	0,72
	A2R’	14	9	8	2,65/2,83	-0,23	0,46	-2,33	0,06	9,2	0,84
	‘B1I’	11	2	2	0,36/0,68	-1,43	0,08	0,51	0,41	1,4	0,37
	‘B1P’	18	5	4	1,17/1,45	-0,60	0,31	0,25	0,54	2,4	0,15
	‘B1R’	16	11	8	2,73/3,31	-0,66	0,26	-1,78	0,12	8,4	0,68
	‘B2I’	11	5	3	2,40/1,70	1,56	0,95	2,66	0,93	3,9	0,85
	‘B2P’	14	9	4	3,16/2,83	0,45	0,73	2,52	0,88	3,3	0,42
	‘B2R’	14	15	7	4,19/4,71	-0,45	0,38	0,03	0,52	7,0	0,61
	‘C1I’	7	3	3	1,61/1,21	1,46	0,95	0,90	0,71	3,1	0,68
	‘C1P’	10	10	7	2,91/3,53	-0,78	0,25	-2,13	0,05	7,6	0,80
	‘C1R’	14	15	9	3,12/4,71	-1,38	0,13	-2,99	0,04*	7,6	0,30
	‘C2I’	8	6	3	3,07/2,30	1,53	0,94	2,60	0,90	3,3	0,75
	‘C2P’	9	6	4	2,22/2,20	0,03	0,52	0,62	0,66	4,7	0,82
	‘C2R’	11	6	6	1,67/2,04	-0,73	0,26	-2,04	0,04*	5,8	0,56
	‘A1IPi’	31	10	7	2,53/2,50	0,04	0,55	0,36	0,61	5,3	0,24
	‘A1Ri’	67	14	10	2,93/2,95	-0,02	0,87	0,17	0,59	13,7	0,92

A primeira letra (‘A’, ‘B’, ‘C’, ou ‘S’, veja Figura 5) refere à localidade. Os seguintes números à sub-localidade e a última letra ao ecótopo onde as amostras foram coletadas: ‘I’ = intradomiciliar; ‘P’ = peridomiciliar; ‘R’ = ruderal; e ‘S’ = silvestre. Valores de Tajima negativos foram sombreados. Valores significantes foram negritados. \*Segundo Fu (1997) somente valores de P abaixo 0,02 são considerados estatisticamente significantes.

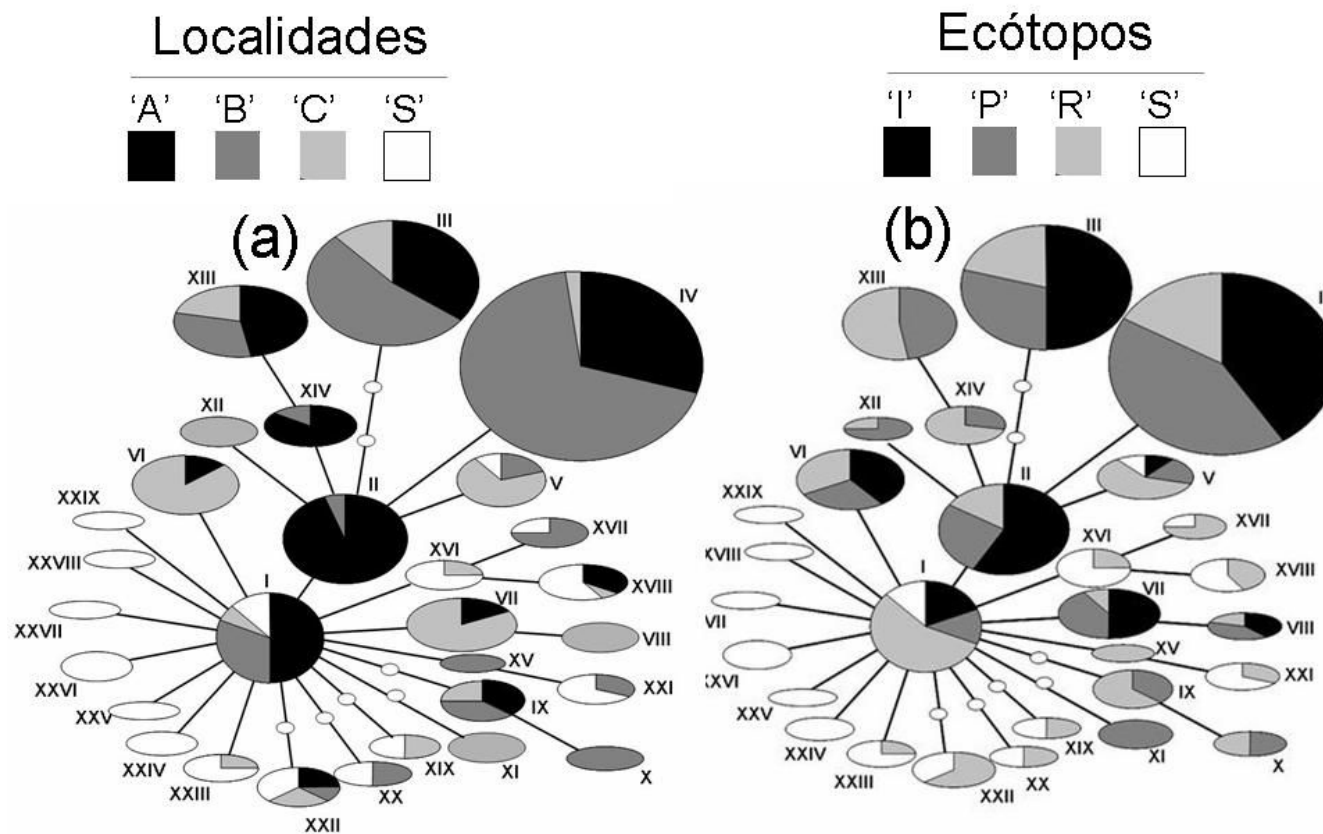


Figura 10. Rede genealógica de parcimônia máxima mostrando a relação entre os 29 haplótipos de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* baseado no gene mitocondrial do citocromo B. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de exemplares para cada haplótipo. A rede à esquerda (a) foi codificada em localidades e a rede à direita (b) em ecótopos. Para uma explicação sobre as localidades veja figura 5. Os ecótopos são intradomiciliar ('I'), peridomiciliar ('P'), ruderal ('R') e silvestre ('S').

#### 5.4. Estrutura genética

Trezentos e sessenta e um exemplares foram utilizados para examinar a estrutura genética eco-espaciotemporal. As 69 amostras coletadas nos domicílios foram representadas unicamente por oito haplótipos (haplótipos I a VIII). Todos estes haplótipos foram encontrados também no ambiente peridomiciliar e ruderal. Os haplótipos I a XIV foram encontrados em ambientes ruderais e peridomiciliares. Dentre estes, o haplótipo I foi encontrado em todos os ecótopos e habitats investigados. Vinte e três e 16 haplótipos foram revelados para o ambiente ruderal e silvestre, respectivamente.

Uma única amostra representada pelo haplótipo XV foi encontrada no ambiente ruderal de 'B1' e também em 'A1', embora simultaneamente à amostragem em curto período após as borrifações. A maioria dos haplótipos exclusivos para um determinado ecótopo foi observada para o ambiente silvestre: três amostras dos haplótipos XXIV e XXVI; duas amostras dos haplótipos XXVII e XXVIII; e dois os únicos *singletons* encontrados para os haplótipos XXV e XXIX.

O haplótipo IV foi o mais freqüente no intra e peridomicílio, representando 38 e 25%, respectivamente do total de amostras coletadas nestes ambientes (Figura 10).

Uma vez que os valores de FST entre o peridomicílio e intradomicílio das localidades indicaram pouca diferenciação (todos FSTs < 0,08 [exceto para 'C2I' vs. 'C2P', FST = 0,20] Tabela 4, Figura 11). Para aumentar a robustez dos resultados, o cálculo de FST foi repetido, combinando populações intra e peridomiciliares de cada sítio (Tabela 5). Este procedimento proporcionou maior consistência para as inferências sobre as invasões domiciliares a partir

de pontos ruderais e silvestres. Assim, uma árvore de *neighbor-joining* foi também construída com estes valores (Figura 12).

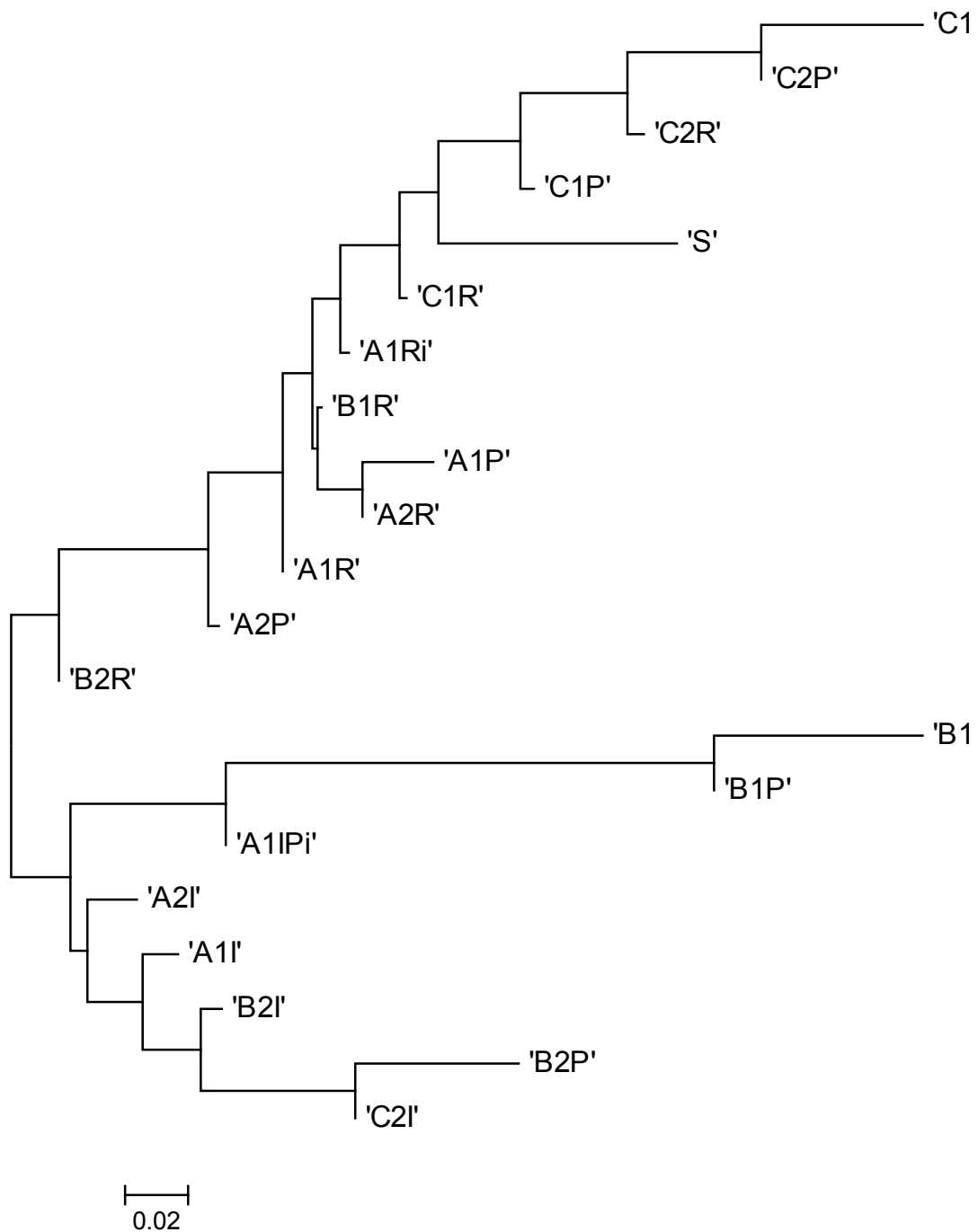
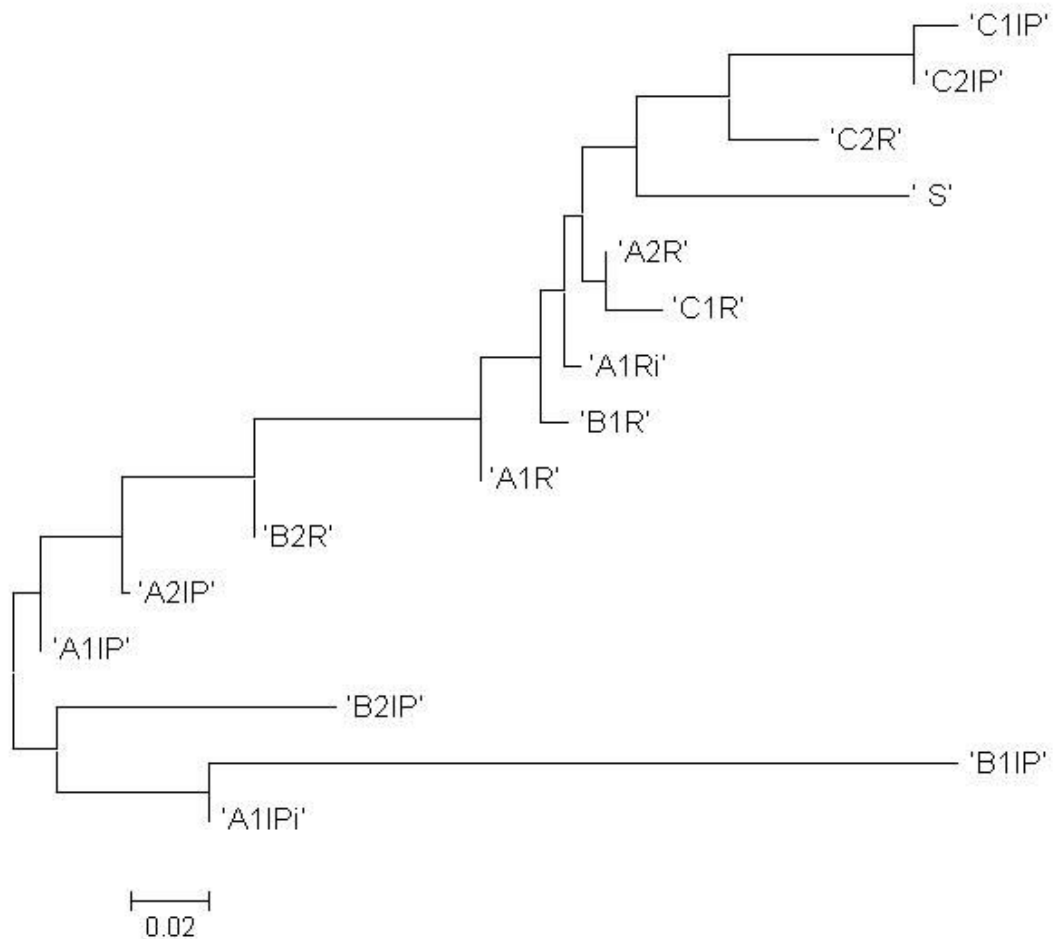


Figura 11. Árvore *neighbor-joining* de distâncias genéticas par-a-par linearizadas dos sítios populacionais de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*. Os pontos de coleta no estado da Paraíba, Brasil são mostrados na Figura 5. O sufixo 'I' e 'P' são referentes a populações coletadas em infestações bem estabelecidas no intradomicílio e peridomicílio, respectivamente. O sufixo 'R' refere-se à população coletada no ambiente ruderal e 'S' no silvestre. O Sufixo 'i' refere-se a populações coletadas dentro de um curto período após a borrifação.







**Figura 12.** Árvore *neighbor-joining* de distâncias genéticas par-a-par (FST) linearizadas de populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* agrupando amostras intra e peridomiciliares de uma mesma sub-localidade. Os pontos de coleta são mostrados na Figura 5 O sufixo 'IP' refere a populações coletadas em infestações bem estabelecidas no peri e intradomicílio, e 'R' refere-se ao ecótopo ruderal. O código 'S' refere-se à população silvestre. O Sufixo 'i' indica populações coletadas dentro de um curto período após a borrifação. Os valores obtidos para construção da árvore podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação de FST par-a-par para populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* domiciliares, ruderais e silvestres de quatro localidades coletadas no estado da Paraíba (veja Figura 5). Todos os valores, exceto os em negrito, foram significantes  $\alpha = 0,05$ . Populações sombreadas foram coletadas em um curto período após a borrifação com inseticida.

'A1IP'	'A1IP'													
'A2IP'	<b>-0,036</b>	'A2IP'												
'B1IP'	0,202	0,217	'B1IP'											
'B2IP'	0,098	0,106	0,372	'B2IP'										
'C1IP'	0,216	0,221	0,503	0,313	'C1IP'									
'C2IP'	0,112	0,113	0,439	0,170	<b>0,005</b>	'C2IP'								
'A1R'	<b>0,061</b>	<b>0,056</b>	0,385	0,190	0,112	<b>0,054</b>	'A1R'							
'A2R'	0,115	0,118	0,390	0,275	0,131	0,122	<b>-0,010</b>	'A2R'						
'B1R'	0,083	0,084	0,286	0,254	0,129	0,123	<b>0,012</b>	<b>-0,020</b>	'B1R'					
'B2R'	<b>0,046</b>	<b>0,050</b>	0,343	<b>0,014</b>	0,145	<b>0,046</b>	<b>0,041</b>	0,089	0,085	'B2R'				
'C1R'	0,119	0,120	0,387	0,253	0,083	0,090	<b>0,037</b>	<b>0,010</b>	<b>0,034</b>	0,085	'C1R'			
'C2R'	0,224	0,230	0,544	0,359	<b>0,057</b>	0,091	0,057	<b>0,057</b>	<b>0,055</b>	0,167	0,108	'C2R'		
'S'	0,271	0,265	0,474	0,380	0,156	0,177	0,071	0,072	0,108	0,195	0,101	0,096	'S'	
'A1IPi'	<b>0,019</b>	<b>0,024</b>	0,184	<b>0,034</b>	0,285	0,162	0,153	0,232	0,185	<b>0,061</b>	0,217	0,311	0,349	'A1IPi'
'A1Ri'	0,095	0,090	0,317	0,213	0,116	0,088	<b>0,017</b>	<b>0,008</b>	<b>0,022</b>	0,068	0,034	<b>0,057</b>	0,094	0,190

O primeiro caractere ('A', 'B' e 'C') seguido pelo número ('1' or '2') referem à vila. Os caracteres subseqüentes ao ecótopo: 'IP' = coletas de colônias bem estabelecidas do intra mais peridomicílio; 'R' = ruderal e 'S' = coletas silvestre. Sufixo 'i' (populações sombreadas) refere a coletas em um curto período (dentro de 0,5 to 1,2 anos) após a borrifação com inseticida.

### 5.5. Estrutura genética espacial e isolamento por distância

Quando o total das amostras de cada localidade é unificada por localidade, o mais baixo valor de FST foi de 0,02, observado entre as localidades 'A' e 'B', e o mais alto foi de 0,25, observado entre as localidades 'B' e 'S' (todos  $P < 0,02$ ).

As populações domiciliares dentro das sub-localidades de 'A' ('A1IP' vs. 'A2IP') não apresentaram diferenciação significativa ( $P > 0,05$ ). Dentro da localidade 'B', as populações domiciliares ('B1IP' e 'B2IP') apresentaram diferenciação significativa ( $FST = 0,37$ ,  $P < 0,0001$ ). Entretanto, as populações domiciliares da localidade 'B' foram significativamente relacionadas às populações domiciliares da localidade 'A'. Para 'B1IP', em especial, o mais baixo valor de FST foi significativo para populações domiciliares de 'A' ('A1IP' e 'A2IP', ambos  $FST < 0,22$ ,  $P < 0,0001$ ; Tabela 5).

Não foi possível traçar correlações entre as distâncias geográficas e genéticas entre as populações ruderais tanto em nível de localidade, quanto de sub-localidade. Apesar dos baixos valores de FST entre sítios domiciliares e ruderais dentro das sub-localidades (exceto para a sub-localidade 'B1'), também não foi possível estabelecer um padrão consistente para essa relação, considerando-se as distâncias geográficas, porque as populações domiciliares apresentaram-se, na maioria dos casos, mais associadas a populações domiciliares ou ruderais de outras sub-localidades (Tabela 5, Figura 12).

O sítio silvestre apresentou os mais altos valores de FST observados para todas as demais populações, sendo que a maior diferenciação foi observada entre o sítio silvestre e os sítios domiciliares, atingindo um valor de FST de 0,47 entre 'S' e 'B1IP' ( $P < 0,0001$ ).

Wright (1978) sugeriu que valores de FST acima de 0,15 indicam alta diferenciação. As diferenças par-a-par demonstraram uma amplitude significativa nos valores de FST (alcançando de 0,02 a 0,25; P entre 0,01 e < 0,0001, respectivamente) para variação entre o total da amostragem de cada uma das quatro localidades.

Uma vez que a estrutura genética indicou mais baixos valores de diferenciação entre populações ruderais, as análises para testar a hipótese de isolamento por distância foram também conduzidas excluindo-se as populações ruderais. Em ambas as escalas não houve correlação entre o FST e as distâncias geográficas. O teste de Mantel confirmou que as matrizes não apresentaram correlação, tampouco significâncias estatísticas ( $r = 26\%$  e  $33\%$ , respectivamente; para ambas  $P > 0,24$ ; Figura 13).

Quando as distâncias geográficas e genéticas foram confrontadas graficamente, utilizando a mesma abordagem para avaliação de IBD entre as localidades para as variáveis dentro das localidades também foi evidente uma ausência de correlação (Figuras 11 a 13). Na Figura 13 os losangos representam a correlação entre distâncias genéticas e geográficas entre as localidades, enquanto os círculos representam a mesma correlação dentro das localidades.

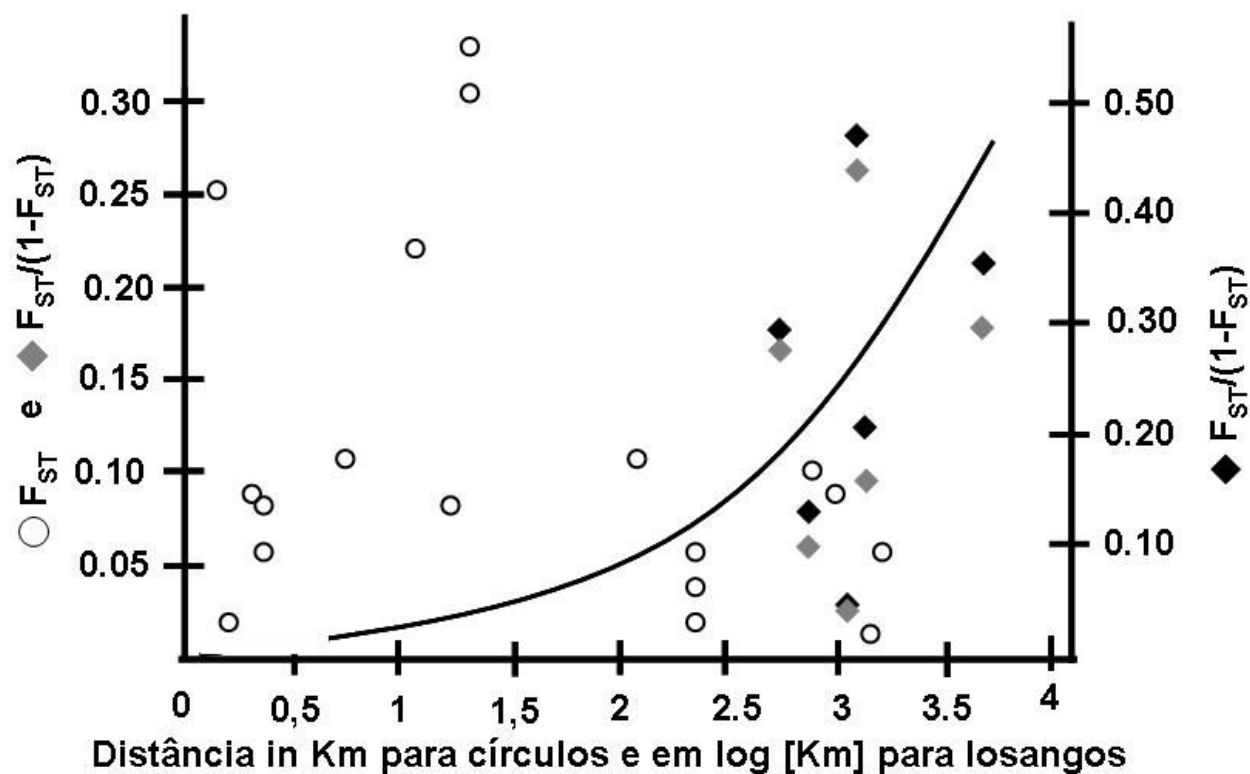


Figura 13. Cada ponto representa a diferenciação de um único par de populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* correlacionada com a distância (Euclídeana). O eixo à esquerda (diamantes cinza) indica os valores de  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  entre populações de cada localidade ('A', 'B', 'C' e 'S'; ver Figura 5). As mesmas populações domiciliares foram usadas pra obtenção dos valores de  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  indicados no eixo à direita, onde populações ruderais foram excluídas. Círculos representam os  $F_{ST}$  obtidos para sítios dentro das localidades confrontados com a distância em Km.

Além da ausência de correlação direta entre variáveis geográficas e genéticas, a AMOVA mostrou que quando as populações são agrupadas de acordo com a localização geográfica, o resultado é um maior percentual de variação dentro das localidades (14%;  $\Phi_{SC} = 0,15$ ,  $P < 0,0001$ ) do que entre elas (7%;  $\Phi_{CT} = 0,07$ ,  $P = 0,02$ ; Tabela 6.a).

### 5.6. Estrutura genética ecotípica

Os mais altos valores de FST observados entre o total das amostras separadas por ecótopos ('I', 'P', 'R' e 'S' como um todo) foram de 0,29 e 0,21, para 'I' vs. 'S' e 'P' vs. 'S', respectivamente (ambos  $P < 0,03$ ). Os valores de FST entre o total coletado para populações ecotípicas 'I' vs. 'P' (0,02), 'P' vs. 'R' (0,04) e 'R' vs. 'S' (0,08) foram mais baixos (todos  $P < 0,03$ ).

O único valor de FST acima de 0,1 entre populações ruderais foi observado para 'C2R' com 'B2R' e com 'C1R' (0,17 e 0,11,  $P = 0,009$  e  $0,01$ , ambos respectivamente), indicando que estas populações são pouco diferenciadas (Tabela 4 e 5). Entretanto, as populações ecotípicas domiciliares assumiram perfis genéticos particulares para cada sub-localidade (Figura 11 e 12).

Um padrão de variação similar ao agrupamento geográfico foi obtido quando as populações foram agrupadas por ecótopo para uma AMOVA, desconsiderando-se a localização geográfica. Ou seja, uma maior variação foi observada dentro dos grupos do que entre eles ( $\Phi_{SC} = 0,17$ ,  $P < 0,0001$ ;  $\Phi_{CT} = 0,04$ ,  $P = 0,07$ ; Tabela 6.b).

### 5.7. Estrutura genética considerando-se ambas as forças

As associações entre os sítios observados na Figura 11 e 12, onde ambas as forças (geográficas e ecotípicas) são visualizáveis, levaram a considerar que (i) populações sinantrópicas dentro de uma mesma localidade foram geneticamente associadas, (ii) as populações do ambiente ruderal não demonstraram diferenciação significativa, independentemente da distância geográfica, entretanto (iii) são diferenciadas da população silvestre. Desta forma, postulou-se a hipótese de que as populações provenientes do intra e peridomicílio apresentariam perfis genéticos particulares dentro de cada vila.

Assim, para um terceiro agrupamento para AMOVA foi levado em consideração o nível sinantrópico e a distribuição espacial das amostras domiciliares, agrupando os sítios de acordo com: (i) populações domiciliares (intra e peridomiciliares) de uma mesma vila, (ii) todas as populações ruderais, e (iii) a população silvestre.

A amostragem agrupada deste modo demonstrou que o percentual de variação dentro dos grupos caiu para 7% ( $\Phi_{SC} = 0,08$ ,  $P < 0,0001$ ) do total de variação, seguido por um aumento para 15% na magnitude da variação entre grupos ( $\Phi_{CT} = 0,16$ ,  $P < 0,0001$ ). O mais alto percentual de variação (77,7%,  $P < 0,0001$ ) foi significativo ( $P < 0,0001$ ) e alto aos 0,22 (Tabela 6.c), observado dentro das populações.

Tabela 6. Componentes de variação para AMOVA, percentagem de variação explicada em cada nível hierárquico espacial/ecotópico e índices de fixação para populações de *T. bras. brasiliensis* de acordo com (a) sítios agrupados de acordo com as localidades (Figura 5); (b) sítios agrupados de acordo com o ecótopo: intradomiciliar, peridomiciliar, ruderal e silvestre; e (c) agrupando sítios intradomiciliares e peridomiciliares de cada vila, todos os sítios ruderais e a população silvestre.

<b>(a)</b>						
Recurso de variação	d.f.	Componentes de Variação	Percentagem da Variação	Índices de Fixação	P	
Entre populações geográficas	3	0,10 Va	7.10	$\Phi_{CT} =$ 0,07	0,02 (PS)	
Entre sítios dentro das localidades	15	0,21 Vb	13.72	$\Phi_{SC} =$ 0,15	0,00	
Dentro dos sítios	2,5	1,19Vc	79.18			
Total	263	1.50 Vt		$\Phi_{ST} =$ 0,21	0,00	
<b>(b)</b>						
Recurso de variação	d.f.	Componentes de Variação	Percentagem da Variação	Índices de Fixação	P	
Entre populações ecotípicas	3	0,058 Va	3,87	$\Phi_{CT} =$ 0,04	0,09 (NS)	
Entre sítios dentro dos grupos ecotípicos	15	0,24 Vb	16,32	$\Phi_{SC} =$ 0,17	0,00	
Dentro dos sítios	245	1,19 Vc	79,77			
Total	263	1,49 Vt		$\Phi_{ST} =$ 0,20	0,00	
<b>(c)</b>						
Recurso de variação	d.f.	Componentes de Variação	Percentagem da Variação	Índices de Fixação	P	
Entre (i) sítios domiciliares de cada vila (ii) todas populações ruderais e (iii) a silvestre	7	0,24Va	15,54	$\Phi_{CT} =$ 0,16	0,00	
Entre sítios dentro dos grupos	11	0,10Vb	6,72	$\Phi_{SC} =$ 0,08	0,00	
Dentro dos sítios	244	1,18Vc	77,74			
Total	262	1,52Vt		$\Phi_{ST} =$ 0,22	0,00	
$\Phi_{CT} = Va/Vt$ ; $\Phi_{SC} = Vb/(Vb+Vc)$ ; $\Phi_{ST} = 1-(Vc/Vt)$ ; NS = não significante, PS = pouco significante						



### **5.8. Influência do fator temporal e das atividades de controle na estrutura genética de *T. bras. brasiliensis***

Devido ao baixo número amostral (31 de 'A1' do peridomicílio e domicílio) coletado em um curto período após as borrifações com inseticidas, as populações intra e peridomiciliares foram unificadas e foram denominadas 'A1IPi'.

Esta abordagem permitiu melhorar a robustez dos resultados. Dez exemplares apresentaram o haplótipo III. Quinze e dois insetos foram representados pelos haplótipos IV e VI, respectivamente. Um inseto de cada haplótipo I, VII, XI e XIII foram também coletados. O ambiente ruderal também foi amostrado neste mesmo período e ponto geográfico. Todas as amostras coletadas no ambiente ruderal simultaneamente à amostragem domiciliar em um curto período após as borrifações tiveram seus haplótipos representados novamente em coletas em de um longo período após as borrifações.

Os baixos valores de FST (todos abaixo de 0,07, P variando de 0,04 a 0,69) entre as populações ruderais (população 'A1Ri' vs. demais populações ruderais) coletadas nos dois (curto vs. longo) períodos após a borrifação com inseticidas indicaram pouca influência do fator temporal (cerca de 2,5 anos) na estrutura genética para no ambiente ruderal.

A população domiciliar coletada em um curto período após o tratamento com inseticidas ('A1IPi') exibiu altos valores de FST, que foram estatisticamente significantes com todas as populações ruderais e com a silvestre (FSTs variando de 0,16 a 0,35, todos  $P < 0,0001$ ). A população 'A1IPi' não demonstrou diferenciação significativa para as populações domiciliares de 'A' e para 'B2', demonstrando também o mais baixo valor de FST observado para 'B1IP' (0,18).

AMOVA mostrou que quando um grupo é composto pela população domiciliar coletada dentro de um curto período após a borrifação (população 'A1IPi'), com as populações domiciliares bem estabelecidas coletadas em um longo período após as borrifações, provenientes da localidade 'A' ('A1IP' e 'A2IP') e 'B' ('B1IP' e 'B2IP') e um segundo grupo é formado por todas as populações ruderais (incluindo 'A1Ri') e as populações domiciliares de 'C' ('C1IP' e 'C2IP'), 15% de variação entre estes dois grupos foi observado e unicamente 8% de variação entre populações dentro dos grupos foi evidenciado ( $\Phi_{CT} = 0,15$  e  $\Phi_{SC} = 0,09$ ; para ambos,  $P < 0,0001$ ). O  $\Phi_{ST}$  total foi de 0,22 ( $P < 0,0001$ ). A alta variação dentro das populações (78%) foi um resultado da alta diversidade haplotípica (bem como  $\pi$  e  $\theta$ ) observada especialmente para populações ruderais (Tabela 7).

Tabela 7: Componentes de variação para AMOVA, percentagem de variação explicada em cada nível hierárquico espacial/temporal e índices de fixação para populações de *T. bras. brasiliensis* agrupadas de acordo com sinais de recursos populacionais para infestações (provenientes de recursos domiciliares ou ruderais/silvestres)

Recurso de variação	d.f.	Componentes de Variação	Percentagem da Variação	Índices de Fixação	P
Entre grupos de populações apresentando indicadores de infestação a partir de focos domiciliares e grupos com perfil genético similar ao das populações ruderais	3	0,24 Va	14,65	$\Phi_{CT} = 0,15$	0,00
Entre populações dentro dos grupos	15	0,13 Vb	7,93	$\Phi_{SC} = 0,09$	0,00
Dentro das populações	245	1,27Vc	77,42		
Total	263	1,63 Vt		$\Phi_{ST} = 0,22$	0,00

$\Phi_{CT} = Va/Vt$ ;  $\Phi_{SC} = Vb/(Vb+Vc)$ ;  $\Phi_{ST} = 1-(Vc/Vt)$

## 6. Discussão

Neste trabalho são apresentadas indicações de que na área estudada *T. bras. brasiliensis* apresenta uma estrutura genética ecológica e em uma pequena escala geográfica. Evidências filoecológicas sugerem fragmentação populacional para o ambiente silvestre. Uma análise eco-espaciotemporal, direcionada à detecção da influência das atividades de controle na estrutura genética de *T. bras. brasiliensis* comparou a variação genética de populações coletadas em diferentes períodos após a borrifação com inseticidas. As reinfestações após o tratamento químico domiciliar foram compostas por populações distintas, indicando recursos variáveis de ambos os ambientes ruderais e domiciliares.

### 6.1. Eco-epidemiologia de *T. bras. brasiliensis*

Na caatinga, as atividades humanas, como as queimadas, o corte de madeira para lenha, a caça de animais e a contínua remoção da vegetação para a criação de bovinos e caprinos têm levado ao empobrecimento ambiental, especialmente da fauna de animais silvestre (IBAMA 2007, Leal et al. 2005). Costa et al. (2003a) demonstraram que a distribuição geográfica de *T. brasiliensis* sobrepõe quase toda a área fisiogeográfica da caatinga, mostrando uma estreita associação desta espécie com este ecossistema.

Os ambientes não habitados foram classificados como ruderais e silvestres, através de observações sobre o grau de alteração ambiental. Classicamente (ex: Schofield et al. 1999), assume-se que as alterações ambientais provocam empobrecimento da fauna nativa e assim os triatomíneos invadem os domicílios a procura de recursos alimentares. No entanto, foram observadas colônias abundantes no ambiente ruderal. Um perfil similar foi

observado por Borges et al. (2005) e Diotaiuti et al. (2000), que utilizaram o somente o termo “*sylvatic*” para definição de ambientes não habitados. As observações de colônias ruderais abundantes não vão de encontro com o conceito clássico de que as alterações ambientais não são favoráveis para as populações “silvestres” de *T. bras. brasiliensis*.

Neste trabalho, optou-se pelo termo ruderal para referendar os ambientes que apresentam maior influência antrópica, perdendo características silvestres, como mencionado por Leal et al. (2005). Assim, o termo silvestre foi usado somente para a área mais preservada.

Forattini et al. (1971a), desenvolveu um experimento, onde construiu e monitorou ambientes artificiais, os quais tiveram a vegetação intencionalmente alterada em seu entorno. Estes autores verificaram a rápida instalação e aumento na densidade populacional de *T. sordida* nos novos ambientes. Forattini et al. (1971b) concluíram, que para *T. sordida*, parece que o ambiente inalterado induz o equilíbrio populacional desta espécie, onde ela encontra barreiras para o aumento na densidade populacional, como a presença de predadores e as limitações quanto à oferta de alimento e abrigo. Assim, estes autores sugeriram que os ambientes alterados, apresentam carência de predadores naturais e são ricos em fonte alimentares (animais domesticados) e abrigo.

Neste trabalho observou-se que as populações que colonizam os domicílios apresentam maior identidade genética com a população ruderal do que com a população silvestre. Estudos recentes para *T. infestans* sugerem que o baixo status nutricional não é fator significativo para desencadear a atividade do vôo (Gurevitz et al. 2006, 2007) e talvez também não seja também o principal fator envolvido na invasão domiciliar através do vôo. Uma vez que

numerosas colônias foram observadas no ambiente ruderal e, que populações provenientes deste ambiente apresentaram maior identidade genética com as populações domiciliares, sugere-se que o ambiente ruderal favoreça o aumento da densidade populacional de *T. bras. brasiliensis* e, conseqüentemente, as invasões e colonizações domiciliares. Desta forma as invasões domiciliares poderiam não ser primariamente estimuladas pela escassez alimentar, mas talvez por outros fatores, como por exemplo, a densidade.

## 6.2. Análises dos haplótipos

Os resultados obtidos confirmam estudos prévios (Monteiro et al. 2004) sobre a aplicabilidade de dados de seqüências do citocromo B para estudos sobre a genética populacional de *T. bras. brasiliensis*. Ao longo de uma distribuição geográfica muito mais ampla, abrangendo os estados de Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Piauí, Monteiro et al. (2004) encontraram 24 haplótipos para a subespécie aqui estudada. Este estudo evidenciou somente 14 haplótipos no ambiente domiciliar. Destes, seis foram compartilhados com os já descritos por Monteiro et al. (2004). Uma vez que o tamanho amostral para áreas silvestres e ruderais foi ampliado neste trabalho (n=151), um maior número de haplótipos (n= 29) foi encontrado para *T. bras. brasiliensis*, porém em uma área geográfica mais restrita.

Baseado em abordagens de modelagem ecológica, com a utilização de algoritmos genéticos para modelagem ambiental (GARP, Costa et al. 2002) e filogeográficas (NCPA- *Nested Clade Phylogeographic Analises*) foi sugerido que três dos morfotipos registrados para o “complexo brasiliensis” foram um resultado de fragmentação e expansão populacional ocorrida no passado a

partir da área de distribuição da subespécie aqui estudada (*T. bras. brasiliensis*).

A estimativa da genealogia de genes utilizando a *network* proposta por Clement et al. (2000), evidenciou neste trabalho o mesmo haplótipo central registrado por Monteiro et al. (2004), que também foi caracterizado por poucos passos mutacionais entre os demais haplótipos da subespécie *T. bras. brasiliensis*. Este haplótipo central teve forte suporte como ancestral, tanto por sua posição central na rede genealógica, quanto por sua representação em uma significativa proporção nas populações geográficas, bem como ecótípicas.

A mais alta diversidade haplotípica registrada para *T. infestans* através deste mesmo fragmento genético de foi 0,67. (Giordano et al.2005). Neste trabalho foram registrados valores de diversidades haplotípicas que atingiram 0,93, 0,92, 0,93 e 0,78 para as populações silvestres, ruderais, peridomiciliares e domiciliares, respectivamente. Isto pode ser considerado significativo em termos de controle vetorial, uma vez que a variabilidade genética tem sido associada com a maior dificuldade para o controle desses insetos (Schofield et al. 1999, Giordano et al.2005 e Peres de Rojas et al. 2007).

### **6.3. Desvio da neutralidade e demografia**

A base dos testes de neutralidade é que, sob um modelo neutro, a variabilidade e o tamanho populacional devem apresentar uma correlação assumida através de modelos populacionais conhecidos. Assim, os métodos que possibilitam inferências sobre os processos que afetam as populações naturais fornecem informações para interpretação dos resultados (Amos e Harwood 1998).

O teste de Tajima (Tajima 1989a) determina se a frequência alélica ajusta-se à expectativa de um modelo neutro. Assim, a média obtida para o  $D$  de Tajima deve se aproximar do zero. Quando os alelos raros contribuem mais para o número de sítios segregantes do que o número de diferenças par-a-par, os valores  $D$  de Tajima tornam-se negativos, refletindo um número de polimorfismos pouco freqüentes. Os valores para a estatística  $D$  de Tajima foram significativamente diferentes de zero para a população silvestre ( $D = -1,62$ ,  $P = 0,04$ ) e para a população ruderal, se considerada como um todo ( $D = -1,29$ ,  $P = 0,04$ ), sugerindo a atuação de forças seletivas ou expansão populacional, pressionando o espectro de polimorfismos para um excesso de variantes raras. Para determinar se o excesso de variantes raras foi causado por *singletons*, o teste de Fu foi usado e o resultado foi também estatisticamente significativo ( $P < 001$ ) com valores altos e negativos para a população ruderal como um todo e para a silvestre, indicando que a expansão populacional foi, provavelmente, o evento responsável pela significância dos valores de  $D$  observados.

Para outras espécies em que a expansão populacional foi assumida, os valores do  $D$  de Tajima alcançaram de 0,04 a -2,1 para *Drosophila pseudoobscura* (Hamblin e Aquadro 1999, Schaeffer 2002) e 0,25 a -2,3 em humanos. (Bonatto e Salzano 1997, Hammer et al. 2003). Ressalta-se também que segundo Grant e Bowen (1998) um padrão de alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica geralmente é resultado de expansão populacional. Segundo estes mesmos autores, a baixa variabilidade nucleotídica pode ser atribuída à recente coalescência, enquanto a alta diversidade haplotípica pode ser explicada pela retenção de mutações em uma rápida expansão populacional. Um estudo de eventos demográficos para o



carrapato *Amblyomma americanum* (onde também foi assumida a hipótese de expansão demográfica) demonstrou um perfil semelhante ao aqui observado para as populações ruderais e silvestres: valores  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu negativos, significativamente elevados e (Mixson et al. 2006).

Através de NCPA (*Nested Clade Phylogeographic Analysis*) Monteiro et al. (2004) já haviam mencionado que os demais morfotipos do “complexo brasiliensis” poderiam ter sido originados a partir de expansão demográfica ocorridas no passado na área de distribuição geográfica da subespécie aqui estudada, talvez após um evento de gargalo de garrafa.

Sob um modelo de alelos infinitos, o teste de Chakraborty (1990) aponta se o número de alelos em uma amostragem (possivelmente) heterogênea (resultante de combinações de populações previamente isoladas) é maior do que o número de alelos esperados em amostragem neutra homogênea. A amostragem total da localidade ‘B’ foi a única a demonstrar um número de haplótipos significativamente maior do que o esperado. É interessante observar para localidade ‘B’ foram observados os perfis de frequência haplotípica mais diferenciados entre diferentes populações ecotípicas dentro de uma mesma localidade, resultando em um  $F_{ST}$  de 0,37 entre ‘B1IP’ e ‘B2IP’, portanto, a hipótese de heterogeneidade populacional neutra deve ser considerada.

#### **6.4. Estrutura genética**

O DNA mitocondrial é um marcador sensível a subdivisões populacionais especialmente devido ao padrão de herança materna. Se uma população apresenta alguma estruturação espacial ou ecológica, as mensurações de variabilidade genética são, em geral, facilmente detectáveis (e muitas vezes exacerbadas) com o uso deste marcador (Wilson et al. 1985). A

capacidade de dispersão ativa dos triatomíneos é outro fator que poderia atuar positivamente na fragmentação populacional, pois triatomíneos não são bons voadores. *Triatoma brasiliensis* é filogeneticamente relacionado a *T. infestans* (Hypsa et al. 2002), que pode voar por um raio de cerca de 1,5 a 2 km (Schweigmann et al. 1988), de seu recurso original.

As localidades amostradas neste trabalho encontram-se distanciadas por 16 a 40 km. Dentro das localidades, os sítios domiciliares das sub-localidades foram distanciados por 0,8 a 2 km. Três diferentes sítios ecotípicos puderam ser amostrados para cada uma das seis sub-localidades (n = 18 sítios). Um quarto ambiente, que apresentou características ecológicas diferenciadas (mais preservado) foi também amostrado (silvestre). Assume-se que a capacidade de dispersão ativa de *T. bras. brasiliensis* seja suficiente para alcançar os diferentes sítios ecotípicos dentro das localidades, com maior grau de possibilidade de dispersão entre sítios dentro das sub-localidades. Porém, o mesmo pressuposto não pode ser aplicado para o alcance entre as localidades, que se encontraram além da capacidade de voo estimada para triatomíneos.

#### **6.4.1. Isolamento por distância e estrutura genética espacial**

Quando toda amostragem de cada localidade foi reunida para formar uma população por localidade, o FST entre as populações geográficas apresentou valores significantes que atingiram 0,25 entre 'B' e 'S'. Em geral, os sítios ruderais apresentaram valores de FST baixos e não significantes entre eles, ao passo que populações domiciliares apresentaram valores de FST significativamente mais altos entre elas. Contudo, tanto o teste de Mantel quanto a distância Euclideana evidenciaram que a diferenciação genética

observada entre as populações geográficas das quatro localidades não têm correlação com a distância física, mesmo excluindo-se a amostragem ruderal.

As populações domiciliares dentro das localidades não apresentaram diferenciação significativa para as localidades 'A' e 'C', mas dentro da localidade 'B' (FST = 0,37) foi observada diferenciação significativa. Esta observação é facilmente detectável através dos ramos mais longos dos elementos topológicos de ambas as árvores *neighbor-joining*, observados para as populações domiciliares de 'B'.

A mesma abordagem para detectar a diferenciação entre localidades foi aplicada dentro das localidades, correlacionando-se distâncias geográficas e genéticas entre os sítios domiciliares e ruderais dentro de cada uma das localidades 'A', 'B' e 'C', através da distância Euclideanas e teste de Mantel. Estes testes também não evidenciaram correlação entre as duas variáveis.

Segundo Wright (1978), valores de FST acima de 0,15 indicam grande diferenciação. Apesar da carência de correlação direta entre as distâncias físicas e genéticas, admite-se que a força geográfica tenha apresentado importante papel na diferenciação populacional, uma vez todos os valores de FST foram superiores a 0,17 entre as populações domiciliares de 'B' e 'C'.

Os coeficientes de diferenciação para os sítios ruderais não possibilitaram (exceto para 'C2R') detectar diferenciação significativa dentro ou entre localidades. Entretanto, o sítio silvestre apresentou os mais altos valores de FST observados para todas as demais populações. A mais destacada diferenciação observada para o sítio silvestre ('S') foi para o sítio domiciliar de 'B1', com um valor de FST de 0,47 ('B1IP' vs. 'S'). A mais baixa diferenciação para 'S' foi revelada para as populações ruderais de 'A', que apresentaram também uma maior proximidade física de 'S'. Desta forma, a hipótese de que a

diferenciação da população proveniente do ambiente silvestre tenha sido mediada pela distância física deve ser também considerada.

#### **6.4.2. Estrutura genética ecológica**

Todos os haplótipos encontrados no intradomicílio foram também observados nos ambientes peridomiciliar e ruderal, enfatizando o papel apresentado pelo ambiente ruderal como fonte de populações invasoras. Uma relação inversa não foi observada. Em geral, a diversidade haplotípica assumiu um padrão ascendente do intradomicílio ao ruderal, passando pelo peridomicílio com diversidade intermediária. Os ambientes peridomiciliares usualmente não apresentam luzes artificiais que podem atrair insetos. Por outro lado, além da proximidade do ambiente ruderal, fatores ambientais podem reduzir o período de efeito residual do inseticida (Rojas-De-Arias 2001).

Foi observado que populações peridomiciliares e intradomiciliares apresentaram-se geneticamente relacionadas dentro da mesma localidade (todos  $F_{ST} < 0,15$ ). Resultados similares foram obtidos para *T. dimidiata*, que também ocorre em ambientes silvestres e domiciliares na península de Yucatan no México (Dumonteil et al. 2007).

Ao longo da área de estudo, a estrutura genética foi significativamente associada com populações sinantrópicas dentro das localidades. Entretanto, as populações domiciliares das localidades 'C' foram significativamente relacionadas com a ruderal dentro da mesma sub-localidade (ambos  $F_{ST}$ s  $< 0,09$  e  $P < 0001$ ). A população domiciliar de uma localidade ('B1') demonstrou diferenciação significativa para todas as outras populações, onde o mais baixo valor de  $F_{ST}$  foi de 0,20. Este valor mencionado (0,20) foi observado para a população domiciliar de 'A1IP' e um valor sutilmente mais elevado foi

observado para a outra população domiciliar de 'A' ('A2IP',  $F_{ST} = 0,22$ ), distanciadas por 23 km. A diferenciação observada para 'B1IP' foi um resultado da baixa diversidade genética apresentada para esta população, na qual um haplótipo representou 48% do total amostrado. Esta baixa diversidade ( $H_d < 0,40$ ) sugere rápida expansão populacional após um efeito do fundador ou de gargalo de garrafa nesta população. De fato, estes dados corroboram a suposição de que eventos de gargalo de garrafa possam resultar em deriva genética, como foi sugerido para *T. infestans* na Argentina (Perez de Rosas et al. 2007), talvez pelo empobrecimento do *pool* genético também para sítios domiciliares adjacentes.

Usando armadilhas luminosas, Carbajal de la Fuente et al. (2007) estimaram que aproximadamente um exemplar de *T. bras. brasiliensis* pode chegar ao domicílio atraído por luzes artificiais a cada dois dias na mesma área fisiogeográfica aqui estudada (a Caatinga). A localidade 'A' mostrou a mais alta diversidade haplotípica ( $H_d > 0,77$ ) para ambientes domiciliares. É sabido que níveis iniciais de diversidade genética podem influenciar na probabilidade que uma população terá para obter sucesso, uma vez que a diversidade genética está diretamente associada ao vigor populacional e susceptibilidade a adversidades (Hedrick 1999, Reed e Frankham 1993, Briskie 2004).

Os dados obtidos sugerem que a limitada capacidade de vôo (Schweigmann et al. 1988) dos triatomíneos não tenha influenciado no fluxo gênico entre populações ruderais. Este possível intercâmbio genético pode ser explicado por observações de campo. Primeiro porque, exceto pela distância física, nenhuma barreira natural para o fluxo gênico foi observada. Segundo, porque as populações ruderais não estão sujeitas a drásticos eventos de gargalo de garrafa, como o tratamento por inseticidas direcionados ao controle

vetorial. Um padrão panmítico similar tem sido postulado para populações silvestres de *T. sordida* (Noireau et al. 1999a,b).

A correlação entre distância genética e geográfica pode também ser utilizada para avaliar a diferenciação ecotípica, já que os sítios ruderais e domiciliares dentro de cada sub-localidade estão mais fisicamente associados do que os sítios das sub-localidades vizinhas. Entretanto, as distâncias Euclidianas (Figura 16) e o teste de Mantel rejeitaram a hipótese de correlação entre as variáveis geográficas e genéticas também dentro das localidades. Apesar da carência da correlação entre as duas variáveis, as populações domiciliares, no geral, assumiram perfis diferenciados das ruderais e silvestre, sugerindo que forças ecológicas influenciem mais na diferenciação do que a distância geográfica.

#### **6.4.3. Análise de Variância Molecular para definição das forças ecológicas e espaciais envolvidas na estruturação genética de *T. bras. brasiliensis***

As hipóteses de que todas as populações dentro da área estudada apresentam uma estruturação genética, considerando somente uma das forças (ecotípica ou geográfica) foram rejeitadas pelas AMOVAs porque ambos os agrupamentos demonstraram maior variação entre populações dentro dos grupos do que entre os grupos.

Quando as sugestões de um padrão panmítico para as populações ruderais foram consideradas, todas as populações ruderais foram inseridas em um mesmo grupo. Uma vez que a população silvestre apresentou-se diferenciada, mesmo da ruderal (porém em menor escala), um segundo grupo foi formado unicamente por esta população. Em seguida, foi considerada a

força geográfica, pois as populações domiciliares apresentaram diferenciação em diferentes escalas.

Quando (i) os sítios peridomiciliares e intradomiciliares de cada vila foram organizados em um mesmo grupo, (ii) um outro grupo foi formado pelas populações ruderais, e (iii) um último pela silvestre, um padrão inverso ao observado nas demais AMOVAs foi observado. Neste novo agrupamento o percentual de diferenciação entre os grupos foi mais do que o dobro do observado entre populações dentro dos grupos (Tabela 6.c).

Com relação às áreas inabitadas (ruderais e silvestres) este último agrupamento para uma AMOVA reforçou a sugestão de que populações ruderais não apresentam diferenciação significativa entre elas, mas são diferenciadas da população silvestre. Estes resultados reforçaram também a sugestão de perfis genéticos independentes para populações domiciliares (intra e peridomiciliares) dentro de cada sub-localidade. Entretanto, as distâncias Euclidianas e teste de Mantel, indicaram que as diferenciações observadas para populações domiciliares não apresentam correlação direta com a distância geográfica.

Assim, este último agrupamento evidenciou que ambas as forças ecológicas e geográficas estão envolvidas na distribuição da variabilidade genética de *T. brasiliensis* e definiu o papel de cada uma delas.

#### **6.4.4. Influência do fator temporal na estrutura genética eco-espacial de *T. bras. brasiliensis***

Na primeira etapa do estudo acima discutido, as análises utilizando populações provenientes de infestações domiciliares bem reestabelecidas, quando comparadas com populações ruderais, forneceram importantes informações sobre a estrutura genética de *T. bras. brasiliensis* em um contexto

eco-espacial, indicando (i) um padrão panmítico para populações provenientes de sítios ruderais, (ii) a afinidade genética entre populações domiciliares de duas localidades ('A' e 'B'), onde (iii) uma destas populações domiciliares ('B1IP') apresentou baixa diversidade. Esta população ('B1IP') também apresentou (iii) a mais destacada diferenciação das populações ruderais; e (iv) um terceiro grupo de populações domiciliares ('C1IP' e 'C2IP') foi significativamente associada às populações ruderais adjacentes.

Assim, nesta etapa do estudo, investigou-se a variação apresentada pela população domiciliar coletada em um curto período após a borrifação, possivelmente em processo de estabelecimento da infestação ('A1IPi'). A população domiciliar ('B1IP'), que demonstrou altos valores de FST para todas as demais, exibiu o mais baixo valor de FST para 'A1IPi'. Assumindo que as localidades 'A' e 'B' estão além do alcance de vôo de *T. bras. brasiliensis*, descarta-se a possibilidade de dispersão ativa de 'A' para fundar a população 'B'. Entretanto, no caso de que estas duas populações tenham tido origem relacionadas, assume-se a possibilidade de atuação de focos em sítios intermediários entre 'A' e 'B' (ou a ocorrência de dispersão passiva). Assume-se também que o perfil genético tenha sido mantido somente para 'B1IP', uma vez que todas as demais populações domiciliares coletadas em um longo período após a borrifação não tenham exibido significativa associação com 'A1IPi'.

AMOVA indicou que as populações domiciliares de 'A' e 'B' coletadas em um longo período após a borrifação puderam formar um grupo consistente com a população coletada em um curto período após a borrifação. Desta forma, quando os resultados são analisados como um todo, a sugestão de conexões genéticas (talvez por focos residuais não eliminados), entre 'A' e 'B'



antes do tratamento químico domiciliar é reforçada. Análises do gene ribossomal 12 e 16 S em diferentes populações naturais de *T. infestans* na Argentina sugeriram que a recuperação de populações tratadas por inseticidas em algumas localidades foram proporcionadas por sobreviventes da mesma área. Devido à alta variabilidade genética observada para as populações domiciliares de 'A' em um longo período após as borrifações e à detecção do foco positivo em 'A' em um curto período após a borrifação, esta localidade pode ter desempenhado um importante papel como recurso de fundadores para outras populações domiciliares vizinhas. Ressalta-se que, segundo Schofileld et al. (1999), a dispersão de triatomíneos entre domicílios pode ser um resultado (ou aumentar o potencial) de especialização aos domicílios neste grupo de insetos.

### **6.5. Implicações no controle vetorial**

A combinação de distintos padrões de estrutura genética geográfica e ecológica representa um cenário complexo para o desenvolvimento das atividades de controle. Este perfil já foi sugerido para *T. dimidiata*, um triatomíneo autóctone no México, onde existem sugestões que esta espécie alterna estes padrões para evadir às campanhas de controle (Dumonteil et al. 2002, 2004, 2007; Zeledon 2006). O conjunto de dados aqui obtidos sugerem que as invasões e colonizações domiciliares demonstram padrões muito distintos de acordo com a localidade.

As similaridades entre as localidades 'A' e 'B', reveladas pela estrutura genética eco-espaciotemporal, indicam que após um longo período sem controle vetorial, populações persistentes podem dispersar para áreas ainda não infestadas. Estas similaridades ainda sugerem que infestações precoces

carregam a identidade genética de populações persistentes às atividades de controle e, possivelmente, são capazes de dispersar para infestar domicílios adjacentes.

As populações provenientes do ambiente ruderal apresentaram maior identidade genética com populações domiciliares do que a população silvestre, onde o ambiente foi menos alterado. Assim, o ambiente ruderal representa um mantenedor em potencial de *foci* para reinfestações e as alterações ambientais parecem favorecer o processo de invasão domiciliar de populações provenientes de sítios ruderais.

Uma revisão histórica na epidemiologia da doença de Chagas no nordeste do Brasil indica que dois dos mais importantes vetores da doença de Chagas (*T. infestans* e *P. mesgistus*) se tornaram vulneráveis às campanhas de controle após a instalação do evento de especialização a ecótopos domiciliares (Dias et al. 2000). Também existem indicações de que esta especialização tenha permitido a dispersão para novas áreas geográficas habitadas pelo homem. No “complexo brasiliensis” *T. bras. brasiliensis* é a sub-espécie que apresenta a maior amplitude em sua distribuição geográfica. Entretanto, demonstra forte persistência às medidas de controle. Assim, as modernas técnicas moleculares podem ser ferramentas úteis para a melhoria das atividades de controle, monitoramento vetorial e elucidação dos eventos relacionados à epidemiologia da doença de Chagas.

## 7. Conclusões

- O marcador utilizado (gene citocromo b do mtDNA) demonstrou resolução suficiente para estudos sobre o fluxo gênico de *T. bras. brasiliensis* entre ecótopos;
- A alta diversidade genética possivelmente está envolvida na dificuldade de eliminação de *T. bras. brasiliensis* nos domicílios;
- O padrão de diversificação de *T. bras. brasiliensis* é compatível com o padrão esperado para uma espécie em expansão demográfica;
- Ambas as forças geográficas e ecológicas estão envolvidas na estruturação genética de *Triatoma bras. brasiliensis*.
- A estruturação genética geográfica foi consistente para as populações domiciliares de cada vila, mas a diferenciação genética não apresenta correlação linear com a distância geográfica;
- Sugere-se que o ambiente peridomiciliar atue intermediando o fluxo de dispersão do ambiente ruderal para o intradomiciliar;
- As populações ruderais não se apresentam significativamente diferenciadas e o ambiente ruderal é capaz de manter as populações que colonizam os domicílios;
- Populações possivelmente persistentes às atividades de controle atuaram nos processos de reinfestação domiciliar para alguns sítios;
- A população silvestre foi diferenciada da população ruderal e, em maior grau, das populações domiciliares;

## **8. SUGESTÕES**

Eventos de gargalo de garrafa e do fundador são tópicos importantes no entendimento de processos históricos e contemporâneos de populações naturais. No que se refere aos estudos de insetos vetores, estudos detalhados destes eventos podem evidenciar tanto os fundadores de uma infestação, quanto podem avaliar a eficiência das atividades de controle. Entretanto, tais estudos demandariam uma amostragem mais ampla em diferentes “momentos” das atividades de controle.

O uso de um marcador co-dominante altamente polimórfico (ex: microsátélites) complementaria esses resultados através da avaliação comparativa dos índices de heterozigoze, os quais são importantes indicadores de eventos de gargalo de garrafa (Perez de Rosas et al. 2007).

As populações ruderais e silvestres foram significativamente diferenciadas, entretanto estudos ecológicos e uma maior amostragem em áreas intermediárias seriam necessários para avaliar o papel das forças ecotípicas e geográficas na variação observada.

## 9. ARTIGO DA TESE ACEITO

- 9.1. Inferring from Cyt b gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil

## **10. ARTIGOS CORRELATOS ACEITOS E PUBLICADOS**

- 10.1. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999**

**10.2. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae)**

**10.3. Genetic *Population* Structure of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different Molecular Markers**



**10.4. First Record of *Megaselia scalaris* (Loew) (Diptera: Phoridae) Infesting Laboratory Colonies of *Triatoma brasiliensis* (Triatonaе: Hemiptera: Reduviidae)**

- 10.5. A *Triatoma maculata* (Hemiptera- Reduviidae- Triatominae) population from Roraima, Amazon Region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector**

**10.6. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs**

**10.7. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae)**

**10.8. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: Patterns of Feeding and Defecation, and Resistance to Starvation**

## 11. Referências Bibliográficas

- ABAD-FRANCH F, MONTEIRO FA 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc* 77: 437-454.
- ACEVEDO F, GODOY E, SCHOFIELD CJ 2000 Comparison of intervention strategies for control of *Triatoma dimidiata* in Nicaragua. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 867-871.
- ACTIS AS, TRAVERSA OC, CARCAVALHO RU 1964. Estudios taxonómicos sobre el genero *Triatoma laporte* mediante la electrophoresis de la linfa. *An Esc Nac Ciencias Biol* 13: 97-106.
- ALMEIDA CE, DUARTE R, DO NASCIMENTO RG, PACHECO RS, COSTA J 2002a. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: Trophic resources and ecological observations of five populations collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1127-1131.
- ALMEIDA CE, FOLLY-RAMOS E, AGAPITO-SOUZA R, MAGNO-ESPERANCA G, PACHECO RS, COSTA J 2005. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) IV: Bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 231-235.
- ALMEIDA CE, FRANCISCHETTI CN, PACHECO RS, COSTA J 2003. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 367-371.
- ALMEIDA CE, PACHECO RS, NOIREAU F, COSTA J 2002b *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: isoenzymatic and

chromatic patterns of five populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 829-34.

ALMEIDA CE, VINHAES MC, DE ALMEIDA JR, SILVEIRA AC, COSTA J 2000. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 95: 761-768. ]

AMORIM SA 1997. *Elementos básicos da sistemática filogenética*. 2ª ed. Ribeirão Preto: Holos, Editora e Sociedade Brasileira de Entomologia. 276p.

AMOS W, HARWOOD J 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philos Trans R Soc Lond* 353: 177-186.

ARAGÃO MB 1983. Domiciliação de Triatomíneos ou pré-adaptação a antropofilia e à ornitofilia?. *Rev Saúde Pública* 17: 51-55.

ARAÚJO CA, WANIEK PJ, STOCK P, MAYER C, JANSEN AM, SCHAUB GA 2006. Sequence characterization and expression patterns of defensin and lysozyme encoding genes from the gut of the reduviid bug *Triatoma brasiliensis*. *Insect Biochem. Mol Biol* 36: 547-560.

AUFDERHEIDE AC, SALO W, MADDEN M, STREITZ J, BUIKSTRA J, GUHL F, ARRIAZA B, RENIER C, WITTMERS LE, FORNACIARI G, ALLISON M. 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 2034-2039.

AVISE JC 1975. Systematic value of electrophoretic data. *Syst Zool* 23: 465-481.

AVISE JC 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, 511 pp.

- AVISE JC 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- AVISE JC 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Second edition, Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.
- AVISE JC, NEIGEL JE, ARNOLD J 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J Mol Evol* 20: 99-105.
- BALLARD JWO, KREITMAN M 1995. Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *TREE* 10: 485-488
- BARATA JMS. 1998. *Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs, p. 409-448 in (CarcavalloRU, Galíndez Girón I, Jurberg J and Lent H(Eds)), Atlas of Chagas disease vectors in theAmericas, Vol. II. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.*
- BARBOSA SE, DIOTAIUTI L, SOARES RP, PEREIRA MH 1999. Differences in saliva composition among three Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop* 72: 91-98.
- BARGUES MD, KLISIEWICZ DR, PANZERA F, NOIREAU F, MARCILLA A, PEREZ R, ROJAS MG, O'CONNOR JE, GONZALEZ-CANDELAS F, GALVAO C, JURBERG J, CARCAVALLO RU, DUJARDIN JP, MAS-COMA S, 2006. Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infect Genet Evol* 6: 46-62.
- 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: 567-573.



- BARTH R 1962. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). XIX parte: Estudo comparado das mandíbulas de vários Triatominae e outros Reduviidae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 60: 91-101.
- BARTH R, MUTH H 1958. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). VIII parte: Observações sobre a superfície dos ovos das espécies mais importantes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 56: 197-208.
- BEHURA SK 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology* 15: 3087-3113.
- BERNATCHEZ L 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution Int J Org Evolution*. 55: 351-79.
- BERNSTEIN RE 1984. Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. *J R Soc Med* 77: 608-609.
- BOCK WJ 1959. Preadaptation and multiple evolutionary pathways. *Evolution* 13: 194-211.
- BONATTO SL SALZANO FM 1997. Diversity and age of the four major mtDNA haplogroups, and their implications for the peopling of the New World. *Am. J Hum Genet* 61: 1413-1423.
- BORGES EC, DUJARDIN JP, SCHOFIELD CJ, ROMANHA AJ, DIOTAIUTI L, 2005. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceará State, Northeastern Brazil. *Acta Trop* 93: 119-126.

- BRASILEIRO VLF 1982. Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). I - Influência da cópula e da longividade. *Rev Bras Biol* 42: 1-13.
- BRASILEIRO VLF 1984. Fecundidade e fertilidade da fêmea de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae). II - Influência da cópula e da nutrição. *Rev Bras Ent* 28: 441-449.
- BRASILEIRO VLF, PERONDONI ALP 1974. Biologia do *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Bras Ent* 18: 43-50.
- BRAZIL RP 1986. Observations on the feeding habits of *Triatoma rubrofasciata* (Hemiptera: Reduviidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 349-350.
- BRENIÈRE SF, LOPEZ J, VARGAS F, BARNABÉ C 1997. Genetic Variability and Microdistribution of *Triatoma infestans* Genotypes and *Trypanosoma cruzi* Clones in Arequipa Region (Peru). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 401-408.
- BROWN ADH, FELDMAN MW, NEVO E 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96: 523-536.
- BROWN WM 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3605-3609.
- BROWN WM, PRAGER EM, WANG A, WILSON AC 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J Mol Evol* 18: 225-239.
- CANÇADO JR 1999. Criteria of Chagas Disease Cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 331-335.
- CARBAJAL DE LA FUENTE AL, MINOLI SA, LOPES CM, NOIREAU F, LAZZARI CR, LORENZO MG 2007. Flight dispersal of the Chagas disease

- vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. *Acta Trop* 101: 115-119.
- CARCAVALLO RU, GALÍNDEZ GIRÓN I, JURBERG J AND LENT H (EDS), 1997. *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, Vol. I. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.*
- CARCAVALLO RU, JURBERG J, LENT H, NOIREAU F, GALVÃO C 2000. Phylogeny of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for Taxonomic arrangements. *Entomol Vect* 7: 1-99.
- CASO A 1954. *New World culture History; Middle America in "Anthropology Today" p. 226-237. Chicago, EEUU.*
- CATALÁ S 1996. Sensila associated with the rostrum of eight species of Triatominae. *J Morphol* 228: 195-201.
- CHAGAS C 1909. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- CHAKRABORTY, R. 1990. MITOCHONDRIAL DNA polymorphism reveals hidden heterogeneity within some Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 87-94.
- CHENG L 1976. *Marine Insects. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.*
- CHETVERIKOV SS 1926. On certain features of the evolutionary process from the viewpoint of modern genetics. *J Exp Biol* 2: 3-54.
- CHETVERIKOV SS 1927. Uber die genetische Beschaffenheit wilder population. *Verb V Internat Kong Vererbungsw* 2: 1439-1500.
- CLEMENT M, POSADA D, CRANDALL KA 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.

- COLEMAN AW, MAI JC 1997. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 Sequence Comparisons as a Tool for Predicting Genetic Relatedness. *J Mol Evol* 45: 1432-1432.
- CONNER JK, HARTL DL 2004. *A Primer of Ecological Genetics*, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- CORTEZ MR, EMPERAIRE L, PICCINALI R, GURTLER RE, TORRICO F, JANSEN AM, NOIREAU F 2007. Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. *Acta Trop* 10: 47-54.
- CORTEZ MR, PINHO AP, CUERVO P, ALFARO F, SOLANO M, XAVIER SC, D'ANDREA PS, FERNANDES O, TORRICO F, NOIREAU F, JANSEN AM 2006. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Parasitol* 114: 305-313.
- COSTA J, FELIX M 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.
- COSTA J, ALMEIDA CE, DOTSON EM, LINS A, VINHAES M, SILVEIRA AC, BEARD CB, 2003a. 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, ALMEIDA CE, DUJARDIN JP, BEARD CB 2003b. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 637-639.
- COSTA J, ALMEIDA JR, 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: 7-13.
- COSTA J, ARGOLO AM, FELIX M 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-52.
- COSTA J, BARTH OM, MARCHON-SILVA V, ALMEIDA CE, FREITAS-SIBAJEV MGR, PANZERA F 1997a. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Genital structures and eggs of different chromatic forms. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 493-498.
- COSTA J, FREITAS-SIBAJEV MGR, MARCHON-SILVA V, PIRES MQ, PACHECO RS 1997b. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 459-464.
- COSTA J, MARCHON-SILVA V 1998. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores* 5: 23-34.
- COSTA J, PETERSON AT, BEARD CB 2002. Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas disease vector in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 67: 516-520.
- COSTA MJ, PERONDINI ALP 1973. Resistência do *Triatoma brasiliensis* ao jejum. *Rev Saúde Pública* 7: 207-217.

- COURA JR, JUNQUEIRA ACV, BOIA MN, FERNANDES O 1999. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of Brazilian Amazon? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 379-384.
- COURA JR, JUNQUEIRA ACV, GIORDANO CM, FUNATSU RK 1994. Chagas`disease in the brazilian Amazon. I - a short review. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 103-107.
- CRANDALL KA, TEMPLETON AR 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969.
- DARWIN C 1845. Journal of researches into the natural history and geology of the countries visited during the voyage of H.M.S. Beagle round the world, under the Command of Capt. Fitz Roy, R.N. (Second ed.), London: John Murray (The Voyage of the Beagle).
- DIAS JCP 1987. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitology Today* 3: 336-341.
- DIAS JCP 1995. Natural history of Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* 65: 359-366.
- DIAS JCP 2006. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cad Saúde Pública* 22: 10, pp.
- DIAS JCP, MACHADO EMM, FERNANDES AL, VINHAES MC 2000. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Cad Saúde Pública* 16: 13-34.
- DIAS JCP, SCHOFIELD CJ 1999. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 103-121.

- DIAS JCP, SCHOFIELD JS 1998. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na Iniciativa do Cone Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 373-383.
- DIAS JCP, SILVEIRA AC, SCHOFIELD CJ 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 603-612.
- DIOTAIUTI L, FARIA FILHO OF, CARNEIRO FC, DIAS JC, PIRES HH, SCHOFIELD CJ 2000. Operational aspects of *Triatoma brasiliensis* control. *Cad Saude Publica* 16: 61-67.
- DIOTAIUTI L, PAULA OR, FALCÃO PL, DIAS JCP 1995. Avaliação do programa do controle vetorial da doença de Chagas em Minas Gerais, Brasil, com referência especial ao *Triatoma sordida*. *Bol Oficina Saint Panan* 118: 211-219.
- DONNELLY P, TAVARÉ S 1986. The ages of alleles and a coalescent. *Advances in Applied Probability* 18: 1 19.
- DOS SANTOS SM, LOPES CM, DUJARDIN JP, PANZERA F, PÉREZ R, CARBAJAL DE LA FUENTE AL, PACHECO RS, NOIREAU F 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 7: 469-475.
- DUJARDIN JP, TIBAYRENC M 1985. Etude de 11 enzymes et données de génétique formelle pour 19 loci enzymatiques chez *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann Soc Belge Med Trop* 65: 271-280.

- DUJARDIN JP, LA FUENTE C, CARDOZO L, TIBAYRENC M 1988. Dispersing behavior of *T. infestans*: evidence from a genetical study of field populations in Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 435-440.
- DUJARDIN JP, SCHOFIELD CJ PANZERA F 2000. *Les Vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Academie Royale des Sciences d'Outre Mer. Bruxelles, Belgique 162p.*
- DUJARDIN JP, TIBAYRENC M, VENEGAS E, MALDONADO L, DESJEUX P, AYALA FJ 1987. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol* 24: 40-45.
- DUMONTEIL E, GOURBIERE S, BARRERA-PÉREZ M, RODRÍGUEZ-FÉLIX E, RUÍZ-PIÑA H, BOÑOS-LOPEZ O, RAMÍREZ-SIERRA MJ, MENU F, RABINOVICH JE 2002. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 67: 176-183.
- DUMONTEIL E, RUIZ-PIÑA H, RODRIGUEZ-FELIX E, BARRERA-PEREZ M, RAMÍREZ-SIERRA MJ, RABINOVICH JE, MENU F 2004. Reinfestation of houses by *Triatoma dimidiata* after intradomicile insecticide application in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 253-256.
- DUMONTEIL E, TRIPET F, RAMIREZ-SIERRA MJ, PAYET V, LANZARO G, MENU F 2007. Assessment of *Triatoma dimidiata* dispersal in the Yucatan Peninsula of Mexico by morphometry and microsatellite markers. *Am J Trop Med Hyg.* 76: 930-937.
- ESPINOLA HN 1971. Reproductive isolation between *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 and *Triatoma petrochii* Pinto & Barreto, 1925 (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Biol* 31: 277-281.



- EXCOFFIER L, LAVAL G, SCHNEIDER S 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- EXCOFFIER L, SMOUSE PE, QUATTRO JM 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FORATTINI OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de Triatomíneos no Brasil. *Rev Saude Pública* 14: 265-299.
- FORATTINI OP, FERREIRA OA, ROCHA-SILVA EO, RABELLO EX, SANTOS JL 1971a. Aspectos ecológicos da tripanossomose Americana. II- Distribuição e dispersão de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. *Rev Saude Publica* 5: 163-192.
- FORATTINI OP, ROCHA-SILVA EO, FERREIRA OA, RABELLO EX, PATTOLI DG 1971b. Aspectos ecológicos da tripanossomose Americana. III- Dispersão local de triatomíneos, com especial atenção ao *Triatoma sordida*. *Rev Saúde Publica* 5: 193-205.
- FRANKHAM R, BALLOU JD, BRISCOE DA 2002. *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge University Press: Cambridge.
- FRANKHAM R, BALLOU JD, BRISCOE DA 2004. *A Primer of Conservation Genetics*, Cambridge: Cambridge University Press.
- FRY AJ 1999. Mildly deleterious mutations in avian mitochondrial DNA: Evidence from neutrality tests. *Evolution* 53: 1617-1620.
- FU YX 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

- FU YX, Li WH. 1999. Coalescing into the 21st century: an overview and perspectives of coalescent theory. *Theor. Popul. Biol.* 56: 1-10.
- FUTUYMA DJ 1995. *Biologia evolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética / CNPq, 3º ed. 646p.
- GALVÃO AB 1956. *Triatoma brasiliensis macromelasoma* n. subsp. (Reduviidae, Hemiptera). *Rev Bras Malariol Doen Trop* 7: 455-457.
- GALVÃO C, CARCAVALLO R, 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 BA, POWELL JR 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *J Med Entomol* 35: 232-238.
- GARCIA ES, VIEIRA E, GOMES JEPL, GONÇALVES MG 1984. Molecular biology of the interaction *Trypanosoma cruzi* / invertebrate host. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 33-37.
- GARCIA S, RAMOS CO, SENRA JF, VILAS-BOAS F, RODRIGUES MM, CAMPOS-DE-CARVALHO AC, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, SOARES MB 2005 Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 1521-1528.
- GERBER S, MARIETTE S, STREIFF R, BODÉNÈS C AND KREMER A 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol Ecol* 9: 1037-1048.
- GIORDANO R, 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: 753-760.
- GORDON DM 1997. The genetic structure of *Escherichia coli* populations in feral house mice. *Microbiology* 143: 2039-2046.
- GORLA DE, DUJARDIN JP, SCHOFIELD CJ 1997. Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Trop* 63:127-40. Links
- GRILLO LAM, MAJEROWICZ D, GONDIM KC 2007. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut Triacylglycerol-lipase. *Insect Bioch Mol Biol* 37: 579-588.
- GRIMONT F, GRIMONT PAD 1986. Ribosomal nucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol* 137B: 165-175.
- GSC- Genome Sequencing Center 2007. <http://genome.wustl.edu/genome.cgi?GENOME=Rhodnius%20prolixus>
- GUARNERI 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: 373-379.
- GUMIEL M, CATALA S, NOIREAU F, ROJAS DE ARIAS A, GARCIA A, DUJARDIN JP 2003. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo and Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Syst Entomol* 28: 173-179.
- GUREVITZ JM, CEBALLOS LA, KITRON U, GÜRTLER RE 2006. Flight initiation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) under natural climatic conditions. *J Med Entomol* 43: 143-50.

- GUREVITZ JM, KITRON U, GÜRTLER RE 2007. Flight muscle dimorphism and heterogeneity in flight initiation of field-collected *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 44: 186-191.
- HAMBLIN MT AQUADRO CF 1999. DNA sequence variation and the recombinational landscape in *Drosophila pseudoobscura*: a study of the second chromosome. *Genetics* 153: 859-869.
- HAMMER MF, BLACKMER F, GARRIGAN D, NACHMAN MW, WILDER JA 2003. Human population structure and its effects on sampling Y chromosome sequence variation. *Genetics* 164: 1495-1509.
- HARRY M 1994. Morphometric variability in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Jpn J Genet* 69: 233-250.
- HARTL DL 2000. *A Primer of Population Genetics* 3rd Ed, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- HARTL DL, CLARK AG 1997. *Principles of Population Genetics* 3rd Ed, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- HAYASHI JL, TAGASHIRA Y, YOSHIDA MC 1985. Absence of extensive recombination between Inter and intraespecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp Cell Res* 160: 387-395.
- HECKEL DG 2003. Genomics in pure and applied entomology. *Annual Review of Entomology* 48: 235-260.
- HEDRICK PW 2000. *Genetics of Populations* 2nd Ed, Boston: Jones and Bartlett.
- HOY MA 1994. *Insect Molecular Genetics. An Introduction to Principles and Applications*. Academic Press, San Diego, 540pp.

- HUFF DR, PEAKALL R, SMOUSE PE 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 927-934.
- HYPASA V, TIETZ DF, ZRZAVY J, REGO RO, GALVAO C, JURBERG J 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 23: 447-457.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e recursos Renováveis. 2007 - <http://www.ibama.gov.br> / acesso em 20 de maio de 2007.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - 2007. *Dados on line*: <http://www.ibge.gov.br>.
- JARNE P, LAGODA PJL 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11: 424-429.
- JURBERG J, GONÇALVES TCM, COSTA, JM, WANDERLEY S 1986. Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 111-120.
- KIMURA M, CROW J 1964. "The Number of Alleles that Can Be Maintained in a Finite Population". *Genetics* 49: 725-738
- KIMURA M, OHTA T 1971. *Theoretical Aspects of Population Genetics*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- KREITMAN M 1983. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 304: 412-417.
- KUMAR S, TAMURA K NEI M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformat* 5: 150-163.

- LACHER TEJ 1981. The comparative social behavior of *Kerodon rupestris* and *Galea spixii* and the evolution of behavior in the Caviidae. *Bull Carnegie Mus* 17: 1-71.
- LAPORTE FL 1833. Essai d'une classification systematique de l'ordre des Hémiptères (Hémiptères, Hétéroptères, Latr.). *Magaz Zool* 1: 1-88.
- LEAL IR, SILVA JMC, TABARELLI M, LACHER TEJ 2005. Changing the Course of Biodiversity Conservation in the Caatinga of Northeastern Brazil. *Megadiversidade* 1: 139-146.
- LENT H, JURBERG J 1978. Estudo comparativo da genitália externa masculina de seis espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 que mais frequentemente habitam o domicílio humano no Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Biol* 38: 931-944.
- LENT H, JURBERG J, GALVÃO C, CARCAVALLO RU 1994. *Triatoma melanosoma*, novo status para *Triatoma infestans melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo, 1987 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 353-358.
- LENT H, WYGODZINSKY P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas'disease. *Bull Amer Mus Natur Hist* 163: 123-520.
- LEWINSOHN R 2005. Do caldo de cana ao suco de açaí. *Jornal da Unicamp* 283: 2p.
- LIZARRAGA R 1987. Descripción del Perú, Tucumán, Río de la Plata y Chile [fines s. XVI], Madrid, Col. Historia 16, Crónicas de América 37: 530 pp.
- LORENZO MG, GUARNERI AA, PIRES HH, DIOTAIUTI L, LAZZARI CR 2000. Microclimatic properties of the *Triatoma brasiliensis* habitat *Cad Saude Publica* 16: 69-74.

- LUCENA DT 1960. Ecologia dos triatomíneos no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenç Trop* 11: 577-635.
- LUCENA DT, REGO MA 1969. Microestrutura do exocório de ovos de triatomíneos do nordeste do Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 11: 87-93.
- LUITGARDS-MOURA JF 2001. *Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas em áreas de colonização agrícola no estado de Roraima, Brasil. Rio de Janeiro (Tese de Doutorado - Institute Oswaldo Cruz), 89p.*
- LUITGARDS-MOURA JF, VARGAS AB, ALMEIDA CE, MAGNO-ESPERANCA G, AGAPITO-SOUZA R, FOLLY-RAMOS E, COSTA J, TSOURIS P, ROSA-FREITAS MG 2005. 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 Sao 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.
- MAA WCJ, TERRIERE LC 1983. Age-dependent variation in enzymatic and electrophoretic properties of house fly (*M. domestica*) carboxylesterases. *Comp Biochem Physiol* 74C: 461-467.
- MAGUIRE TL, PEAKALL R, SAENGER P 2002. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 388-398.

- MANTEL N 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* 27: 209-220.
- MARCILLA A, BARGUES MD, ABAD-FRANCH F, PANZERA F, CARCAVALLO RU, GALVÃO C, JURBERG J, MILES MA, DUJARDIN JP MAS-COMA S 2002. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol* 1: 225-235.
- MARCILLA A, BARGUES MD, RAMSEY JM, MAGALLON-GASTELUM E, SALAZAR-SCHETTINO PM, ABAD-FRANCH F, DUJARDIN JP, SCHOFIELD CJ, MAS-COMA S 2001. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol* 18: 136-142
- MARCONDES CB, NASCIMENTO JA 1992. Influence of light conditions on adult mortality and egg-laying of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Rev Soc Bras Med Trop* 25: 231-233.
- MAXAM A M GILBERT W 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560-564.
- MELGAR S, CHÁVEZ JJ, LANDAVERDE P, HERRERA F, RODAS A, ENRÍQUEZ E, DORN P, MONROY C 2007. The number of families of *Triatoma dimidiata* in a Guatemalan house. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 221-223
- MEYER A 1993. *Evolution of mitochondrial DNA in fishes*. In: *Biochemistry and Molecular Biology of fishes* (Hochachka PW, Mommen TP eds) Leiden Netherlands: Elsevier. 1-38.



- MICHALAKIS Y, EXCOFFIER L 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142: 1061-1064.
- MIXSON TR, LYDY S, DASCH GA, REAL LA. 2006. Inferring the population structure and demographic history of the tick, *Amblyomma americanum* Linnaeus. *J Vect Ecol* 31: 181-192.
- MONCAYO A 2003. Chagas' disease current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem do Inst Oswaldo Cruz* 98: 577-591.
- MONROY MC, BUSTAMANTE DM, RODAS AG, ENRIQUEZ ME, ROSALES RG 2003. Habitats, dispersion and invasion of sylvatic *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Peten, Guatemala. *J Med Entomol* 40: 800-806.
- MONTEIRO FA, BARRETT TV, FITZPATRICK S, CORDÓN- 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 46-56.
- MONTEIRO FA, PEREZ R, PANZERA F, DUJARDIN JP, GALVAO C, ROCHA D, NOIREAU F, SCHOFIELD C, BEARD CB 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 229-238.

- MONTEIRO FA, WESSON DM, DOTSON EM, SCHOFIELD C, BEARD CB, 2000. Phylogeny and Molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460-465.
- MOREL CM, LAZDINS J 2003. Chagas disease. *Nature Rev Microbiol* 1: 14-15.
- MUELLER UG, WOLFENBARGER LL 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *TREE* 14: 389-394.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press
- NEIVA A, LENT H 1941. Sinopse dos Triatomíneos. *Rev Entomol* 12: 62-92.
- NERY-GUIMARÃES F, SILVA NN, CLAUSELL DT, MELLO, AL, RAPONE T, SNELL T, RODRIGUES N 1968. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrêla - Rio Grande do Sul). *O Hospital* 73: 73-110.
- NOIREAU F, FLORES R, GUTIERREZ T, DUJARDIN JP 1997. Detection of wild dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 583-584.
- NOIREAU F, FUENTE ALC, LOPES CM, DIOTAIUTI L 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *Acad Bras Ciênc* 77: 431-436.
- NOIREAU F, GUTIÉRREZ T, FLORES R, BRENIÉRE SF, BOSSENO MF, WISNIVESKY-COLLI C 1999a. Ecogenetics of *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) in the Bolivian Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 451-457.
- NOIREAU F, ZEGARRA M, ORDÓÑEZ J, GUTIÉRREZ T, DUJARDIN JP 1999b. Genetic structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae)

domestic populations from Bolivia: application on control interventions.

*Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 347-351.

OLIVEIRA AW, SILVA IG 2007. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 204-208.

PACHECO RS, ALMEIDA CE, COSTA J, KLISIEWICZ DR, MAS-COMA S, BARGUES MD 2003. RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). *Ann Trop Med Parasitol* 97: 757-768.

PACHECO RS, ALMEIDA CE, KLISIEWICZ DR, COSTA J, PIRES MQ, PANZERA F, BAR MD, MAS-COMA S, BARGUES MD 2007. Genetic population structure of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. *Parasite* 14: 000-000 (no prelo).

PACHECO RS, DE BRITO CM, SARQUIS O, PIRES MQ, BORGES-PEREIRA J, LIMA MM 2005. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. *Biochem Genet* 43: 519-30.

PANZERA F, DUJARDIN JP, NICOLINI P, CARACCIO MN, ROSE V, TELLEZ T, BERMÚDEZ H, BARGUES MD, MAS-COMA S, O'CONNOR JE, PÉREZ R 2004. Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerg Infect Dis* 10: 438-446.

PANZERA F, FERRANDIS I, RAMSEY J, ORDONEZ R, SALAZAR-SCHETTINO PM, CABRERA M, MONROY MC, BARGUES MD, MAS-COMA S, O'CONNOR JE, ANGULO VM, JARAMILLO N, CORDON-ROSALES C, GOMEZ D, PEREZ R 2006. Chromosomal variation and

genome size support existence of cryptic species of *Triatoma dimidiata* with different epidemiological importance as Chagas disease vectors. *Trop Med Int Health* 11: 1092-1103.

PANZERA F, FERRANDIS I, RAMSEY J, SALAZAR-SCHETTINO PM, CABRERA M, MONROY C, BARGUES MD, MAS-COMA S, O'CONNOR JE, ANGULO VM, JARAMILLO N, PEREZ R 2007. Genome size determination in chagas disease transmitting bugs (Hemiptera-Triatominae) by flow cytometry. *Am J Trop Med Hyg* 76: 516-521.

PATTERSON JS, SCHOFIELD CJ, DUJARDIN JP, MILES MA 2001. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with old world species of *Triatoma*: evidence of New World ancestry. *Med Vet Entomol* 15: 443-451.

PAVAN MG, MONTEIRO FA 2007. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Trop Med Int Health* 12: 751-758.

PEAKALL R, SMOUSE PE, HUFF DR 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD Variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* 4: 135-147.

PELLI A, DA SILVA MA, SARMENTO FR, MARTINS E, DA MATA SA, DOMINGUES MA, RAMIREZ LE 2007. Population parameters for *Triatoma sordida* Stal, 1859: the most frequent vector for Chagas disease in the Triangulo Mineiro (Heteroptera, Triatominae). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 25-28.

PEREIRA J, DUJARDIN JP, SALVATELLA R, TIBAYRENC M 1996. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpntei* and *T. rubrovaria*. *Heredity* 77: 47-54.

- PEREIRA J, DUJARDIN JP, SALVATELLA R, TIBAYRENC M 1996. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. *Heredity* 77: 47-54.
- PEREZ DE ROSAS AR, SEGURA EL, GARCIA BA 2007. Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Mol Ecol* 16: 1401-1412.
- PERLER F, EFSTRATIADIS A, LOMEDICO P, GILBERT W, KOLODNER R, DODGSON J 1980. The Evolution of gene: the chicken preproinsulin gene. *Cell* 20: 555-556.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A 1975. Laboratory colonies of Triatominae, biology and population dynamics. In American Tripanosomiasis Research. *PAHO Scient Publ* 318: 63-82.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A, MOREIRA CJC 1994. *In vivo* differentiation of *Trypanosoma cruzi* - 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 603-618.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A, MULLER CA, CARVALHO-MOREIRA, CJ 1988. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 3 - On the interaction of vector species and parasite stain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Saúde Pública São Paulo* 22: 390-400.

- PERONDINI ALP, COSTA MJ, BRASILEIRO VLF 1975. Biologia do *Triatoma brasiliensis*. II. Observações sobre a autogenia. *Rev Saúde Pública* 9: 363-370.
- PESSÔA SB 1962. Domiciliação dos triatomíneos e epidemiologia da doença de Chagas. *Arq Hig Saude Publica* 27: 163-171.
- 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: 209-221.
- PINTO ZT, LIMA MM, REY L 1992. Feeding behavior of different species of Chagas' disease vectors stimulated with blood sources at different temperatures. *Braz J Med Biol Res* 25: 19-22.
- POSADA D, CRANDALL KA 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trend Ecol Evol* 16: 37-45.
- POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, HANAFEY M, VOGEL J, TINGEY S, RAFALSKI A 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for gemplasm analysis. *Genet Mol Biol* 27: 579-588.
- RAMOS-ONSINS E ROZAS J 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Mol Biol Evol* 19: 2092-2100.
- RAND DM, KANN LM 1996. Excess amino acid polymorphism in mitochondrial DNA: Contrasts among genes from *Drosophila*, mice, and humans. *Mol Biol Evol* 13: 735-748.

- RAYMOND M, ROUSSET F 1995. Genepop (version 1.2) - population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 248-249.
- REED DH, FRANKHAM R 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conserv Biol* 17: 230-237.
- REY L 1973. *Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas. I. O Parasito. II. A Doença. III Ecologia, epidemiologia e profilaxia In: Parasitologia.\_Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 731pp.*
- REYNOLDS J, WEIR BS, COCKERHAM CC 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term distance. *Genetics* 105: 767-779.
- RODRIGUEZ-BONFANTE C, AMARO A, GARCIA M, MEJIAS WOHLERT LE, GUILLEN P, ANTONIO GARCIA R, ALVAREZ N, DIAZ M, CARDENAS E, CASTILLO S, BONFANTE-GARRIDO R, BONFANTE-CABARCAS R 2007. Epidemiology of Chagas disease in Andres Eloy Blanco, Lara, Venezuela: triatomine infestation and human seroprevalence. *Cad Saude Publica* 23: 1133-1140.
- ROJAS-DE-ARIAS A 2001. Chagas disease prevention through improved housing using an ecosystem approach to health. *Cad Saude Publica* 17: 89-97.
- ROSA JA, BARATA JMS, BARELLI N 1992b. Spiracles of 5th instar nymphs in six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) using scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 301-302.
- ROSA JA, BARATA JMS, BARELLI N 1995. Morphology of abdominal bristles determined by scanning electron microscopy in six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 487-488.

- ROSA JÁ, BARATA JMS, BARELLI N, SANTOS JLF, NETO FMB 1992a. Sexual distinction between of 5<sup>th</sup> instar nymphs in six species of triatominae (Hemiptera, Reduviidae) using scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 257-264.
- ROZAS J, SÁNCHEZ-DELBARRIO JC, MESSEGUER X, ROZAS R 2003. DNAsp, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB ERLICH HA 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAIKI RK, SCHARF S, FALOONA F, MULLIS KB, HORN GT, ERLICH HÁ ARNHEIM N 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- SALVATELLA R 1986. *Triatoma delpontei* (Romanha and Abalos, 1947) (Hemiptera-Reduviidae), nueva especie de triatomineos para el Uruguay. *Revista Uruguaya de Patologia Clinica* 22: 58.
- SANTANNA MR, ARAÚJO JG, PEREIRA MH, PESQUERO JL, DIOTAIUTI L, LEHANE SM, LEHANE MJ 2002. Molecular cloning and sequencing of salivary gland-specific cDNAs of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *Insect Mol Biol* 11: 585-593.
- SANTOS A, RIBEIRO JM, LEHANE MJ, GONTIJO NF, VELOSO AB, SANT'ANNA MR, NASCIMENTO ARAUJO R, GRISARD EC, PEREIRA MH 2007. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol* 37: 702-712.



- SARQUIS O, BORGES-PEREIRA J, MAC CORD JR, GOMES TF, CABELLO PH, LIMA MM 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.
- SARQUIS O, MACCORD JR, GOMES TF, CABELLO PH, PEREIRA JB, LIMA MM 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 Osw Cruz* 99: 263-270.
- 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: 643-649.
- SCHAEFFER SW 2002. Molecular population genetics of sequence length diversity in the Adh region of *Drosophila pseudoobscura*. *Genet Res* 80: 163-175.
- SCHLOTTERER C 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 5: 63-69.
- SCHMUNIS GA 1999a. Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 93-101.
- SCHMUNIS GA 1999b. Risk of Chagas disease through transfusions in the Americas. *Medicina* 59: 125-134.
- SCHNEIDER S, KUEFFER J, ROESSLI D, EXCOFFIER L 1997. *A software for population genetic data analysis*, University of Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory.

- SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L 2000. ARLEQUIN, version 2.000: A software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.*
- SCHOFIELD CJ 1988. *Biosystematics of the Triatominae. In Biosystematics of Haematophagous Arthropods, ed. MW Service, pp. 284–312. Oxford, UK: Clarendon*
- SCHOFIELD CJ, DIAS JC 1999 The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol* 42: 1-27
- SCHOFIELD CJ, DOLLING WR 1993, Bedbugs and Kissing-bugs (bloodsucking Hemiptera). pp. 483-516. In: LR. P. Lane and R. W. Crosskey (eds.), *Medical insects and arachnids*. Chapman and Hall, New York.
- SCHOFIELD CJ, DUJARDIN J P 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actual Biol* 21: 183-197.
- SCHOFIELD CJ, MATTHEWS JNS 1985. Theoretical approach to active dispersal and colonization of houses by *Triatoma infestans*. *J Trop Med Hyg* 88: 211-222.
- SCHREIBER G, DE SALLES JM, MARTINS RP, NOVAES PM 1977. Cytogenetics of Triatominae (Hemiptera heteroptera). IV: Effect of radiations on spermatogenesis. *Rev Bras Biol* 37: 139-145.
- SCHREIBER G, PELLEGRINO J 1950. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici). *Sci Genet* 3: 215-226.

- SCHWEIGMANN N, VALLVE S, 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.
- SEZONLIN M, DUPAS S, LE RÜ B, LE GALL P, MOYAL P, CALATAYUD A, GIFFARD I, FAURE N, SILVAIN JF 2006. Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Mol Ecol* 15: 407-420.
- SHAW C 1969. Isoenzymes: classification, frequency and significance. *Inst Rev Cytol* 25: 297-332.
- SHIKANAI-YASUDA MA, BRISOLA MARCONDES C, GUEDES LA, SIQUEIRA GS, BARONE AA, DIAS JCP, AMATO-NETO V, TOLEZANO JE, PERES BA, ARRUDA JR ER, LOPES MH, SHIROMA M, CHAPADEIRO E 1991. Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 33: 351-357.
- SILVA IG, SILVA HHG 1993. Suscetibilidade de 11 espécies de Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) à cepa 'Y' de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Rev Bras Ent* 37: 459-463.
- SILVA LJ 1985. A doença de Chagas no Brasil. Índícios de sua ocorrência e distribuição até 1909. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 27: 219-223.
- SILVA RA, SCANDAR SA, PAULIQUÉVIS-JÚNIOR C, SAMPAIO SM, RODRIGUES VL 2005. Ampliação de raio de pesquisa de triatomíneos na atividade de atendimento às notificações em área de *Triatoma sordida* (Stål, 1859) no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 339-43.
- SILVA IG 1990. Influence to temperature of the biology of triatomines. VI. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Entomol* 34: 307-311.

- SILVEIRA AC, REZENDE DF 1994. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 11-22.
- SILVEIRA AC, REZENDE DF 1994. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 11-22.
- SILVEIRA AC, VINHAES MC 1999. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 405-411.
- SILVEIRA AC, VINHAES MC, LIRA E, ARAÚJO E 2001. O controle de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*. I: Estudo do tempo de reposição das condições de transmissão da doença de Chagas por *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* em áreas submetidas ao tratamento químico domiciliar, e de variáveis ambientais relacionadas. *Brasília, Organização Pan-Americana de Saúde* 86p.
- SILVEIRA AC, VINHAES MC, LIRA E, ARAÚJO E 2001. O controle de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*. II: Avaliação do controle físico, pela melhoria habitacional, e caracterização do ambiente peridomiciliar mais menos favorável à persistência da infestação e reinfestação por *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*. *Brasília, Organização Pan-Americana de Saúde* 86p.
- SLATKIN M 1985. Gene flow in natural populations. *Ann Rev Ecol Syst* 16: 393-430.
- SLATKIN M 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.

- SLATKIN M 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- SMOUSE PE, LONG JC 1992. Matrix correlation analysis in anthropology and genetics. *Yearbook Phys Anthropol* 35: 187-213.
- SMOUSE PE, PEAKALL R 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561-
- SOARES RP, EVANGELISTA LG, LARANJA LS, 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: 151-155.
- SOARES, RP, SANTORO MM 2000. alpha-glycerophosphate dehydrogenase activity in flight muscles of triatomine bugs *Panstrongylus megistus* and *Triatoma sordida*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 707-709.
- SOUZA LC, FROTA FCC, SOUZA JA, ZUZA CAS, LIMA JW 1999. Descrição de um foco urbano de *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), na cidade Sobral, norte do Ceará. Resultados preliminares. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 84-85.
- SOUZA ML, SARQUIS O, GOMES TF, FERREIRA MF, LIMA MM, SILVA LF 2004. Sulfated glycosaminoglycans in two hematophagous arthropod vectors of Chagas disease, *Triatoma brasiliensis* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Comp Biochem Physiol, Part B*, 139: 631-635.
- SOUZA V, NGUYEN TT, HUDSON RR, PINERO D, LENSKI RE 1993. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 89: 8389-8393.

- STEINDEL M, TOMA HK, CARVALHO PINTO CJ, GRISARD EC, SCHLEMPER BR JUNIOR 1994. Colonização de ecótopos artificiais por *Panstrongylus megistus* na ilha de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 36: 43-50.
- STEWART CNJ AND EXCOFFIER L 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *J Evol Biol* 9: 153-171.
- STOTHARD JR, YAMAMOTO Y, CHERCHI A, GARCIA A L, VALENTE SAS, SCHOFIELD CJ, MILES MAA 1998. Preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bulletin of Entomological Research* 88: 553-560.
- SWG - Scientific Working Group on Chagas Disease 2005. *Report of the Scientific Working Group on Chagas Disease, Buenos Aires, Argentina 17-20 April 2005*. <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/swgchagas.pdf>.
- TAJIMA F 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- TARTAROTTI E, CERON CR 2005, Ribosomal ITS-1 DNA Intergenic Spacer Polymorphism in Triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Biochemical Genetic* 43: 365-373.
- TEMPLETON AR, CRANDALL KA, SING CF 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.

- TIETZ DF 2000. *Molecular and morphological analysis of phylogeny of subfamily Triatominae (Heteroptera: Reduviidae)*. M.Sc. thesis, Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, Ceské Budejovice (in Czech).
- VALENTE SAE, VALENTE VC 1993. Situação atual da doença de Chagas na Amazonia. *Rev Soc Bras Med Trop* 26: 68-70.
- VALENTE SAS, VALENTE VC, FRAHIA NETO H 1999. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas`disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 395-398.
- VILLELA MM, ALEIXO A, SOUZA JM, MELO VDE P, DIAS JC 2006. Integral insecticide spraying followed by immediate triatomine research, as an additional strategy for the epidemiological surveillance of Chagas' disease, in areas of residual persisting foci. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 227-229.
- VITTA AC, MOTA TR, DIOTAIUTI L, LORENZO MG 2007. The use of aggregation signals by *Triatoma brasiliensis* (Heteroptera: Reduviidae). *Acta Trop* 101: 147-152.
- VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, LEE TH, VAN DER, HORNES M, FRIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M, ZABEAU M 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- WAKELEY J 2004. Recent trends in population genetics: more data! More math! Simple models? *J Hered* 95: 397-405.
- WALKER DE, MOLER PE, BUHLMANN KA, AVISE JC 1998. Phylogeographic uniformity in mitochondrial DNA of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Animal Conservation* 1: 55-60

- WATTERSON GA, GUESS HA 1977. Is the most frequent allele the oldest?  
*Theoretical Population Biology* 11: 141-160.
- WEIR BS 1990. *Genetic Data Analysis*, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. National Research Council of the USA 1996. *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. Washington, DC: National Academy Press.
- WEIR BS, COCKERHAM CC 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- WHO - World Health Organization 1991. Control of Chagas disease. Report of a WHO expert Committee. Geneva: World Health Organization, Technical report series. No. 811.
- WHO - World Health Organization 2002. Control of Chagas disease. WHO *Tech. Rep. Ser. 905*. World Health Organization, Geneva.
- WILLIAMS JG, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFASAKI JA, TINGEY SV 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- WORLD BANK 1993. World Development Report 1993. Investing in Health. *Oxford University Press, New York, 329 pp.*
- WRIGHT S 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31: 39-59.
- WRIGHT S 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugenics* 15: 323-354.
- WRIGHT S 1965. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. *Evol* 19: 395-420.
- WRIGHT S 1978. *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press.



- ZELEDÓN R 2004. Some historical facts and recent issues related to the presence of *Rhodnius prolixus* (Stål, 1859) (Hemiptera: Reduviidae) in Central America. *Entomol y Vect* 11: 233-246.
- ZELEDÓN R, RABINOVICH JE 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol* 26: 101-133.
- ZELEDÓN R, ROJAS JC 2006. Environmental management for the control of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), (Hemiptera: Reduviidae) in Costa Rica: a pilot project. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 101: 379-386.
- ZELEDÓN R, SOLANO G, ZÚÑIGA A, SWARTZWELDER JC 1973. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). III Habitat and blood sources. *J Med Entomol* 10: 363-370.
- ZIMNOCH-GUZOWSKA E, MARCZEWSKI W, LEBECKA R, FLIS B, SCHÄFER-PREGL R, SALAMINI F, GEBHARDT C 2000. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp *atroseptica* in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers. *Genet Mol Biol* 27: 579-588.

# 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](#)