

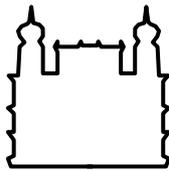
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

Aspectos Ecoepidemiológicos e Análises sobre as Alterações
Fenotípicas de Populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*
de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil

VANESSA LIMA NEIVA

Rio de Janeiro
Agosto de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

VANESSA LIMA NEIVA

Aspectos Ecoepidemiológicos e Análises sobre as Alterações Fenotípicas de Populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil

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

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Jane Margaret Costa de Frontin Werneck
Prof^a. Dr^a. Catarina Macedo Lopes

Rio de Janeiro
Agosto de 2019

Lima Neiva, Vanessa.

Aspectos Ecoepidemiológicos e Análises sobre as Alterações Fenotípicas de Populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil / Vanessa Lima Neiva. - Rio de Janeiro, 2019.
206 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientadora: Jane Margaret Costa de Frontin Werneck.
Co-orientadora: Catarina Macedo Lopes.

Bibliografia: f. 144-173

1. Infecção natural. 2. DTUs de *T. cruzi*. 3. Fonte alimentar. 4. Vetor. 5. Plasticidade fenotípica. I. Título.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

VANESSA LIMA NEIVA

Aspectos Ecoepidemiológicos e Análises sobre as Alterações Fenotípicas de
Populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* de Caicó, Rio Grande do Norte,
Brasil

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Jane Margaret Costa de Frontin Werneck
Prof^a. Dr^a. Catarina Macedo Lopes

Aprovada em: 09/08/2019

Examinadores:

Prof^a. Dr^a. Angela Cristina Verissimo Junqueira – **Presidente** (IOC/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Rubens Pinto de Mello (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto (UFF)

Prof. Dr. Marcos Takashi Obara (UNB)

Prof. Dr. Cleber Galvão Ferreira (IOC/FIOCRUZ) (Suplente)

Prof. Dr. José Mario D`Almeida (UFF) (Suplente)

Rio de Janeiro
09 de agosto de 2019



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Vanessa Lima Neiva**, sob orientação da Dr^a. Jane Margaret Costa de Frontin Werneck, foi aprovada em 09/08/2019, em sua defesa de tese de doutorado intitulada: **“Aspectos Ecoepidemiológicos e Análises sobre Alterações Fenotípicas de Populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil”**, área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Angela Cristina Verissimo Junqueira - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr. Marcos Takashi Obara - UnB/DF, Dr^a Constança Felicia de Paoli de Carvalho Britto - IOC/FIOCRUZ, Dr. Rubens Pinto de Mello - IOC/FIOCRUZ, Dr. Cícero Brasileiro de Mello Neto - UFF/RJ e como suplentes: Dr. Cleber Galvão Ferreira - IOC/FIOCRUZ e Dr. José Mario D’Almeida - UFF/RJ.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria nº. 1740, de 20.12.94, do Ministro de Estado da Educação e do Desporto, e com a Portaria nº. 840, de 22.12.94, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 6 (seis) na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, **a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese *on line* e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 09 de agosto de 2019.


Martha Cecilia Suárez Mutis
Matrícula SIAPE 1556044

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob nº DCE-10906/19 no livro nº II, folha 72 em 09/08/2019.

O senhor é o meu pastor e nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente às águas tranquilas, refrigera a minha alma, guia-me pelas veredas da justiça por amor do teu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte não temeria mal algum, porque tu estás comigo, a tua vara e o teu cajado me consolam, preparas para mim uma mesa na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda, certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão por todos os dias da minha vida e habitarei a casa do senhor por longos dias.

Salmos 23.

Dedico

Aos meus pais: exemplos de vida e trabalho, força motriz da minha perseverança e resistência.

Ao Maurílio Freitas Mendonça por acreditar em meus ideais, pelo incentivo e apoio na concretização de um sonho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, antes de tudo, pois sem ele nada é possível.

À Dra. Jane Margaret Costa de Frontin Werneck pela orientação e oportunidades, por me incentivar a aprofundar os meus conhecimentos sobre triatomíneos e por confiar e investir em meu potencial, os quais foram fundamentais para o meu desenvolvimento profissional.

À Dra. Catarina Macedo Lopes, pela sua generosidade por aceitar a minha coorientação, especialmente pelos seus ensinamentos, questionamentos e correções ao longo das etapas: pesquisa entomológica de campo, processamento do material biológico e de redação da tese.

À Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves e à Dra. Danielle Misael de Sousa pelos ensinamentos referentes aos procedimentos de dissecação dos insetos e isolamento dos parasitos.

À Dra. Helena Keiko Toma pela colaboração, por disponibilizar o seu laboratório para a realização de todas as técnicas moleculares usadas neste trabalho e pela valiosa oportunidade que me concedeu de adquirir conhecimentos sobre biologia molecular através da sua disciplina “Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas e Parasitárias”.

À amiga Dra. Márcia Ximena Gumiel, pela sua parceria em vários trabalhos e pela sua fundamental contribuição nas análises morfométricas e estatísticas desta tese.

À Dra. Ângela Junqueira por todo o empenho na revisão desta tese, pelos questionamentos, correções e sugestões fundamentais para o enriquecimento deste trabalho.

À Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet pelo apoio e disponibilização do laboratório para realização dos experimentos e manutenção dos triatomíneos, os quais foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

À Lucia Maria Abrantes Aguiar, Coordenadora do Programa de Controle da Doença de Chagas do Rio Grande Norte, e aos agentes de endemias de Caicó Silvan Azevedo Medeiros (Sr. Miudinho), Manuel Barros Neto, José Josino Sobrinho, Jaziel Paulino da Silva e ao coordenador da IV URSAP – Caicó Aniceto Alves Martins Neto não só pela parceria na captura de triatomíneos, mas sobretudo por compartilhar conhecimentos acumulados ao longo de anos de atuação no controle e vigilância de vetores e pelas ricas e divertidas histórias sobre a vida do povo que vive no sertão do Seridó.

Aos professores Patrícia Cuervo, Harrison Magdinier e Raquel Teixeira por terem me selecionado para fazer a disputada disciplina “Métodos Experimentais em Biologia Molecular”, a qual foi imprescindível não só para o meu aperfeiçoamento nas análises moleculares deste estudo, mas pela oportunidade de me encantar, explorar e melhor entender o dogma central da biologia molecular.

À Dra. Samanta Xavier pelo auxílio na confecção de mapas para apresentação em congressos e pelos conhecimentos compartilhados na disciplina “Cartografia & Saúde: análise geoespacial como ferramenta aplicada na parasitologia”.

À Andreia do IPEC (Laboratório de Parasitologia) e Dra. Regina Amendoeira (Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses) pela disponibilização de materiais para fazer meio de cultura para o isolamento dos parasitos.

À equipe do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera (LIVEDH) do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, principalmente Bruna, Raquel e Simone Teves pelo apoio.

À Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Oswaldo Cruz, por me permitir a honra de dar continuidade à minha formação nessa Instituição que tanto admiro.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical pela construção e manutenção de um curso de pós-graduação de qualidade, pela compreensão e por atender a todas as minhas solicitações.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela atenção e por compartilhar seus conhecimentos sobre as doenças tropicais.

À minha família: irmãos, primos, tios, avós, sogro e sogra pelo apoio, orações e pela presença amiga que ajudou a aliviar as pressões.

Aos jovens pesquisadores Gabriel Guimarães, Letícia Paschoaletto e Paula Assis pela parceria na busca de conhecimentos sobre os insetos e pela vivência como coorientadora (PIBIC) e orientadora (PROVOC).

À equipe do Laboratório de Biodiversidade Entomológica: Dr. Márcio Felix, Dr. Felipe Moreira, Dr. Paulino e Dra. Carolina Dale e todos os colegas, pelo apoio.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e competência na análise deste trabalho, enriquecendo-o com críticas e sugestões.

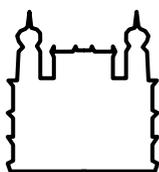
O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Este trabalho foi desenvolvido por meio das seguintes parcerias:

Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ

Laboratório de Biodiversidade Entomológica - LABE

Dra Jane Margaret Costa de Frontin Werneck (Orientadora)



**Laboratório Interdisciplinar de Vigilância em Diptera e Hemiptera -
LIVEDH**

Dra. Catarina Macedo Lopes (Coorientadora)

Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves (Colaboradora)



UFRJ

Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia - LDMH

Dra. Helena Keiko Toma (Colaboradora)



**Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte -
SESAP**

Lúcia Maria Abrantes Aguiar (Colaboradora)

Suporte Financeiro:



**Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - CAPES**



**Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico - CNPq**

RESUMO

Aspectos Ecoepidemiológicos e Análises sobre as Alterações Fenotípicas de Populações de *Triatoma brasiliensis brasiliensis* de Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil

Triatoma brasiliensis brasiliensis é autóctone no Brasil, considerado um dos mais importantes vetores de *Trypanosoma cruzi* em áreas semiáridas do Nordeste. No estado do Rio Grande do Norte, a região do Seridó está passando por transformações devido ao intenso processo de desertificação ocasionado, principalmente, por impactos antrópicos no bioma Caatinga. Neste contexto, levantamento de informações sobre as infestações de ecótopos naturais e artificiais por *T. b. brasiliensis* é crucial para evitar a ocorrência de casos e surtos da doença de Chagas. Estudos sobre a variabilidade métrica alar de populações de *T. b. brasiliensis* desta área são inexistentes, tornando-se necessários para o conhecimento das respostas fenotípicas desta subespécie frente a fatores bióticos/abióticos. No presente estudo, analisou-se o papel deste vetor nos ciclos transmissão de *T. cruzi* em localidades de Caicó e avaliou-se a possível influência do parasito, da fonte alimentar e do ecótopo na variabilidade morfológica das asas de *T. b. brasiliensis*. Capturas ativas e passivas em ecótopos naturais e artificiais foram realizadas em 18 localidades. Destas, cinco foram selecionadas para análises das populações de *T. b. brasiliensis* quanto à infecção natural, às fontes alimentares, à tipagem das Unidades Discretas de Tipagem (DTUs) e às variações morfométricas alares. A pesquisa de *T. cruzi* em amostras do conteúdo intestinal foi realizada pelo exame direto à fresco e pelo uso da PCR convencional multiplex para a amplificação do kDNA do protozoário e da subunidade 12S do gene ribossomal de triatomíneos. A identificação da fonte alimentar foi realizada pela amplificação e sequenciamento do gene citocromo B do DNA mitocondrial. Após o isolamento do parasito em meio de cultura, procedeu-se à caracterização dos isolados de *T. cruzi* em DTUs com base em três marcadores: análise do domínio divergente D7 do locus 24S α do DNA ribossomal, análise do gene mitocondrial citocromo oxidase II e análise da região intergênica *spliced leader* do gene mini-exon. A variabilidade morfológica das asas de populações de *T. b. brasiliensis* foi avaliada empregando a morfometria geométrica. Dos 1.147 espécimes capturados nas 18 localidades, *Triatoma b. brasiliensis* foi a subespécie mais abundante, representando 95,2% (1092/1147) dos triatomíneos capturados, seguida de *T. pseudomaculata* (4,6% - 53/1147) e de *T. petrocchiae* (0,2% - 2/1147). *Triatoma b. brasiliensis* foi o vetor que mais invadiu e colonizou o intradomicílio e, especialmente, o peridomicílio, distribuindo-se em uma variedade de ecótopos com elevada infestação de currais de boi. As pesquisas de *T. cruzi* mostraram altas taxas de infecção natural, considerando o exame direto (36% - 103/286), cultura (51% - 52/102) e PCR (58,9% - 165/280). Nove espécies de vertebrados foram identificadas, mostrando o hábito alimentar eclético de *T. b. brasiliensis*, sendo as mais frequentes: *Kerodon rupestris*, mocó (33% - 13/39); *Homo sapiens*, humano (20% - 8/39); *Bos taurus*, boi (15,4% - 6/39). A

caracterização genética de *T. cruzi* mostrou a circulação das DTUs TcI (67,9% - 19/28) e TcII (32,1% - 9/28) nas populações de *T. b. brasiliensis* com predominância de TcI no ambiente silvestre e peridomiciliar. As análises morfométricas das asas revelaram que não houve influência de *T. cruzi* no tamanho do centróide (TC) e na conformação, porém diferenças significativas no TC alar entre sexos, ecótopos e localidades foram detectadas, indicando possível influência do tipo/disponibilidade da fonte alimentar, efeito da densidade populacional e, possivelmente, isolamento por distância/barreira física entre as populações. As homogeneidades no TC (maioria das populações) e na conformação entre localidades refletem as similaridades das condições macro ambientais, pois estas situam-se no mesmo município com mesmo padrão climático do bioma Caatinga. Por outro lado, as diferenças na conformação ligadas ao sexo e ao ecótopo em populações de duas localidades sugerem influências das condições microclimáticas dos ecótopos e/ou do tipo/disponibilidade da fonte alimentar. Na perspectiva da dinâmica de transmissão de *T. cruzi* na área, a detecção das DTUs TcI e TcII e a expressiva identificação de *K. rupestris* e *H. sapiens* como fonte alimentar de espécimes infectados no ambiente peridomiciliar e silvestre sugerem que *K. rupestris* e *T. b. brasiliensis* podem estar atuando como elo de ligação entre os ciclos de transmissão silvestre e domiciliar de *T. cruzi*, evidenciando o risco real de transmissão para a população humana e animais domésticos. Estes resultados enfatizam a necessidade de ações de controle e vigilância entomológica e campanhas educativas contínuas para evitar a ocorrência de casos novos da doença de Chagas na área.

ABSTRACT

Eco-epidemiological Aspects and Analysis of Phenotypic changes in Populations of *Triatoma brasiliensis brasiliensis* from Caicó, Rio Grande do Norte, Brazil

Triatoma brasiliensis brasiliensis is autochthonous in Brazil, considered one of the most important vectors of *Trypanosoma cruzi* in northeastern semiarid areas. In the state of Rio Grande do Norte, the Seridó region is undergoing transformations due to the intense desertification process caused mainly by anthropogenic impacts on the Caatinga biome. In this context, information gathering on infestations of natural and artificial ecotopes by *T. b. brasiliensis* is important to prevent Chagas disease cases and outbreaks. Studies on the wing metric variability of *T. b. brasiliensis* populations from this area are non-existent, making it necessary to know the phenotypic responses of this subspecies to biotic/abiotic factors. In the present study, the role of this vector in *T. cruzi* transmission cycles in Caicó localities was analyzed and the possible influence of parasite, feeding patterns and ecotope on the morphological variability of the wings of *T. b. brasiliensis*. Active and passive captures in natural and artificial ecotopes were performed in 18 locations. Of these, five were selected for analyzes of *T. b. brasiliensis* for natural infection, feeding patterns, typing of DTUs and wing morphometric variations. *Trypanosoma cruzi* was searched in samples of intestinal content by direct microscopic examination and conventional multiplex PCR for protozoan kDNA amplification and 12S subunit of the triatomine ribosomal gene. The identification of the feeding patterns was performed by amplification and sequencing of the cytochrome B mtDNA gene. After isolation of the parasite in culture medium, the DTUs were molecularly characterized based on three markers: D7 domain of the 24S α rDNA gene, cytochrome oxidase subunit 2 gene and spliced leader intergenic region gene. The morphological variability of the wings of *T. b. brasiliensis* populations was evaluated using geometric morphometry. Of 1,147 specimens captured in 18 locations, *Triatoma b. brasiliensis* was the most abundant subspecies, representing 95.2% (1092/1147) of the captured triatomines, followed by *T. pseudomaculata* (4.6% - 53/1147) and *T. petrocchiae* (0.2% - 2/1147). *Triatoma b. brasiliensis* was the vector that most invaded and colonized the domestic and, especially, peridomestic areas, distributed in a variety of ecotopes with high infestation of cattle corrals. *Trypanosoma cruzi* research showed high rates of natural

infection, considering direct microscopic examination (36% - 103/286), culture (51% - 52/102) and PCR (58.9% - 165/280). Nine vertebrate species were identified, showing the eclectic feeding habits of *T. b. brasiliensis*, the most common being: *Kerodon rupestris*, mocó (33% - 13/39); *Homo sapiens*, human (20% - 8/39); *Bos taurus*, ox (15.4% - 6/39). Genetic characterization of *T. cruzi* showed the circulation of TcI (67.9% -19/28) and TcII (32.1% -9/28) DTUs in *T. b. brasiliensis* with predominance of TcI in the sylvatic and peridomestic environments. The morphometric analysis of the wings revealed that there was no influence of *T. cruzi* on centroid size (CS) and shape, but significant wing CS differences between sexes, ecotopes and localities were detected, indicating a possible influence of food source availability, population density effect and possibly isolation by distance/physical barrier between populations. The homogeneities in the CS (most populations) and in the shape between localities reflect the similarities of macroenvironmental conditions, as they are in the same municipality with the same climate pattern of the Caatinga biome. On the other hand, differences in shape related to sex and ecotope in populations of two localities suggest influences of microclimate conditions of ecotopes and/or the type/availability of food source. From the perspective of *T. cruzi* transmission dynamics, the detection of TcI and TcII and the expressive identification of *K. rupestris* as feeding pattern of infected specimens in the peridomiciliary and sylvatic areas suggest that *K. rupestris* and *T. b. brasiliensis* may be acting as a link between the *T. cruzi* sylvatic and peridomestic transmission cycles. These findings highlighting the risk of transmission to the human population and domestic animals and emphasize the need for entomological control and surveillance actions and ongoing community education to prevent the occurrence of new cases of Chagas disease in the area.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Informações gerais sobre doença de Chagas	1
1.2. Biologia e heterogeneidade de <i>T. cruzi</i>	8
1.3. Hospedeiros e reservatórios de <i>T. cruzi</i>	13
1.4. Os triatomíneos, a sua adaptação às habitações humanas e o controle vetorial no Brasil	14
1.5. Complexo <i>Triatoma brasiliensis</i> e sua importância epidemiológica	21
1.6. Plasticidade fenotípica e a Morfometria geométrica	28
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Geral.....	34
3.2. Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1. Área de estudo	36
4.1.2. Seleção das localidades de estudo em Caicó	39
4.2. Captura de triatomíneos.....	41
4.3. Identificação e manutenção dos triatomíneos	46
4.4. Processamento do material biológico, exame parasitológico do conteúdo intestinal e isolamento de <i>T. cruzi</i>	47
4.5. Análise molecular da fonte alimentar e da infecção natural por <i>T. cruzi</i>	50
4.5.1. Extração de DNA.....	50
4.5.2. Identificação molecular de <i>T. cruzi</i>	50
4.5.3. Identificação das fontes alimentares	51
4.6. Caracterização molecular de <i>T. cruzi</i>	52
4.7. Análise das alterações morfológicas das asas de populações de	54
4.7.1. Espécimes utilizados	54
4.7.2. Análises morfométricas e estatísticas	57
5. RESULTADOS.....	60

5.1. Captura de triatomíneos e fauna observada	60
5.2. Infecção Natural por <i>T. cruzi</i>	72
5.2.1. Microscopia óptica (MO).....	72
5.2.2. Meio de Cultura (MC)	73
5.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	74
5.3. Identificação das fontes alimentares	77
5.4. Caracterização molecular de <i>T. cruzi</i>	83
5.5. Análise das alterações morfológicas das asas de populações de <i>T. b. brasiliensis</i> de Caicó, RN.....	88
5.5.1. Variação do tamanho.....	88
5.5.2. Variação da conformação e alometria	98
6. DISCUSSÃO.....	113
6.1. Captura de triatomíneos e fauna observada	113
6.2. Infecção Natural por <i>T. cruzi</i> , fonte alimentar identificada e caracterização molecular de <i>T. cruzi</i>	121
6.3. Análise das alterações morfológicas das asas de populações de <i>T. b. brasiliensis</i> das localidades de estudo em Caicó, RN.....	128
6.3.1. Variação do Tamanho	128
6.3.2. Variação da forma e alometria.....	135
7. CONCLUSÕES.....	140
8. PERSPECTIVAS.....	143
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Número estimado de imigrantes com infecção pelo *Trypanosoma cruzi* que vivem em países não endêmicos. Fonte: Adaptado de Rassi et al (2010).....3
- Figura 1.2.** Distribuição de casos da doença de Chagas aguda (DCA) confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Brasil. **A.** Período de 2001-2006, **B.** Período de 2007-2017. Fontes de dados: SINAN (2019), Limite estadual: IBGE (2010) Geoprocessamento: a autora.....5
- Figura 1.3.** Distribuição de casos da doença de Chagas aguda (DCA) confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no estado do Rio Grande do Norte no período de 2001-2017. Fontes de dados: SINAN (2019), Limite estadual: IBGE (2010). Geoprocessamento: a autora.....7
- Figura 1.4:** Representação esquemática do desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* com suas formas amastigota e tripomastigota sanguíneas no hospedeiro mamífero e formas epimastigotas e tripomastigota metacíclica no triatomíneo. Fonte: Teixeira et al 2012.....9
- Figura 1.5:** Membros do complexo de espécies *Triatoma brasiliensis*: **A.** *Triatoma b. brasiliensis* (verde), **B.** *Triatoma b. macromelasoma* (roxo), **C.** *Triatoma juazeirensis* (vermelho), **D.** *Triatoma melanica* (azul) e **E.** *Triatoma sherlocki* (laranja), escala: 0,5 cm (Fonte: Lima-Neiva 2014). **F.** *Triatoma bahiensis*, **G.** *Triatoma lenti* (Fonte: Mendonça et al 2016), **H.** *Triatoma petrocchiae* (Fonte: Galvão e Gurgel-Gonçalves 2015). **I.** Mapa de hipótese (linhas) e os dados de ocorrência (pontos) para os 5 membros. **J.** Dados de ocorrência (pontos) e distribuições potenciais atuais para 5 membros. Fonte: Adaptado de Costa et al 2014.....22
- Figura 4.1.** Mapa do Rio Grande do Norte com a divisão das mesorregiões, microrregiões Ocidental e Oriental da região do Seridó e municípios. Ponto em vermelho destacando o município de Caicó e ponto verde o município de São Fernando.....36

Figura 4.2. Variáveis climáticas registradas mensalmente para o município de Caicó em 2016. Fonte de dados: INMET, estação meteorológica 82690 Caicó.....37

Figura 4.3. Localização dos pontos de coleta nas áreas de estudo dos municípios de Caicó e São Fernando, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Geoprocessamento: a autora.....39

Figura 4.4. Pesquisa entomológica no ambiente intradomiciliar das UDs na área rural de Caicó, RN. **A.** Busca ativa embaixo do colchão, **B.** detecção de vestígios de fezes de triatomíneo na parede, **C.** ninfa de 5^o estágio em uma casa desabitada (retângulos azuis), **D.** vistoria em um ninho de galinha mantido no interior do domicílio, **E.** vistoria de caixas de papelão que estavam embaixo da cama, **F.** ninfa de 5^o estágio encontrada nas caixas de papelão embaixo da cama (ao fundo um ninho de galinha mantido dentro do quarto, seta azul clara). Fotos: acervo da autora.....41

Figura 4.5. Pesquisa entomológica no ambiente peridomiciliar das UDs em áreas rurais de Caicó, RN. **A.** Casa construída de concreto e ao fundo um galinheiro encostado na parede da casa (seta azul clara), **B.** curral de bovinos composto por muro de pedras (seta azul claro), **C.** vistoria de uma pilha de telhas, **D.** chiqueiro de porco construído ao redor de um afloramento rochoso: cobertura (seta contínua, cerca de estacas (seta pontilhada), afloramento rochoso (seta tracejada), **E.** pedra com resíduo de sangue usada para matar triatomíneos no dia anterior a nossa visita (retângulo preto), **F.** ninfa de 3^o estágio encontrada em uma cerca de pedra a 10 metros da casa. Fotos: acervo da autora.....42

Figura 4.6. Pesquisa entomológica no ambiente silvestre a ~20-300m das UDs em áreas rurais de Caicó, RN. **A.** Vista geral do afloramento rochoso com vegetação típica do bioma Caatinga, **B.** coleta noturna, **C.** armadilhas de Noireau preparadas para a instalação (seta azul clara), **D.** armadilha presa a uma vara (~ 2,5m) para possibilitar o seu posicionamento no interior da fenda da rocha, **E.** instalação de uma armadilha em um serrote (muro de pedra), **F.** ninfa de 5^o estágio presa na fita adesiva da armadilha. Fotos: acervo da autora.....43

Figura 4.7. A. Colônias de <i>T. b. brasiliensis</i> mantidas no insetário do LIVDH, B. Espécimes individualizados em tubos Falcon 25mL para posterior dissecação. Fotos: acervo da autora.....	46
Figura 4.8. Obtenção das amostras do conteúdo intestinal dos espécimes de <i>T. b. brasiliensis</i> . A. Cabina de Biossegurança onde os insetos foram dissecados, B. Exemplo de um espécime no momento da dissecação com suas asas extirpadas, C. Ninfa de 5 ^o estágio ingurgitada em um <i>Eppendorf</i> de 1,5 mL, onde suas fezes foram eliminadas de forma espontânea, D. Checagem de possível contaminação das culturas (NNN/LIT) por fungos para posterior checagem quanto à positividade do parasito, E. Observação ao microscópio óptico (400x) de alíquota de cultura positiva rica em flagelados, F. Massa de parasitos (seta azul clara) em meio LIT. Fotos: acervo da autora.....	48
Figura 4.9. Protocolo para genotipagem proposto por D'Ávila et al (2009) usando um ensaio de três etapas: análise do polimorfismo do gene mitocondrial da subunidade citocromo oxidase 2 (COII), amplificação do domínio divergente D7 do gene 24Sα rDNA e amplificação da região intergênica <i>spliced leader</i> (SL-IR). Fonte: Martins et al (2015).....	52
Figura 4.10. A-B. Montagem de uma asa esquerda em álcool 70% entre lâmina e lamínula para ser fotografada. Fotos: acervo da autora.....	56
Figura 4.11. Asa direita de <i>T. b. brasiliensis</i> mostrando os oito Pontos Anatômicos de Referência (PAR) do tipo I: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 utilizados para as análises morfométricas. Fotos: acervo da autora.....	57
Figura 5.1. Distribuição dos triatomíneos, de acordo com as fases de desenvolvimento, coletados em 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte. N1. ninfas de 1 ^o estágio, N2. ninfas de 2 ^o estágio, N3. ninfas de 3 ^o estágio, N4. ninfas de 4 ^o estágio, N5. ninfas de 5 ^o estágio, Ad. adultos.....	63

Figura 5.2. Distribuição dos triatomíneos coletados nos ecótopos naturais e artificiais de 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte.....65

Figura 5.3. Distribuição das espécies de triatomíneos coletadas nos ecótopos naturais e artificiais de 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte. Abreviações: ni. não informado, af. Rochoso, P. afloramento rochoso peridomicílio, serrote P. cerca de pedras peridomicílio, serrote S. cerca de pedras silvestre, af. rochoso S. afloramento rochoso silvestre.....66

Figura 5.4. Fauna de vertebrados observada durante as capturas de triatomíneos no intradomicílio das UDs da área rural dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte. **A.** Cadela alimentando os seus filhotes na despensa, **B.** galinha chocando ovos no quarto, **C.** morcego no chão, **D.** roedor escalando a parede de uma casa desabitada a uma distância de ~20m da casa habitada, **E.** sapo atrás do guarda roupa, **F.** gato transitando no quarto. Fotos: acervo da autora.....68

Figura 5.5. Fauna de vertebrados observada durante as capturas de triatomíneos no peridomicílio das UDs da área rural dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte. **A.** cabra dentro do curral, **B.** carneiros no quintal bebendo água, **C.** vacas e bezerros dentro do curral: bezerro (seta tracejada), cerca de pedras ao redor do curral (seta pontilhada), cacto *Opuntia cochenillifera* (palma) usado para alimentar bovinos, **D.** cachorro doente amarrado em uma árvore, **E.** cavalos alimentando-se no interior de um estábulo, **F.** coelho (seta azul clara), galinhas e patos em um abrigo, **G.** Pavão dentro do galinheiro, **H.** galinha da angola (seta pontilhada) e peru (seta tracejada) dentro do galinheiro. Fotos: acervo da autora....69

Figura 5.6. Roedor mocó (*K. rupestris*) observado durante as capturas de triatomíneos no ambiente silvestre modificado a uma distância de 20 a 300 m das UDs da área rural dos municípios de Caicó, Rio Grande do Norte. **A-B.** mocós em um afloramento rochoso com vestígios de urina (seta azul), **C.** árvores do entorno dos afloramentos rochosos com galhos parcialmente roídos supostamente pelo mocó, **D.** acúmulo de fezes e vestígios de urina nos sulcos das rochas do afloramento rochoso habitado pelos mocós. Fotos: acervo da autora.....70

Figura 5.7. Índice de infecção natural de *T. b. brasiliensis*, avaliados pela MO (n= 286), coletados em diferentes ecótopos do peridomicílio e do ambiente silvestre das localidades: Pedregulho, Inácio, SSBE (Sítio São Bernardo de Elias), SRS (Sítio Riacho do Santo) e BEC (Batalhão de Engenharia de Construção) do município de Caicó, Rio Grande do Norte. Serrote. cerca de pedras, P. peridomicílio, Silv. silvestre.....72

Figura 5.8. Análise, via PCR, da região hipervariável dos minicírculos do kDNA para identificação molecular de *T. cruzi*. Canaleta 1. CN controle negativo (reagentes da PCR sem DNA); canaletas 2. Tb547, 3. Tb885, 5. Tb985, 6. Tb117 e 8. Tb107 espécimes infectados por *T. cruzi*; canaleta 7. Tb902 espécime infectado por *T. cruzi* e por *T. rangeli*; canaleta 4. Tb106 espécime não infectado; canaleta 9. Tc controle positivo de *T. cruzi* (DNA extraído, Cepa Y); canaleta 10: Controle positivo de *T. rangeli* (DNA extraído, Cepa Macias). M. Marcador Molecular. Gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio.....74

Figura 5.9. Índice de infecção natural de *T. b. brasiliensis*, avaliados pela PCR (n= 280), coletados em diferentes ecótopos do peridomicílio e do ambiente silvestre das localidades: Pedregulho, Inácio, SSBE (Sítio São Bernardo de Elias), SRS (Sítio Riacho do Santo) e BEC (Batalhão de Engenharia de Construção) do município de Caicó, Rio Grande do Norte. a. afloramento rochoso, serrote. cerca de pedras, P. peridomicílio, S. silvestre.....76

Figura 5.10. Gel de agarose (1,5%) mostrando os produtos de amplificação do gene *Cyt B* pela Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando os iniciadores L14841/H15149 para identificação das fontes alimentares de *T. b. brasiliensis*. Canaleta 1. CP controle positivo (DNA extraído de amostra de sangue de porco doméstico *Sus domesticus*); canaleta 2. CN controle negativo (reagentes sem DNA); amostras de conteúdo intestinal de *T. b. brasiliensis* que amplificaram para o fragmento 375pb: canaleta 3. Tb550, 4. Tb658, 5. Tb125, 6. Tb310, 7. Tb298, 8. Tb630, 9. Tb600 10. Tb748, 11. Tb945 e 12. Tb710. M Marcador Molecular de 100pb.....77

Figura 5.11. Distribuição das fontes alimentares de *T. b. brasiliensis* identificadas através do sequenciamento do gene *Cyt B* presente no conteúdo intestinal de espécimes, **A.** independente da positividade e **B.** dos positivos, capturados em ecótopos naturais e artificiais das localidades: Pedregulho, Inácio, Sítio São Bernardo de Elias, Sítio Riacho do Santo e Batalhão de Engenharia de Construção do município de Caicó, Rio Grande do Norte..... 81

Figura 5.12. Distribuição das fontes alimentares de *T. b. brasiliensis* identificadas através do sequenciamento do gene *Cyt B* do mtDNA presente no conteúdo intestinal de espécimes capturados no curral de boi (peridomicílio) e nos afloramentos rochosos (silvestre modificado e conservado) das localidades: Pedregulho, Inácio, Sítio São Bernardo de Elias, Sítio Riacho do Santo e Batalhão de Engenharia de Construção do município de Caicó, Rio Grande do Norte.....82

Figura 5.13. Distribuição das fontes alimentares de *T. b. brasiliensis* identificadas através do sequenciamento do gene *Cyt B* do mtDNA presente no conteúdo intestinal de espécimes infectados com *T. cruzi* capturados no curral de boi (peridomicílio) e nos afloramentos rochosos (silvestre modificado e conservado) das localidades: Sítio Pedregulho, Sítio Inácio, Sítio São Bernardo de Elias, Sítio Riacho do Santo e Batalhão de Engenharia de Construção do município de Caicó, Rio Grande do Norte.....83

Figura 5.14. Géis de agarose (3,5%) representativos do ensaio em três etapas para caracterização dos isolados de *T. cruzi* em DTUs. **A.** Análise por RFLP do gene mitocondrial COII: canaleta 1. CN controle negativo; canaletas 2. Tb169, 4. Tb798 e 6. Tb869 fragmentos de restrição de 264, 81 e 30pb classificados como TcI (haplótipo mitocondrial A); canaleta 3. Tb629 e 5. Tb828 fragmentos de restrição de 212 e 81pb classificados como TcII (haplótipo mitocondrial C). Cepas e clones de *T. cruzi* usados como referência: canaletas 7. DM28 (TcI, haplótipo mitocondrial A); 8.Y (TcII, haplótipo mitocondrial C), 9. 3663, 10. Z3, 11. LL014 e 12. CL Brenner fragmentos de restrição de 294 e 81pb (TcIII-TcVI, haplótipo mitocondrial B). **B.** Análise do domínio divergente D7 do locus 24S α do rDNA: canaleta 1. CN - controle

negativo; canaletas 2. Tb169 (não amplificou), 3. Tb629 (125pb), 4. Tb798 (110pb), 5. Tb 828 (125pb) e 6. Tb869 (110pb). Cepas e clones de *T. cruzi* usados como referência: canaletas 9. DM28 (110pb); 10.Y (125pb), 11. 3663 (110pb). 12. Z3 (117-119pb), 13. LL014 (125pb), 14. CL Brenner (125pb). **C.** Análise do gene SL-IR para separar isolados de TcIII e TcIV de outras DTUs: canaleta 1. CN - controle negativo; canaletas 2. Tb169 (150pb), 3. Tb629 (150pb), 4. Tb798 (150pb), 5. Tb828 (150pb) e 6. Tb869 (150pb). Cepas e clones de *T. cruzi* usados como referência: canaletas 6. DM28 (150pb); 7.Y (150pb), 8. 3663 (200pb). 9. Z3 (200pb), 10. LL014 (150pb), 11. CL Brenner (150pb). M. Marcador Molecular de 50pb.....84

Figura 5.15. Distribuição das DTUs de *T. cruzi* isoladas de *T. b. brasiliensis* capturados no curral de boi (peridomicílio) e nos afloramentos rochosos (silvestre modificado e conservado) das localidades: Pedregulho, Inácio, SSBE (Sítio São Bernardo de Elias), SRS (Sítio Riacho do Santo) e BEC do município de Caicó, Rio Grande do Norte.....85

Figura 5.16. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* do peridomicílio entre sexos. **A.** Inácio (I), **B.** Pedregulho (P), **C.** Sítio Riacho do Santo (SRS) **D.** Sítio São Bernardo de Elias (SSBE). O número de asas testadas está entre parênteses, letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste t Student, $p < 0,0001$).....89

Figura 5.17. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* do ambiente silvestre entre sexos. **A.** Inácio (I), **B.** Pedregulho (P), **C.** Sítio Riacho do Santo (SRS) **D.** Batalhão de Engenharia de Construção (BEC). O número de asas testadas está entre parênteses, letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste t Student, $p < 0,0001$)..... 90

Figura 5.18. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* entre fêmeas dos ambientes peridomiciliar e silvestre. **A.** Inácio (I), **B.** Pedregulho (P), **C.** Sítio Riacho do Santo (SRS), **D.** Sítio São Bernardo de Elias (SSBE). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste t Student, $p < 0,0001$).....91

Figura 5.19. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* entre machos dos ambientes peridomiciliar e silvestre. **A.** Inácio (I), **B.** Pedregulho (P), **C.** Sítio Riacho do Santo (SRS), **D.** Sítio São Bernardo de Elias (SSBE). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste t Student, $p < 0,0001$).....92

Figura 5.20. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações do peridomicílio (peri) e do ambiente silvestre (silv) de *T. b. brasiliensis* entre as localidades Inácio (I), Pedregulho (P), Sítio Riacho do Santo (SRS), Sítio São Bernardo de Elias (SSBE) e Batalhão de Engenharia de Construção (BEC). **A.** fêmeas peridomicílio, **B.** fêmeas ambiente silvestre, **C.** machos do peridomicílio e **D.** machos do ambiente. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste Tukey-Kramer, $p < 0,0001$).....94

Figura 5.21. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de *T. b. brasiliensis* entre grupos infectados e não infectados com *T. cruzi* provenientes das localidades: Inácio, Pedregulho, SRS (Sítio Riacho do Santo) e SSBE (Sítio São Bernardo de Elias). **A.** Fêmeas e **B.** machos do peridomicílio. O número de asas testadas está entre parênteses, letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey-Kramer, $p < 0,001$).....96

Figura 5.22. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* entre grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*, provenientes do ambiente silvestre conservado do BEC (Batalhão de Engenharia de Construção) e do ambiente silvestre modificado de Pedregulho. **A.** Fêmeas e **B.** machos. O número de asas testadas está entre parênteses, letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey-Kramer, $p < 0,001$).....97

Figura 5.23. Histograma de distribuição dos espécimes de *T. b. brasiliensis*, com base no Fator Discriminante 1 (derivado dos componentes principais) da variação da conformação, resultante da comparação entre as asas de machos e fêmeas do peridomicílio. **A.** Inácio, **B.** Pedregulho, **C.** Sítio Riacho do Santo, **D.** Sítio São

Bernardo de Elias. Observar que a sobreposição parcial entre machos e fêmeas de Inácio foi significativa $p < 0,05$ (1000 bootstraps, Zelditch et al 2004)..... 99

Figura 5.24. Histograma de distribuição dos espécimes de *T. b. brasiliensis*, com base no Fator Discriminante 1 (derivado dos componentes principais) da variação da conformação, resultante da comparação entre as asas de machos e fêmeas do ambiente silvestre (modificado e conservado). **A.** Inácio, **B.** Pedregulho, **C.** Sítio Riacho do Santo e **D.** Batalhão de Engenharia de Construção..... 101

Figura 5.25. Histograma de distribuição de **fêmeas** de *T. b. brasiliensis*, com base no Fator Discriminante 1 (derivado dos componentes principais) da variação da conformação, resultante da comparação entre as asas de espécimes do peridomicílio e do ambiente silvestre. **A.** Inácio, **B.** Pedregulho, **C.** Sítio Riacho do Santo. Peri. Peridomicílio, silv. silvestre modificado..... 103

Figura 5.26. Histograma de distribuição de **machos** de *T. b. brasiliensis*, com base no Fator Discriminante 1 (derivado dos componentes principais) da variação da conformação, resultante da comparação entre as asas de espécimes do peridomicílio e do ambiente silvestre. **A.** Inácio, **B.** Pedregulho, **C.** Sítio Riacho do Santo. Peri. Peridomicílio, silv. silvestre modificado.....104

Figura 5.27. Mapas Fatoriais gerados com base nos dois fatores discriminantes da variação da conformação (derivados dos componentes principais das variáveis de conformação) de asas de *T. b. brasiliensis*, resultante da comparação dos grupos entre localidades. **A.** fêmeas e **B.** machos do peridomicílio e **C.** fêmeas e **D.** machos do ambiente silvestre. Os polígonos coloridos representam a localidade de origem das populações e os pontos representam os espécimes. O número de espécimes testados está entre parênteses..... 107

Figura 5.28. Mapas Fatoriais gerados com base nos dois fatores discriminantes da variação da forma (CV1 e CV2) de asas de *T. b. brasiliensis*, mostrando a distribuição dos grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*. **A.** fêmeas e **B.** machos do peridomicílio e **C.** fêmeas do ambiente silvestre. Os polígonos coloridos

representam a localidade de origem das populações e os pontos representam os espécimes. O número de espécimes testados está entre parênteses..... 110

Figura 5.29. Gráfico em árvore de similaridade morfológica gerado pelo método de ligação simples (*single linkage*), com base nos valores das distâncias de Mahalanobis obtidas na análise discriminante, para testar a separação de grupos de *T. b. brasiliensis* quanto a infecção natural por *T. cruzi*. **A.** Fêmeas peridomicílio, **B.** Machos peridomicílio, **C.** Fêmeas silvestres. Abreviações: ip (Inácio positivo), in (Inácio negativo), pp (Pedregulho positivo), pn (Pedregulho negativo), rp (SRS positivo), rn (SRS negativo), bp (BEC positivo), bn (BEC negativo), sp (SSBE positivo), sn (SSBE negativo)..... 112

Figura 6.1. Caracterização das áreas de ocorrência de desertificação no estado do Rio Grande do Norte. Núcleo de Desertificação do Seridó: desertificação de áreas degradadas pela extração de argila e pelo uso da terra para o cultivo de algodão que, posteriormente, foi abandonada (MMA 2007). Fonte do mapa: adaptado de Carvalho, Gariglio e Barcellos, 2000. Geoprocessamento: a autora117

Figura 6.2. Distribuição espacial e temporal de triatomíneos (*T. b. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. petrocchiae*, *P. lutzi* e *R. nasutus*) no estado do Rio Grande do Norte com base nos dados fornecidos pela SESAP-RN no período de 2005-2015.....119

Figura 6.3. Distribuição espacial e temporal de triatomíneos (*T. b. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. petrocchiae*, *P. lutzi* e *R. nasutus*) infectados por *T. cruzi* no estado do Rio Grande do Norte com base nos dados fornecidos pela SESAP-RN no período de 2005-2015.....120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Mudanças na mortalidade, prevalência e incidência por transmissão vetorial da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010. Fonte: Dias et al (2016).....	2
Tabela 4.1. Características climáticas de Caicó em 2016.....	38
Tabela 4.2. Distância dos pontos de coleta no ecótopo silvestre modificado até as UD's e observação de sinais de interferência humana ou de animais domésticos.....	40
Tabela 4.3. Número de asas (direita e esquerda) de <i>T. b. brasiliensis</i> fotografadas separadas por localidade, ambiente e sexo. Os números de asas direitas selecionadas e usadas nas análises da MG entre localidades e ecótopos estão destacados em cinza.....	54
Tabela 4.4. Número de asas (direita e esquerda) de <i>T. b. brasiliensis</i> usadas nas análises da MG entre grupos positivos e negativos, segundo a infecção natural por <i>T. cruzi</i> , empregando a PCR.....	55
Tabela 5.1. Número de espécimes de triatomíneo por espécie, ambiente e fase de desenvolvimento coletados nas 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte, em novembro de 2016.....	60/61
Tabela 5.2. Número de espécimes de triatomíneos por ambiente, espécie, fase de desenvolvimento e proporção de ninfas e adultos capturados em 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte.....	62
Tabela 5.3. Número de triatomíneos coletados por ambiente e ecótopo provenientes de 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte.....	64

Tabela 5.4. Fauna de vertebrados e invertebrados observada durante as capturas de triatomíneos em diferentes ecótopos dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte.....	67
Tabela 5.5. Índice de Infecção Natural, empregando a microscopia óptica, de <i>T. b. brasiliensis</i> , coletado em diferentes ambientes de 5 localidades do município de Caicó, Rio Grande do Norte.....	71
Tabela 5.6. Índice de Infecção Natural, por meio do semeio de amostras de conteúdo intestinal em meio de cultura, de <i>T. b. brasiliensis</i> coletados em diferentes ambientes de 5 localidades do município de Caicó, Rio Grande do Norte.....	73
Tabela 5.7. Índice de Infecção Natural, utilizando a PCR convencional multiplex, de <i>T. b. brasiliensis</i> , coletados em diferentes ambientes de 5 localidades do município de Caicó, Rio Grande do Norte.....	75
Tabela 5.8. Lista das fontes alimentares e da infecção natural por <i>T. cruzi</i> de <i>T. b. brasiliensis</i> capturados no intradomicílio, peridomicílio e ambiente silvestre de diferentes localidades de Caicó, Rio Grande do Norte. As Fontes alimentares detectadas em vetores infectados pelo <i>T. cruzi</i> estão em negrito.....	79/80
Tabela 5.9. Lista das DTUs de <i>T. cruzi</i> isoladas de <i>T. b. brasiliensis</i> capturados no peridomicílio e no ambiente silvestre (modificado e conservado) das localidades de Caicó, Rio Grande do Norte.....	86/87
Tabela 5.10. Resumo da análise discriminante par a par entre machos e fêmeas de populações de <i>T. b. brasiliensis</i> do ambiente peridomiciliar das localidades de estudo de Caicó, RN.....	100
Tabela 5.11. Resumo da análise discriminante par a par entre machos e fêmeas de <i>T. b. brasiliensis</i> do ambiente silvestre de algumas localidades de Caicó, RN.....	100
Tabela 5.12. Resumo da análise discriminante par a par entre fêmeas de <i>T. b. brasiliensis</i> do peridomicílio e silvestres de algumas localidades de Caicó, RN.....	105

Tabela 5.13. Resumo da análise discriminante par a par entre machos de *T. b. brasiliensis* do peridomicílio e silvestres de algumas localidades de Caicó, RN.
.....105

Tabela 5.14. Teste de classificação validada empregando o método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood- MLi*), com base nos primeiros componentes principais das variáveis de conformação, para espécimes de *T. b. brasiliensis* entre as localidades de estudo de Caicó, RN..... 108

Tabela 5.15. Reclassificação validada empregando o método de Máxima Verossimilhança, com base nos primeiros componentes principais da conformação, para espécimes de *T. b. brasiliensis* do peridomicílio e do ambiente silvestre entre grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*, conforme resultados da PCR.....111

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACP- Análise de Componentes Principais

Ad. Adultos

AD – Asa direita

AE – Asa Esquerda

AGP - Análise Generalizada de Procrustes

Alu I - *Arthrobacter luteus* (endonuclease de restrição)

AnD - Análise Discriminante

ANOVA_{FP} – Análise de Variância das Fêmeas do Peridomicílio

ANOVA_{FP} – Análise de Variância das Fêmeas Silvestres

ANOVA_{MP} - Análise de Variância dos Machos do Peridomicílio

ANOVA_{MS} - Análise de Variância dos Machos do Silvestres

BHC – Hexaclorobenzeno (Gammexane)

BA – Bahia

BEC – Batalhão de Engenharia de Construção de Caicó

bn - BEC negativo

bp - BEC positivo

CE – Ceará

CEIOC- Coleção Entomológica do Instituto Oswaldo Cruz

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

COII – Citocromo Oxidase II

Cyt b - Citocromo b

DC - Doença de Chagas

DCA – Doença de Chagas Aguda

DM - distância de Mahalanobis

DM_I - distância de Mahalanobis Inácio

DM_P - distância de Mahalanobis Pedregulho

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxirribonucleotídeo trifosfato

DS – Dimorfismo Sexual

DTUs – Unidades Discretas de Tipagem

F – Fêmea

F_{F,P} – Valor de F do ANOVA para Fêmeas do Peridomicílio

$F_{M,P}$ - Valor de F do ANOVA para Machos do Peridomicílio
 $F_{M,S}$ - Valor de F do ANOVA para Machos Silvestres
 $F_{F,S}$ - Valor de F do ANOVA para Fêmeas Silvestres
FD1 – Fator Discriminante 1
FD2 – Fator Discriminante 2
GO – Goiás
IN – Infecção Natural
INMET – Instituto Nacional de Meteorologia
ip - Início positivo
in - Início negativo
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
kDNA - Ácido desoxirribonucléico do Kinetoplasto
LIVEDH – Laboratório Interdisciplinar de Vigilância em Diptera e Hemiptera
LIT - Liver Infusion Tryptose
LDMH - Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia
M - Molar
MA - Maranhão
Mc – Macho
MC – Meio de Cultura
mtDNA - Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
MeC - Mesorregião Central
MeO - Mesorregião Oeste
Mg - Microgramas
MG – Minas Gerais
MoG – Morfometria Geométrica
 $MgCl_2$ - Cloreto de Magnésio
Min – Minuto
MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLi - Maximum likelihood
mL - Mililitros
 μL – Microlitros
Mm - Milímetros
mM – Milimolar
MO – Microscopia Óptica

NNN - Novyl & McNeal e Nicolle
nm – nanômetro
ng - nanograma
N - Ninfas
N1 - Ninfas de primeiro estágio
N2 - Ninfas de segundo estágio
N3 - Ninfas de terceiro estágio
N4 - Ninfas de quarto estágio
N5 - Ninfas de quinto estágio
OMS - Organização Mundial de Saúde
OPAS - Organização Panamericana de Saúde
ORP - Projeções Ortogonais
PARs - Pontos Anatômicos de Referência
pb - Pares de bases
PB - Paraíba
PBS - Phosphate Buffer Saline
PE - Pernambuco
PCDCh - Programa de Controle da Doença de Chagas
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PI - Piauí
pn - Pedregulho negativo
Pmol – Picomol
pp - Pedregulho positivo
pH - Potencial Hidrogeniônico
RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism
rn - SRS negativo
RNA – Ácido Ribonucleico
rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal
rp - SRS positivo
rpm - Rotações por minuto
RN - Rio Grande do Norte
SC – Silvestre Conservado
SDS - dodecilsulfato de sódio

SES - Secretaria Estadual de Saúde
SESAP – Secretaria do Estado de Saúde Pública
SM – Silvestre Modificado
sn - SSBE negativo
sp - SSBE positivo
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SL-IR – Região Intergênica Spliced Leader
SRS – Sítio Riacho dos Santos
SSBE – Sítio São Bernardo de Elias
TC – Tamanho Centróide
TC_{FP} - Tamanho Centróide de Fêmeas do Peridomicílio
TC_{FP} - Tamanho Centróide de Fêmeas Silvestres
TC_{MP} - Tamanho Centróide de Machos do Peridomicílio
TC_{MP} - Tamanho Centróide de Machos Silvestres
TC_{F,Neg} - Tamanho Centróide de Fêmeas Negativas
TC_{F,Pos} - Tamanho Centróide de Fêmeas Positivas
TC_{M,Pos} - Tamanho Centróide de Machos Positivos
TC_{M,Neg} - Tamanho Centróide de Machos Negativos
Tcl – *T. cruzi I*
Tcl – *T. cruzi II*
Tcl – *T. cruzi III*
Tcl – *T. cruzi IV*
Tcl – *T. cruzi V*
Tcl – *T. cruzi VI*
TO - Tocantins
U - Unidade
UDs -Unidades Domiciliares
VE - Vigilância Entomológica
WHO - World Health Organization
Z1 - Zimodema 1
Z2 - Zimodema 2
Z3 - Zimodema 3

1. INTRODUÇÃO

1.1. Informações gerais sobre doença de Chagas

Há 110 anos, Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas anunciou a descoberta de uma nova doença: a Tripanossomíase Americana, a qual foi dado o seu nome em sua homenagem, doença de Chagas (DC). Durante o seu trabalho na campanha de controle da Malária, na região de Lassance, estado de Minas Gerais (MG), o médico brasileiro identificou o primeiro caso humano da doença e subsequentemente reconheceu o agente etiológico [*Schizotrypanum n. gen., n. sp.*, depois *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909], o inseto hematófago vetor [*Conorhinus sp.*, depois *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835)] e o reservatório silvestre (tatu), determinando assim o ciclo de transmissão (Lent 1999). A descoberta representou não apenas uma contribuição inovadora no campo da Medicina Tropical como também expôs a realidade sanitária e social do Brasil, assolada pelas endemias rurais (Chagas 1909).

Na ocasião da sua descoberta, e até a atualidade, a DC tem representado um problema de saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (OMS) a classifica como uma doença tropical negligenciada, por apresentar os seguintes fatores: (i) forte associação com a pobreza; pois se desenvolve em locais esquecidos pelo progresso socioeconômico, onde as habitações humanas são precárias, sem saneamento, onde não há acesso a água potável, aos serviços de saúde e, principalmente, onde há desmatamento intensivo; (ii) desenvolve-se melhor em áreas tropicais e; (iii) do ponto de vista da indústria farmacêutica, a doença não é atrativa para investimentos em novos medicamentos, uma vez que as pessoas afetadas por essa enfermidade fazem parte de segmentos sociais com baixo poder aquisitivo (WHO 2010).

A infecção por *T. cruzi* ocorria, primeiramente, como uma enzootia pelo fato do parasito circular entre mamíferos e triatomíneos silvestres presentes nos biótopos naturais (Coura, 2003). Posteriormente, o homem foi incluído no ciclo de transmissão do parasito com a sua chegada ao continente americano, há aproximadamente 15 mil anos (Guhl et al 2000, Afderheide et al 2004). O estabelecimento de moradias próximas ao ambiente silvestre e as ações antrópicas nos biótopos naturais intensificaram a participação do homem no ciclo do

protozoário e a doença tornou-se uma antropozoonose, espalhando-se pela América Latina em função também de fatores de naturezas política, social e econômica (Dias & Borges 1979, Forattini 1980). Além da dispersão na América Latina, houve também a dispersão passiva de *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) para o Velho Mundo na época das grandes navegações (Lent & Wygodzinsky 1979). O desequilíbrio ecológico, causado pelo homem em decorrência das suas alterações nos ambientes naturais, possibilitou a aproximação dos triatomíneos e permitiu a adaptação de algumas espécies às habitações humanas nas zonas rurais. No entanto, nos últimos anos, focos urbanos estão sendo reportados, como é o caso de *T. rubrofasciata* na cidade de Hanoi, Vietnã (Truong & Dujardin 2013, Dujardin et al 2015) e *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) em Boa Vista, Roraima, Brasil (Ricardo-Silva et al 2016). Adicionalmente, registros de invasões de *T. rubrofasciata* em novas áreas (Liu et al 2017) e relatos de graves alergias às picadas desta espécie estão sendo reportados na China (Huang et al 2018).

Os últimos dados apresentados pela OMS indicam que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas por *T. cruzi*, das quais a maioria concentra-se em áreas endêmicas de 21 países da América Latina (WHO 2010). Entre estes países, destacam-se aqueles que apresentam maior número de infectados: Argentina (1.505.235), Brasil (1.156.821), México (876.458) e Bolívia (607.186) (WHO, 2010). Dias et al (2016) discorreu que, apesar da progressiva diminuição das estimativas dos índices epidemiológicos na América Latina (Tabela 1.1), esta enfermidade atinge um expressivo número de pessoas no contexto sanitário e social do continente, requerendo prioridade e atenção por parte destes países.

Tabela 1.1. Mudanças na mortalidade, prevalência e incidência por transmissão vetorial da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010. Fonte: Dias et al (2016).

Parâmetros – estimativas	1990	2000	2006	2010
Número de mortes/ano	>45.000	21.000	12.500	12.000
Número de pessoas infectadas	30.000.000	18.000.000	15.000.000	5.742.167
Casos novos/ano – transmissão vetorial	700.000	200.000	41.200	29.925
População total sob risco	100.000.000	40.000.000	28.000.000	70.199.360

Fonte: Adaptado de Pan American Health Organization, 200617 (TDR/WHO, PAHO, WHO); de World Health Organization, 2015.⁵

Apesar da DC estar restrita primariamente às Américas Central e do Sul, estabelecida em áreas de distribuição de triatomíneos principalmente adaptados ao domicílio humano, a DC vem se expandindo como um problema global (Figura 1.1).

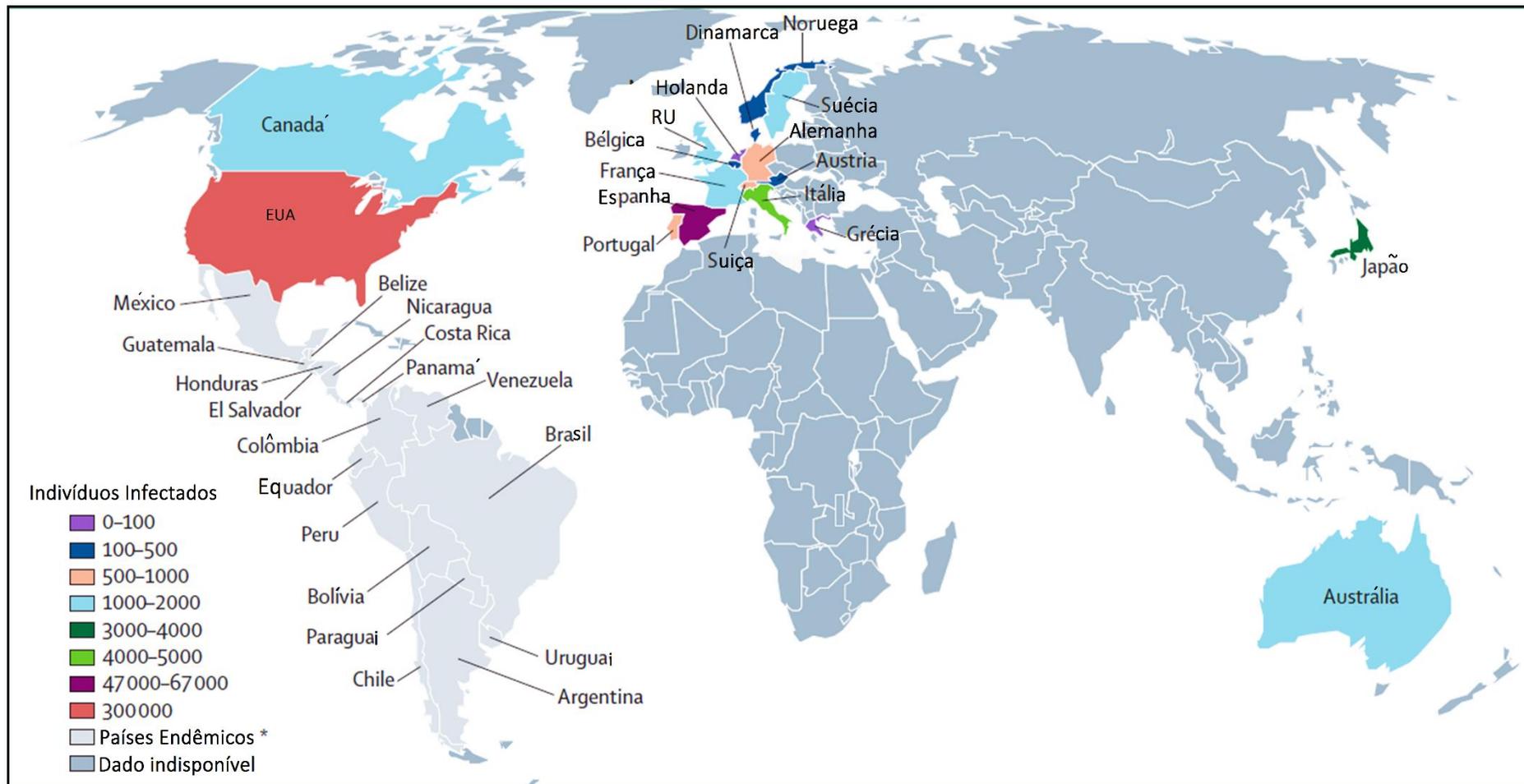


Figura 1.1. Número estimado de imigrantes com infecção pelo *Trypanosoma cruzi* que vivem em países não endêmicos. Fonte: Adaptado de Rassi et al (2010).

Esta expansão decorre de intensas migrações de latino-americanos para regiões não-endêmicas, tais como: América do Norte, região do Pacífico Ocidental e Europa. Nestas áreas não endêmicas a transmissão subsequente ocorre pela transfusão de sangue, doação de órgãos e pela via vertical, o que se apresenta como desafio para o desenvolvimento de ações para o seu controle e manejo (Coura & Viñas 2010, Pinazo et al 2011, Antinori et al 2017).

No Brasil, o inquérito nacional de soroprevalência realizado entre 1975 e 1980, que serviu de base para a orientar as ações de controle da doença de Chagas nas áreas endêmicas do país, mostrou uma prevalência de 4,22% de um total de 1.352.197 amostras processadas. Os estados que apresentaram as maiores prevalências de reações de imunofluorescência indireta para *T. cruzi* foram: Rio Grande do Sul (8,84%), Minas Gerais (8,83%), Goiás (7,40%), Sergipe (5,97%) e Bahia (5,44%) (Camargo et al 1984). A sobreposição dos dados dos inquéritos epidemiológico e entomológico confirmou que as áreas com maiores taxas de infecção humana foram àquelas de distribuição de *T. infestans*, espécie estritamente domiciliada, altamente antropofílica e com maiores taxas de infecção natural por *T. cruzi* (Passos e Silveira 2011).

Um estudo recente com revisão sistemática e metanálise tentou medir a magnitude da DC no período de 1980-2012, os autores verificaram que a estimativa da prevalência DC diminuiu de 4,4% na década de 1980 para 2,4% após 2000 (Martins-Melo et al 2014). Esses dados evidenciaram que o panorama ameaçador prévio a 1991 tem sido modificado em decorrência da implementação do programa de controle da doença de Chagas (PCDCh) ocorrido de forma sistemática entre 1975-1983 (Silveira et al 1984). Apesar dos esforços para o controle da doença, a transmissão de *T. cruzi* pela via vetorial clássica ainda ocorre no país e o aumento da incidência de casos e surtos da DC por via oral tem sido registrado em estados de várias regiões. Entre esses estados pode-se citar: Santa Catarina (SC) (Steindel et al 2008), Bahia (BA) (Dias et al 2008, Bastos et al 2010), Pará (PA) (Nóbrega et al 2009, Santos et al 2018) e Pernambuco (PE) (Góes 2019). Mapas de distribuição de casos da doença de Chagas aguda (DCA), confirmados e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), são apresentados na figura 1.2A e B.

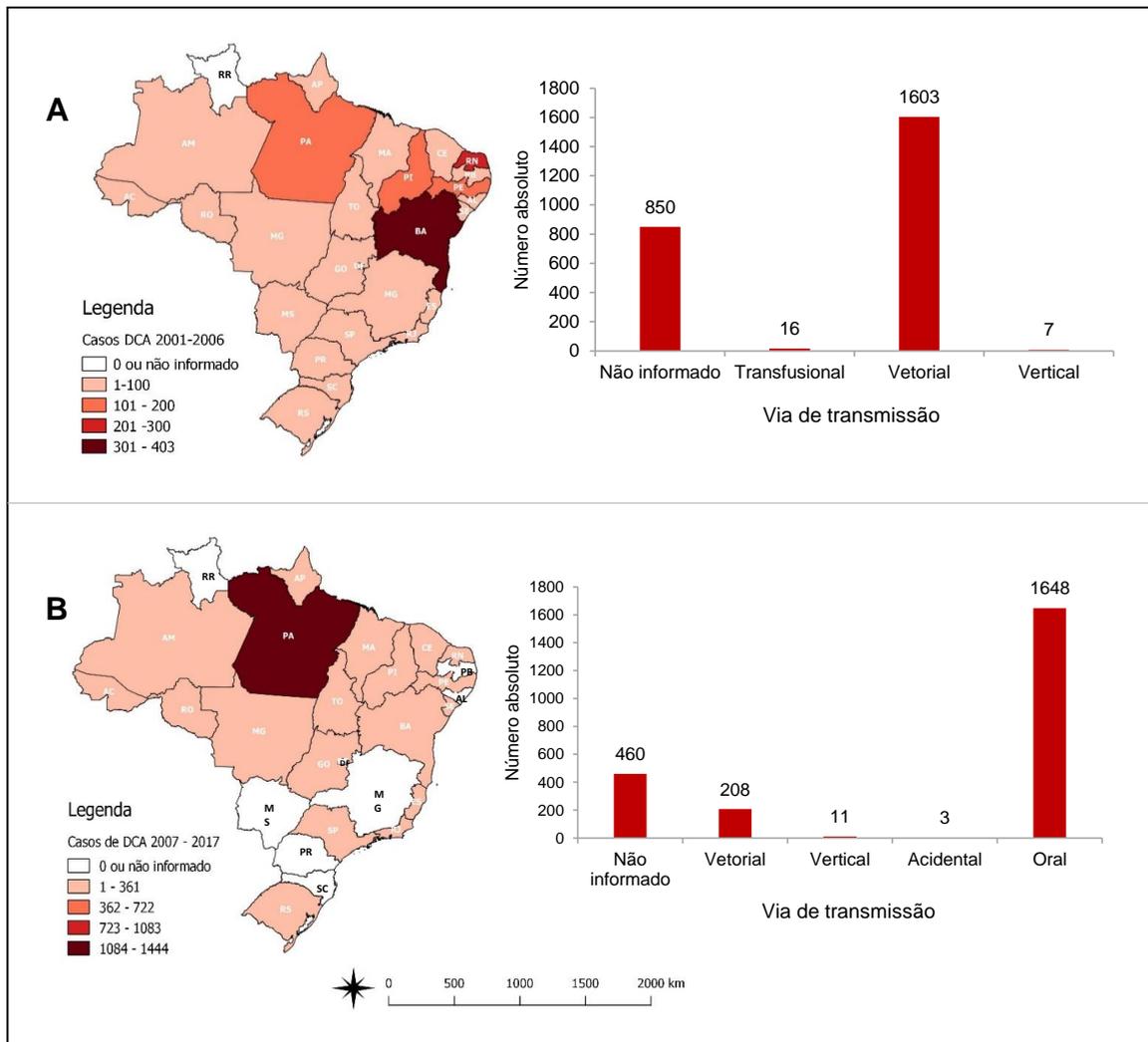


Figura 1.2. Distribuição de casos da doença de Chagas aguda (DCA) confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Brasil. **A.** Período de 2001-2006, **B.** Período de 2007-2017. Fontes de dados: SINAN (2019), Limite estadual: IBGE (2010). Geoprocessamento: a autora

No estado de PE, um surto de DC ocorreu entre os meses de maio e junho de 2019 na localidade de Ibimirim no Sertão pernambucano. Segundo o boletim da Secretaria Estadual de Saúde (SES), 77 pessoas participaram de um retiro religioso na Semana Santa. Dessas, 30 tiveram resultados positivos em testes laboratoriais e 10 apresentaram sintomas da DC. Até o dia 28 de junho 40 pessoas estavam recebendo tratamento para a doença. Segundo as investigações epidemiológicas que estão em curso em PE, este está sendo considerado o maior surto de DC registrado no Brasil (Góes 2019).

Entre as regiões do Brasil, a região Nordeste é apontada como uma das mais importantes no contexto epidemiológico da DC, conforme demonstrado pelo inquérito nacional de prevalência da infecção por *T. cruzi* realizado no período entre

1975 e 1980 (Silveira et al 1984). Corroborando o mencionado inquérito, Martins-Melo et al (2014) demonstraram que esta região destaca-se tanto pelo maior número de casos como também pela maior taxa de prevalência da DC. Recentemente, um inquérito sorológico nacional realizado em crianças com menos cinco anos (2001-2008), visando avaliar a transmissão vetorial intradomiciliar da DC, mostrou que a incidência da infecção pelo *T. cruzi* foi de 0,1% (104/104.954). Dos onze casos atribuídos a transmissão vetorial, nove foram provenientes da região Nordeste (Ostermayer et al 2011).

No estado do Rio Grande do Norte (RN), estudos pioneiros sobre a soroprevalência da DC realizados por Lucena no período de 1957-1962 demonstraram uma estimativa de 12,2% de prevalência, evidenciando a existência de focos de transmissão hiperendêmica da DC (Lucena 1970). O conjunto de medidas adotadas pelo PCDCh, que se iniciou na década de 1970 no RN, foi bem-sucedido e mostrou que o estado acompanhou a tendência de redução dos índices epidemiológicos nacionais com 1,78% de soroprevalência apontada pelo inquérito nacional da população rural realizado entre 1975-1980 (Camargo et al 1984). No entanto, o risco de transmissão de *T. cruzi* para a população humana persiste. Recentemente, evidências de transmissão vetorial intradomiciliar foram detectadas no último inquérito sorológico nacional, realizado em crianças (< 5 anos) entre anos 2001-2008, mostrando que dos nove casos identificados no nordeste, um era do município de Várzea, RN (Ostermayer et al 2011). Os dados oficiais do SINAN mostraram que na série histórica de 2001-2017, 245 casos de DCA foram confirmados e notificados no estado, dos quais 112 ocorreram pela via vetorial clássica (Figura 1.3). Em 2015, o primeiro surto da DC associado à ingestão de caldo-de-cana com confirmação de 18 casos foi oficialmente registrado no estado (Vargas et al 2018). A possibilidade do envolvimento do vetor *T. b. brasiliensis* infectado na contaminação da bebida não foi descartada, uma vez que espécimes infectados foram capturados em um amontoado de lenhas próximo ao engenho onde foi feita a moagem da cana (Vargas et al 2018). Estes dados evidenciam que as ações de controle, vigilância entomológica e educação em saúde devem ser contínuas.

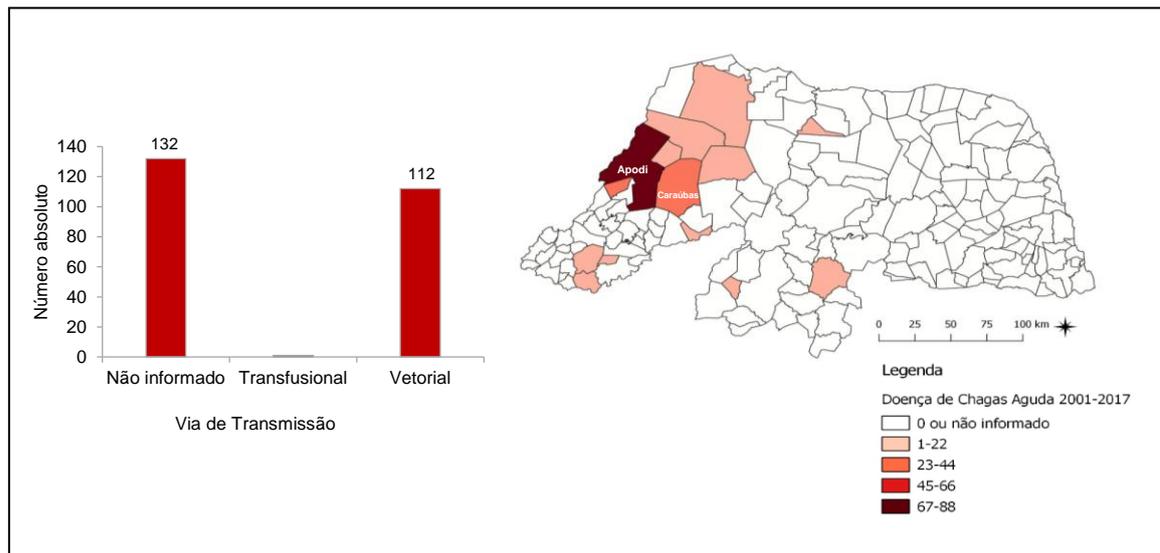


Figura 1.3. Distribuição de casos da doença de Chagas aguda (DCA) confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no estado do Rio Grande do Norte no período de 2001-2017. Fontes de dados: SINAN (2019), Limite estadual: IBGE (2010). Geoprocessamento: a autora

1.2. Biologia e heterogeneidade de *T. cruzi*

O agente etiológico da DC, *T. cruzi*, é um protozoário flagelado e unicelular que pertence a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, caracterizado pela existência de um único flagelo e de cinetoplasto, organela que se localiza próximo ao núcleo e contém o DNA mitocondrial (mtDNA) (Telleria et al 2006). Os tripanossomatídeos que compõem o gênero *Trypanosoma* são divididos em dois grupos, de acordo com seu desenvolvimento no inseto vetor e sua forma de transmissão, designados Salivaria e Stercoraria (Hoare 1964, Hoare, 1972).

A secção Salivaria inclui tripanossomas que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo e que posteriormente atravessam o epitélio digestivo e atingem as glândulas salivares, onde se encontram as formas infectantes que são transmitidas pela via inoculativa. Neste grupo incluem-se, por exemplo, a espécie *Trypanosoma brucei* Plimmer & Bradford, 1899, responsável pela doença do sono em humanos e nagana em animais e *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 capaz de ser patogênico aos triatomíneos nas Américas (Tobie 1970). *Trypanosoma evansi* Steel, 1884 e *Trypanosoma vivax* Ziemann, 1905, causadores de doenças em animais na África e na América, são transmitidos pela via mecânica por insetos hematófagos (ex. Tabanidae), responsáveis pela transferência dos parasitos de mamífero para

mamífero, estes pertencem também à secção Salivaria e são referidos por alguns autores como “inoculadores mecânicos” (Silva et al 2002). A secção Stercoraria compreende tripanossomas que se desenvolvem no tubo digestivo do triatomíneo, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectantes pelas fezes, tais como próprio *T. cruzi* (Hoare, 1972).

Trypanosoma cruzi circula entre centenas de espécies de hospedeiros mamíferos e várias espécies de triatomíneos e, por essa razão, é considerado um parasito multi-hospedeiro (Jansen et al 2015). Sua distribuição geográfica aproximada abrange todo o continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile (Zingales et al 2012). O ciclo de vida deste parasito é complexo, ao longo do seu desenvolvimento, *T. cruzi* apresenta quatro formas distintas: formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas sanguíneas nos hospedeiros mamíferos e as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas nos triatomíneos (Tyler & Engman 2001).

A figura 4.1 ilustra de forma resumida o ciclo de desenvolvimento do parasito nos seus hospedeiros. No triatomíneo, o ciclo se inicia pela ingestão de sangue durante o repasto sanguíneo em hospedeiro mamífero infectado etapa 1. As formas tripomastigotas sanguíneas, ingeridas com o sangue, sofrem diferenciação no intestino anterior e, em seguida, migram para o intestino médio multiplicando-se intensamente (etapas 2-4). Na forma de epimastigotas migram para o intestino posterior atingindo o reto, aderem ao epitélio, transformando-se em tripomastigotas metacíclicas, os quais são eliminados nas fezes e urina do inseto vetor (etapas 5-7) (Tyler & Engman 2001). As formas tripomastigotas metacíclicas eliminadas com as fezes/urina penetram na pele lesionada ou nas mucosas do hospedeiro mamífero, infectando as células nucleadas (etapa 8). Uma vez no interior das células, as formas metacíclicas formam um vacúolo parasitário, onde se diferenciam nas formas amastigotas e se multiplicam (etapas 9-11). Em seguida, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas e rompem a célula (etapas 12 e 13). Enquanto presentes na corrente sanguínea, os tripomastigotas podem ser ingeridos por outro triatomíneo na ocasião de um novo repasto ou invadir outras células (etapas 14 e 15) (Tyler & Engman 2001; Rassi et al 2010).

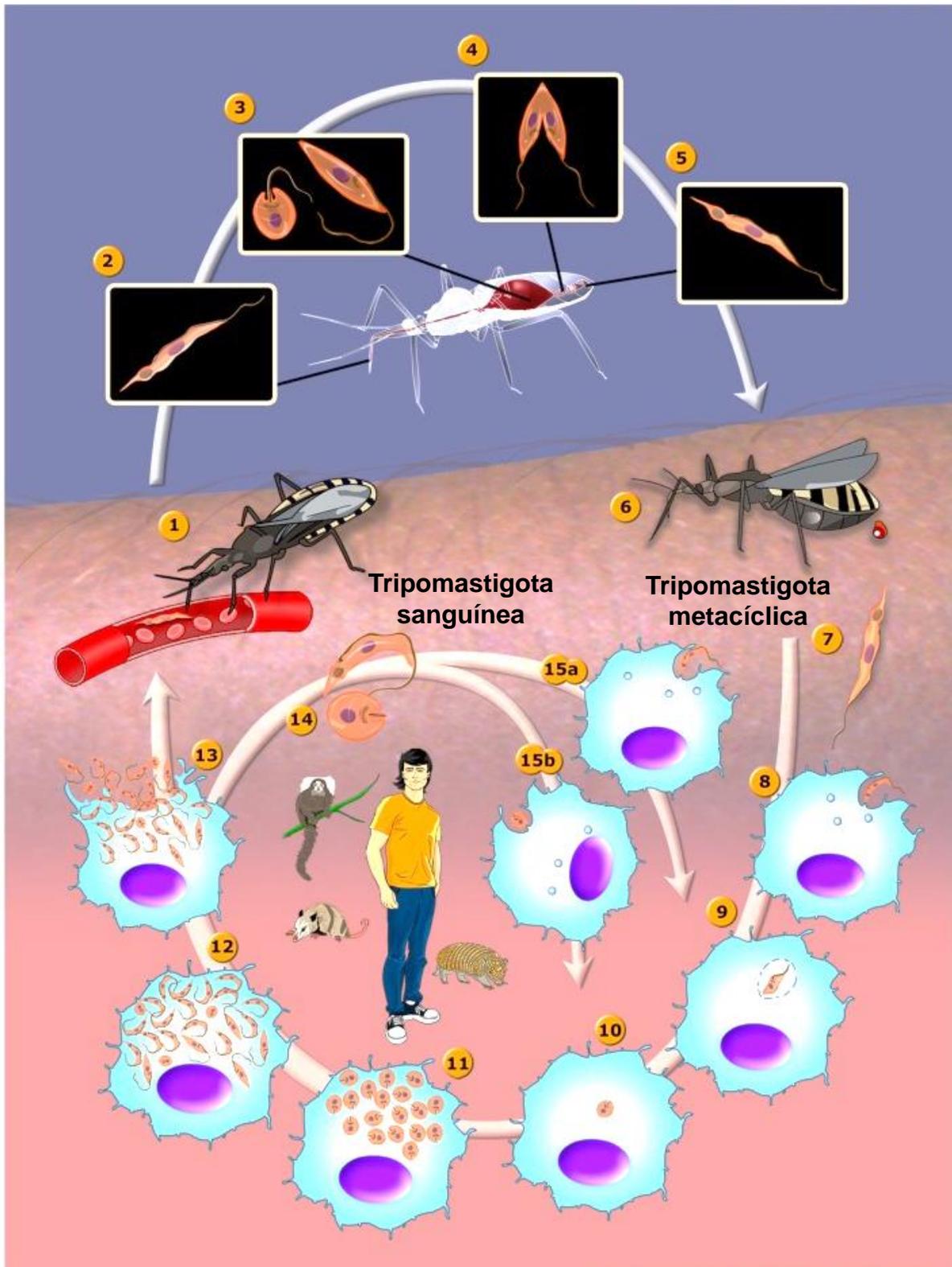


Figura 1.4: Representação esquemática do desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* com suas formas amastigota e tripomastigota sanguíneas no hospedeiro mamífero e formas epimastigotas e tripomastigota metacíclica no triatomíneo. Fonte: Adaptado de Teixeira et al 2012.

O conhecimento sobre a heterogeneidade de *T. cruzi* tem evoluído e avançado rapidamente, permitindo uma análise mais aprofundada do protozoário. Estudos sobre as características morfológicas deram origem à classificação de três tipos biológicos, os biotemas I, II, III (Andrade et al 1970, Andrade et al 1974). Posteriormente, a caracterização de *T. cruzi* foi realizada pela análise eletroforética dos perfis de isoenzimas, cujas variações das populações permitiram designar os zimodemas 1 (Z1), 2 (Z2) e 3 (Z3) (Miles et al 1977, 1978, 1980). Morel et al (1980) estudaram populações deste parasito e observaram a sua diversidade, sugerindo a caracterização em nível genotípico através da análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição do DNA do cinetoplasto (kDNA), propondo o termo esquizodema.

Com a descrição dos marcadores moleculares 24 α do RNA ribossomal (rRNA) e região intergênica *spliced leader* (SL-IR) do gene mini-exon (Souto & Zingales 1993, Souto et al, 1996; Fernandes et al 1999), além da investigação de um maior número de amostras de isolados de vertebrados e de triatomíneos, foi possível propor a divisão de *T. cruzi* em linhagens 1 e 2 (Zingales et al 1998, Fernandes et al 1999). O intenso trabalho dos pesquisadores no desenvolvimento de diferentes metodologias e marcadores confirmou a grande diversidade de *T. cruzi*. Assim, durante o Simpósio Internacional em comemoração aos 90 anos da descoberta da DC, em uma reunião satélite, um comitê de especialistas estabeleceu recomendações na tentativa de unificar a nomenclatura. Recomendou-se que as populações caracterizadas pelas análises biológica, bioquímica e molecular deveriam compor dois grupos: *T. cruzi* I (TcI) e *T. cruzi* II (TcII). Nos casos de incerteza ou que não fosse possível caracterizar os isolados, os mesmos não deveriam ser incluídos nestes grupos, tais como os isolados Z3 e os isolados com características híbridas (Anonymous, 1999).

A subdivisão de *T. cruzi* em seis genótipos (TcI, TcIIa-e) proposta por Brisse et al (2000), ao empregar as técnicas *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) e *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), possibilitou a inclusão da população denominada Z3 (TcIIa) e das populações com características híbridas (TcIIc-e) no sistema de classificação intraespecífica de *T. cruzi*. O genótipo TcI corresponde à linhagem *T. cruzi* I e o genótipo TcIIb corresponde à linhagem *T. cruzi* II. Posteriormente, Zingales et al (2009) propuseram um novo consenso para a uniformizar a nomenclatura de *T. cruzi* e facilitar a compreensão da diversidade das

populações deste parasito, resgatando a nomenclatura proposta por Tibayrenc (1986), as Unidades Discretas de Tipagem (DTUs), definidas como: “o conjunto de populações que são geneticamente semelhantes e que podem ser identificadas por marcadores genéticos, imunológicos e moleculares em comum”. Assim, as DTUs foram nomeadas TcI (TcI), TcII (TcIIb), TcIII (IIa), TcIV (IIc), TcV (IIId) e TcVI (IIE). Além destas seis DTUs, um novo genótipo foi proposto, TcBat (Marcili et al 2009), o qual foi primeiramente proposto ser restrito a morcegos, no entanto, posteriormente foi descrito em humanos e triatomíneos (Ramírez et al 2014, Cominetti et al 2014). Apesar deste consenso, a estruturação de *T. cruzi* em seis DTUs separadas foi contestada, e uma nova estruturação deste parasito foi proposta com base na tipagem de genes mitocondriais (Cyt B e COII) em três grupos denominados mtTcI, mtTcII e mtTcIII (Barnabé et al 2016, Brenière et al 2016).

De acordo com os dados disponíveis na literatura, a DTU TcI apresenta elevada heterogeneidade (Llewellyn et al 2009a, León et al 2015, Roman et al 2018). Esta DTU (TcI) é a mais abundante na natureza, sendo isolada de vários hospedeiros mamíferos e triatomíneos; além de apresentar ampla distribuição geográfica com registros de ocorrência desde os Estados Unidos até o Chile (Zingales et al 2012, Brenière et al 2016). Tc II é a segunda DTU mais frequente no Brasil (Jansen et al 2015) e terceira no continente americano (Brenière et al 2016). Embora se tenha sugerido que essa DTU esteja associada com o ciclo doméstico de transmissão de *T. cruzi* (Zingales et al 2012), a TcII tem sido também isolada de uma variedade de hospedeiros mamíferos silvestres (Jansen et al 2015, Lima et al 2015, Argibay et al 2016). A DTU TcIII tem registro de ocorrência na maioria dos biomas brasileiros, sendo isolada em diferentes mamíferos, domésticos e silvestres, bem como em diferentes gêneros de triatomíneos (Cardinal et al 2008, Jansen et al 2015, Brenière et al 2016), além de já ter sido encontrada no México (Ibanez-Cervantes et al, 2013) e desde a Venezuela até a Argentina (Llewellyn et al, 2009b). A DTU TcIV foi isolada em amostras de pacientes na Amazônia, Bolívia e Colômbia (Monteiro et al 2012, Santalla-Vargas et al 2012, Ramírez et al 2013) e já foi encontrada em *Triatoma vitticeps* (Dario, 2013) provenientes do bioma Mata Atlântica, bem como registrada também nos Estados Unidos da América e na Guatemala (Zingales et al 2012). As DTUs TcV e TcVI são consideradas híbridas (Sturm e Campbell, 2010) e já foram descritas em países da América do Central e do Sul (Garzon et al 2002, Ramos-Ligonio et al, 2012; Jansen et al 2015).

1.3. Hospedeiros e reservatórios de *T. cruzi*

Mais de 100 espécies de mamíferos silvestres distribuídos em quase todos os biomas das Américas são passíveis de se infectarem com *T. cruzi*, estes estão incluídos nas seguintes ordens: Artiodactyla, Didelphimorphia, Carnivora, Rodentia, Chiroptera, Cingulata, Primata (Noireau et al 2009, Jansen et al 2015). No ambiente domiciliar, os principais mamíferos encontrados infectados com o este parasito foram: cães, gatos, cabras e porcos (Noireau et al 2009). É importante ressaltar que todos os animais infectados com *T. cruzi* podem ser considerados hospedeiros, mas essa evidência não é suficiente para defini-los como hospedeiro reservatório (Jansen et al 2015). Os anfíbios, répteis e aves são refratários à infecção, devido ao efeito lítico mediado pelo complemento de seus sistemas imunes, entretanto, participam na manutenção de colônias de triatomíneos no peridomicílio e no ambiente silvestre (Kierszenbaum et al 1981, Kollien & Shaub 2000, WHO 2002).

O conceito de hospedeiro reservatório vem mudando ao longo do tempo. Na ocasião da descoberta, por Carlos Chagas, da espécie *Tatusia novemcinctus* (tatu) (Linnaeus, 1758) como reservatório de *T. cruzi*, o mesmo era pensado como um repositório quase inerte que atuava como fonte de infecção humana. Nas últimas décadas, o hospedeiro passou a ser considerado como um sistema vivo complexo, capaz de sofrer e aplicar pressão seletiva no parasito de acordo com as suas condições ambientais, necessitando ser compreendido como integrante de um sistema complexo, variável e dinâmico (Noireau et al 2009, Jansen et al 2015). Assim, modernamente, Ashford (1997) definiu hospedeiro reservatório como: “a espécie, ou conjunto de espécies, capaz de manter uma determinada espécie de parasito na natureza, em um espaço de tempo suficiente para ser transmitido ao vetor, em um determinado recorte espaço-temporal”. Deste modo, a definição do papel de uma espécie animal na rede transmissão do *T. cruzi* implica em analisar vários fatores referentes ao hospedeiro (sexo, idade, comportamento, competência imunológica, demografia populacional, fisionomia da paisagem onde se encontram, etc) e ao parasito (tempo de desenvolvimento, estratégia de transmissão, etc) que vão elucidar as peculiaridades da interação parasito-vetor e a compressão do seu papel como mantenedor e dispersor do flagelado *T. cruzi* (Noireau et al 2009, Gürtler e Cardinal, 2015, Jansen et al 2015).

Nos ciclos de transmissão do protozoário *T. cruzi*, que podem ser conectados ou independentes (Alvarado-Otegui et al 2012), os vetores são infectados por meio

da ingestão de sangue de mamífero na fase parasitêmica da infecção. Entre os mamíferos apontados como reservatórios de *T. cruzi* estão: os didelídeos, cujos principais representantes compõem gêneros *Didelphis* e *Philander* (Jansen et al 1999, Jansen et al 2015); os cães, na região do Gran Chaco na Argentina (Gürtler et al, 2007; Gürtler e Cardinal, 2015) e os coatis, na região no Pantanal (Alves et al 2016). Do ponto de vista epidemiológico, os mamíferos com potencial sinantrópico, capazes de se aproximar e até mesmo colonizar as habitações humanas, como alguns didelídeos, são os mais relevantes, pois atuam como fontes de *T. cruzi* no peridomicílio, favorecendo a infecção dos triatomíneos e também atuam na ligação entre ciclos de transmissão silvestre e peridomiciliar do parasito (Pinto et al 2006, Jansen et al 2015).

1.4. Os triatomíneos, a sua adaptação às habitações humanas e o controle vetorial no Brasil

O número de espécies que compõem a subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vem aumentando à medida que se intensificam as pesquisas de campo. Atualmente, esta subfamília é composta por mais de 150 espécies, as quais exibem variadas capacidades de adquirir e transmitir as seis DTUs de *T. cruzi* (Brenière et al 2016), classificadas em 5 tribos e 18 gêneros. A tribo Triatomini é a mais diversa, e junto com a tribo Rhodniini compreendem os gêneros de maior importância epidemiológica: *Rhodnius* (21 espécies), *Triatoma* (84 espécies) e *Panstrongylus* (15 espécies) enquanto as tribos Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini têm menor importância. Entre as espécies desta subfamília existem três fósseis: *T. dominicana* Poinar, 2005, *P. hispaniolae* Poinar, 2013 e *Paleotriatoma metaxytaxa* Poinar, 2019 (Galvão et al 2003, Galvão & Gurgel-Gonçalves 2015, Rosa et al 2017, Oliveira & Alevi 2017, Poinar 2019).

Os triatomíneos, também conhecidos como “barbeiros”, “vinchucas”, “chirimanchas”, “chupões” e “bicudos”, entre outros, apresentam coloração geral do corpo negra com padrão de elementos que variam do amarelo claro ao marrom, laranja e várias tonalidades de vermelho. Estes insetos hematófagos possuem cabeça alongada, com olhos compostos bem evidentes e aparelho bucal picador sugador, que permanece alojado em uma bainha ou rostro quando em repouso. A forma e o número de segmentos do rostro permite distinguir os triatomíneos de

outros percevejos, sendo que os barbeiros possuem rostro reto com três segmentos. As antenas se inserem em estruturas denominadas tubérculos anteníferos, cuja localização é fundamental para identificação de alguns gêneros de barbeiros. O tórax é dividido em três segmentos (protórax, mesotórax e metatórax) e apresenta um par de pernas em cada um deles. Nos adultos há dois pares de asas, a asa anterior (hemiélitro) possui a parte basal coriácea e a parte distal membranosa e a asa posterior é membranosa. O pronoto, parte dorsal do primeiro segmento torácico, tem forma de trapézio e é dividido em lobos anterior e posterior, possuindo ou não tubérculos, relevantes para a identificação específica. As pernas dos triatomíneos são úteis na identificação de espécies, considerando a presença e número de espinhos, a coloração e a distribuição de manchas. O abdome dos triatomíneos é dividido em 9 a 10 segmentos visíveis. As placas dorsais e ventrais são denominadas tergitos e esternitos, respectivamente. Entre essas placas, uma estrutura chamada conectivo se posiciona ao lado das asas em vista dorsal. A coloração e a distribuição de manchas nos conectivos são características importantes para a identificação de espécies de triatomíneos. As genitálias masculinas e femininas, localizadas no final do abdome, possuem estruturas que podem servir para delimitação de espécies quando consideradas em conjunto com a morfologia externa e padrões cromáticos (Lent & Wygodzinsky 1979, Jurberg et al 2014).

A distribuição geográfica dos triatomíneos abrange principalmente a região tropical e subtropical do Hemisfério Oeste com localização do seu centro de diversidade na América do Sul (Lent & Wygodzinsky 1979). A grande maioria das espécies da subfamília Triatominae são estritamente silvestres, onde ocupam uma diversidade de ecótopos naturais como: ninhos de pássaros, ocos de árvores, buracos no solo, fendas em afloramentos rochosos, bromélias, frondes de palmeiras, etc (Lent & Wygodzinsky 1979). Embora majoritariamente encontradas no Novo Mundo, algumas espécies desta subfamília ocorrem no Velho Mundo, estas pertencem ao gênero *Linchosteus*, encontradas na Índia, e ao gênero *Triatoma*, como *T. rubrofasciata*, a qual é originária no Novo Mundo e foi introduzida no Velho Mundo, como mencionado anteriormente, com registro de ocorrência na África, Ásia e Austrália (Lent & Wygodzinsky 1979). Recentemente, a detecção de focos de infestação domiciliar de *T. rubrofasciata* e relatos de picadas deste vetor em humanos foram reportados no Vietnã, o que causou preocupação às autoridades de

saúde, uma vez que se admite que a DC não esteja mais restrita a América Latina (Coura & Viñas 2010, Dujardin et al 2015).

A principal característica biológica dos triatomíneos é sua condição hematofágica. A maioria dos triatomíneos necessita alimentar-se de sangue para completar o seu ciclo de desenvolvimento, entretanto, em condições adversas, esses insetos podem exercer: o coprofagismo; a micropredação, ingestão da hemolinfa de outros invertebrados (et al 2000, Lorosa et al 2008, Durán et al 2016) e a cleptohematofagia, quando se alimentam de sangue de animais vertebrados por meio da perfuração do intestino de outros insetos hematófagos e também deles próprios (Sandoval et al 2000). Em condições de laboratório, foi observado pela primeira vez que a espécie *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 ingeriu uma solução de açúcar e de tecido vegetal de frutos de *Solanum lycopersicum* (tomate). Os autores discutiram a possibilidade da enzima α -glicosidase, encontrada no intestino de *Rhodnius*, ser um traço evolutivo ancestral de hemípteros fitófagos e sugerem mais estudos para elucidar o seu papel na digestão de açúcares vegetal (Díaz-Albiter et al 2016).

A compreensão da origem e evolução dos triatomíneos tem sido um desafio para os pesquisadores a décadas e ainda há questões a serem respondidas. A origem monofilética do grupo foi proposta Lent & Wygodzinsky (1979) em seu notável trabalho de revisão taxonômica, mostrando que o monofiletismo dos triatomíneos poderia ser suportado por três possíveis autapomorfias: (i) hábito hematofágico, (ii) presença de uma conexão membranosa flexível entre o 2º e 3º segmentos do rostro facilitando a sucção e (iii) ausência de glândulas abdominais dorsais nas ninfas. Trabalhos mais recentes também defendem a condição monofilética dos triatomíneos (Hypša et al 2002, Weirauch 2008). Por outro lado, alguns autores defendem que os integrantes da subfamília Triatominae teriam evoluído a partir de mais de uma linhagem de reduvídeos predadores que habitavam ninhos de animais (hipótese polifilética), sendo a hematofagia obrigatória resultado de uma modificação evolutiva que se originou da hematofagia facultativa (Schofield, 1988, Dujardin et al 1999, Paula et al 2005, 2007). Apesar das importantes contribuições à elucidação da evolução dos triatomíneos, estudos com um maior número de taxa são necessários para solucionar a questão evolutiva da subfamília como um todo (Galvão & Paula, 2015).

No que diz respeito à domiciliação, vários fatores podem desencadear as invasões e progressiva adaptação dos triatomíneos às habitações humanas, os quais estão relacionados ao ambiente e às características inerentes ao vetor (Silveira 2000). Entre os fatores do ambiente, estão as modificações antrópicas nos biótopos naturais, a natureza e a qualidade das construções dos domicílios, as condições de armazenamento de materiais e alimentos dentro e ao redor da casa (Lorenzo et al 2000, WHO 2002). Além desses fatores, os micro-habitats (peridomiciliar e intradomiciliar) conferem proteção contra predadores, a maior estabilidade microclimática do domicílio em relação ao ambiente silvestre e a disponibilidade de sangue abundante dos seres humanos e animais domésticos (Lorenzo et al 2000, WHO 2002). No que se refere aos fatores inerentes aos triatomíneos, há uma discussão acerca de duas hipóteses que tentam explicar o processo de domiciliação. Em uma das hipóteses, admite-se que a domiciliação pode ter surgido a partir de um simples oportunismo das espécies de triatomíneos silvestres frente a escassez de fontes de alimento naturais, a outra propõe que a domiciliação é um processo gradual de adaptação, onde o isolamento domiciliar tenderia, cada vez mais, à diferenciação desse comportamento. Esta diferenciação resultaria na possibilidade de evolução de populações com acentuada ou estrita sinantrópia (Forattini 1980).

O termo adaptação pode ser definido como o processo pelo qual uma característica, devido ao aumento que confere o valor adaptativo, foi moldada por forças específicas de seleção natural, fixando a variação genética. Essas características permitem o desenvolvimento de certa harmonia com o ambiente, possibilitando o ajuste das espécies para a sua sobrevivência em um determinado local (Futuyma 1995). As características pré-adaptativas ao sofrerem pequenas mudanças adaptativas, em virtude do processo evolutivo, atuam positivamente para a fixação de um novo caráter (Bock 1959). No caso dos triatomíneos, o ecletismo alimentar é apontado como uma característica pré-adaptativa que favoreceu o estabelecimento das populações no ecótopo domiciliar (Aragão 1975, 1983). Assim, o processo de domiciliação em triatomíneos poderia ser considerado como uma extensão da rota evolutiva do hábito predador para o hábito hematofágico em ninhos-abrigo, onde o habitat domiciliar representa um novo tipo de “ninho” de vertebrado, a domiciliação representaria uma especialização (Schofield & Dias 1999).

A premissa de que a domiciliação dos triatomíneos é um dos principais fatores para o aumento do risco de transmissão de *T. cruzi* para os seres humanos (Lent & Wygodzinsky 1979) foi usada como base para a graduação do grau de domiciliação. Dessa forma, as espécies podem ser reunidas nos seguintes grupos: (i) espécies estritamente domiciliadas ou excepcionalmente encontradas em ecótopos naturais; (ii) espécies encontradas em ambos os ambientes domésticos e silvestres, com frequentes colônias domiciliadas; (iii) espécies silvestres, principalmente, mas às vezes capturados no ambiente doméstico; e iv) espécies encontradas exclusivamente no ambiente silvestre (Zeledón 1974). Do ponto de vista operacional, esta classificação foi importante para orientar as medidas de controle, uma vez que, dependendo do grau de adaptação, a vulnerabilidade das espécies vetoras poderia ser menor ou maior.

O processo de domiciliação é contínuo, nas últimas décadas tem sido reportado o aumento do número de espécies invasoras (não domiciliadas) e, em alguns casos, indícios de colonização das habitações humanas em áreas de alguns estados do Brasil. No estado da Bahia (BA), ninfas da espécie *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata 2002 foram encontradas no interior do domicílio, sugerindo o início de um processo de domiciliação e espécimes do ambiente silvestre próximo às casas estavam infectados por *T. cruzi* (64 - 10,9% de infecção natural) (Almeida et al 2009). Em Tocantins (TO), as espécies *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 (4.593 - 25,6% de infecção natural), *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (2.883 - 10,8% de infecção natural), *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (2.383 - 13,1% de infecção natural), *Triatoma costalimai* Verano & Galvão, 1958 (762 - 13,5% de infecção natural) e *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (783 - 32,3% de infecção natural) foram as mais capturadas nos domicílios entre os anos de 2005-2013 com alguns indícios de colonização (Brito et al 2017). A análise dos dados da Secretaria de Estado da Saúde Pública do RN (SESAP-RN) no período de 2005 a 2015 mostrou que *Panstrongylus lutzi* (Neiva e Pinto, 1923), *Triatoma petrocchiaie* Pinto & Barreto, 1925 (150 - 1,3% de infecção natural) e *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (2.915 - 1,7% de infecção natural) também aumentaram a pressão de invasão com evidências de colonização naquele estado (Barbosa-Silva 2017). Em PE o mesmo padrão foi observado para *P. lutzi*, quando avaliados os dados de captura nos domicílios entre os anos de 2006 e 2007 (Silva et al 2012). A possível domiciliação de *P. lutzi* é preocupante, uma vez que essa espécie exibe

altos índices de infecção natural no ambiente silvestre de áreas do RN (105 - 78% de infecção natural) (Barbosa-Silva, 2013) e espécimes infectados já foram capturados no domicílio (1.937 - 0,7% de infecção natural) (Barbosa-Silva 2017). Estes dados mostram que o risco de transmissão vetorial e oral de *T. cruzi* persiste no Brasil e que as espécies autóctones representam um importante desafio contemporâneo para controle vetorial, conforme observado por Silveira & Dias (2011).

O controle da DC foi um grande desafio desde a sua descoberta em 1909, uma vez que depende de iniciativas políticas e técnicas. Após a descrição da doença, Carlos Chagas buscou sensibilizar médicos e políticos sobre o problema das endemias rurais no Brasil, sustentando a ideia da urgência para combatê-las. Este posicionamento influenciou o movimento sanitarista, em atividade entre os anos 1916 e 1920, que afirmava que o atraso do país não se devia ao clima ou a sua composição racial, como defendiam alguns, mas às péssimas condições de saúde das populações rurais (Kropf & Massarani 2009). Nas décadas subsequentes, o controle da doença era realizado de forma pontual, por meio da identificação de pessoas doentes e seu manejo, bem como por meio do emprego de ações de natureza física (uso do fogo, melhoria das habitações) e químicas (uso de querosene e soda cáustica) direcionadas para o controle vetorial (Dias 2002).

Na primeira metade do século XX, nas áreas endêmicas os vetores eram bem conhecidos pela populações locais, especialmente *Triatoma infestans* (Klug, 1834), *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *Triatoma sordida* Stål, 1859 e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa e Spínola, 1964, devido à hiper-infestação em algumas áreas (Dias & Zeledon, 1955). Nas décadas de 1940 a 1960, estratégias de controle tinham como principal alvo os insetos vetores, pois já se sabia que os triatomíneos eram o elo mais fraco da cadeia epidemiológica, no contexto da transmissão vetorial clássica, como apontado anteriormente pelo próprio Carlos Chagas (Dias & Schofield 1999). Neste período, um dos marcos no controle dessa endemia foi o trabalho realizado por Emmanuel Dias, José Pellegrino e colaboradores, a partir da instalação de um posto do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) em Bambuí, Minas Gerais, onde foram testados uma série compostos químicos, mas com resultados promissores apenas com o Gammexane (BHC) (Dias e Pellegrino 1948). Os pesquisadores demonstraram que as aplicações regulares deste inseticida de ação residual possibilitaria o controle da transmissão

vetorial nos domicílios. As pesquisas realizadas por Dias e Pellegrino lançaram as bases técnicas da campanha antitriatomínica no Brasil, que se iniciou em Bambuí e em São Paulo, com excepcional sucesso, resultando na eliminação de *T. infestans* nestas cidades e áreas vizinhas (Dias e Pellegrino 1948, Freitas et al 1959, Costa et al 2009, Dias 2011).

Apesar da resolução da questão técnica do controle da DC com o trabalho pioneiro de Dias e Pellegrino, o PCDCh só foi implementado de forma sistemática na área endêmica em nível nacional em 1975-1983 (Silveira & Dias 2011). Neste período, estimava-se que o principal vetor, *T. infestans*, espécie alóctone e estritamente domiciliada, infestava domicílios de 700 municípios em 12 estados brasileiros (Silveira et al 1984). Em 1991, o Brasil uniu-se a Iniciativa do Cone Sul, um consórcio internacional formado por Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai, e mais tarde Peru, com o objetivo principal de reduzir a transmissão vetorial através da aplicação de inseticidas piretróides contra *T. infestans* (Silveira & Vinhaes 1999). O êxito do PCDCh foi constatado tanto na redução de *T. infestans* capturados no domicílio, de 84.334 (1983) para 4.418 (1991) (Silveira & Dias 2011), quanto no decréscimo dos índices epidemiológicos evidenciados nos inquéritos sorológicos em nível nacional da população geral, 4,42 % (1975-1980) e de escolares de 7 a 14 anos 0,14 % (1989-1999) (Silveira et al 2002).

Em virtude do sucesso do PCDCh, em 2006 a Organização Panamericana de Saúde/OMS (OPAS/OMS) forneceu ao Brasil a Certificação Internacional de Interrupção da Transmissão Vetorial da DC por *T. infestans* e a interrupção da Transmissão Transfusional (Silveira 2011). Esta certificação, no entanto, não representou o fim do risco da transmissão vetorial no país, uma vez que há áreas endêmicas em que *T. infestans* nunca foi registrado, como o estado do RN. Neste estado, são registradas oito espécies nativas: *P. megistus*, *P. lutzi*, *R. nasutus*, *T. petrocchiae*, *T. pseudomaculata*, *Triatoma brasiliensis brasiliensis* Neiva, 1911, *T. rubrofasciata* e *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923 (Galvão & Gurgel-Gonçalves 2015). É importante mencionar que mesmo em áreas onde *T. infestans* infestava os domicílios ocorriam também espécies autoctones, sendo que essas intensificaram a sua presença nas habitações humanas após o controle do principal vetor (Vinhaes & Dias 2000, Costa et al 2003a, Silveira & Dias 2011). As espécies autóctones representam novo desafio para o controle vetorial na atualidade, porque ao contrário das espécies introduzidas, estritamente domiciliadas, não podem ser

eliminadas do intradomicílio, visto que são capazes restabelecer colônias a partir de focos vizinhos ou silvestres. Assim, faz-se necessário a sustentabilidade dos níveis de controle alcançados contra a transmissão vetorial domiciliar, a fim de evitar a reemergência ou emergência da DC nas diferentes regiões do país (Silveira 2011).

1.5. Complexo *Triatoma brasiliensis* e sua importância epidemiológica

A consideração de caracteres cromáticos levou à descrição de duas “populações” ou formas melânicas como subespécies de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: *Triatoma brasiliensis melanica* Neiva e Lent, 1941 e *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956. A partir de observações das características morfológicas e da distribuição geográfica, Lucena (1970) propôs a formação do complexo de espécies *T. brasiliensis*, incluindo as espécies e subespécies: *T. brasiliensis*; *T. b. melanica*; *T. b. macromelasoma*; *T. petrocchiai*; *Triatoma pessoai* Sherlock & Serafim, 1967; *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 e *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967. Anos mais tarde, Sherlock & Serafim (1972) afirmaram que *T. bahiensis* tratava-se de uma variedade de *T. pessoai*. Em 1979, Lent e Wygodzinsky sugeriram sinonímia das subespécies *T. b. macromelasoma* e *T. b. melanica* com *T. brasiliensis* e de *T. pessoai* (variedade *bahiensis*) com *T. lenti*, afirmando que formas intermediárias poderiam ser encontradas na natureza.

Passadas quase duas décadas da publicação de Lent e Wygodzinsky (1979), estudos multidisciplinares sobre a morfologia (Costa et al 1997a), biologia (Costa e Marchon-Silva 1998), ecologia (Costa et al 1998, 2002), cruzamentos experimentais (Costa et al 2003b), isoenzimas (Costa et al 1997b), e seqüências de mtDNA (Monteiro et al 2004) mostraram que as subespécies *T. b. macromelasoma* e *T. b. melanica*, a espécie *T. brasiliensis* e a população “juazeiro” tratavam-se de unidades evolutivas independentes. Assim, estes resultados apoiaram não só a proposição de um grupo monofilético, mas também confirmaram a existência do complexo de espécies *T. brasiliensis* formado por: *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. melanica* e *T. juazeirensis* Costa & Felix, 2007 (Costa et al 2006, 2013, Costa & Felix 2007). Posteriormente, foi sugerida a revalidação de *T. bahiensis* como espécie, a confirmação do *status* específico de *T. lenti* e *Triatoma sherlocki* e a inclusão dessas três espécies no complexo de espécies *T. brasiliensis* suportados por estudos

biológicos, morfológicos, citogenéticos e moleculares (Mendonça et al 2009, 2014, 2016).

Oliveira et al (2017) investigaram as relações filogenéticas das espécies *T. lenti* e *T. petrocchiae* comparadas a outras espécies do complexo de espécies *T. brasiliensis* e subcomplexo Brasiliensis (Schofield e Galvão 2009), com base em evidências morfológicas (morfometria geométrica) e moleculares (análises dos genes 12S, 16S, COI e *Cyt B*). Os resultados confirmaram a inclusão de *T. lenti* e deram suporte para a inclusão de *T. petrocchiae* no complexo de espécies *T. brasiliensis*. Dessa forma, com base nesses estudos, foi sugerido o seguinte arranjo taxonômico: *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. melanica*, *T. juazeirensis*, *T. sherlocki*, *T. bahiensis*, *T. lenti* e *T. petrocchiae* (Figura 1.5A-H). Estas espécies e subespécies podem ser identificadas com o auxílio da chave dicotômica desenvolvida por Costa et al (2013) e Dale et al (2018). Este complexo de espécies teve o seu centro de origem e dispersão no bioma Caatinga (Forattini 1980), expandindo-se para o bioma Cerrado, o qual se distribui por 11 estados da região nordeste além de MG (Figura 1.5 I-J) (Sherlock & Serafim 1972, Lent e Wygodzinsky 1979, Costa et al 2003b, 2014, Galvão & Gurgel-Gonçalves 2015). Os taxa do complexo *T. brasiliensis* apresentam diferenças quanto a sua importância epidemiológica, considerando parâmetros biológicos, ecológicos e comportamentais. As espécies de maior relevância para a saúde pública são as tradicionalmente mais estudadas, logo, são as que possuem mais informações disponíveis, as demais necessitam de estudos complementares. Apresentamos abaixo informações ecoepidemiológicas sobre os membros do complexo.

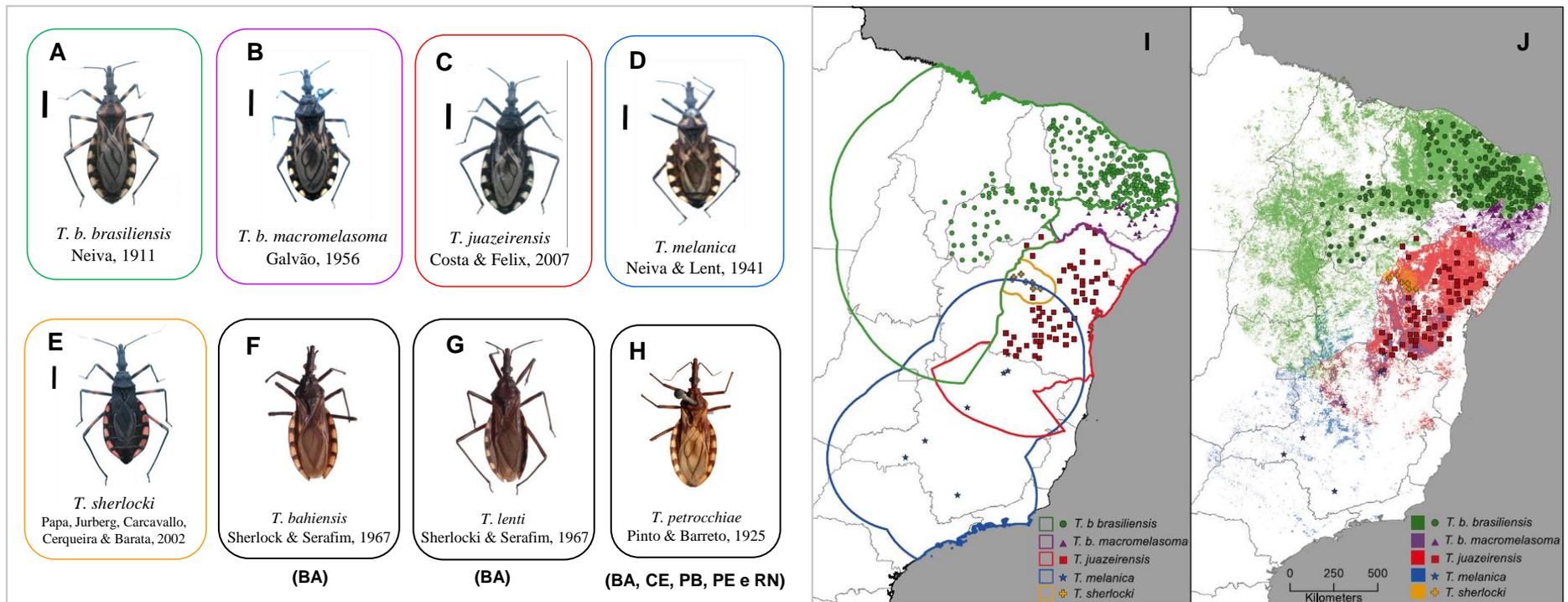


Figura 1.5: Membros do complexo de espécies *Triatoma brasiliensis*: **A.** *Triatoma b. brasiliensis* (verde), **B.** *Triatoma b. macromelasoma* (roxo), **C.** *Triatoma juazeirensis* (vermelho), **D.** *Triatoma melanica* (azul) e **E.** *Triatoma sherlocki* (laranja), escala: 0,5 cm (Fonte: Lima-Neiva 2014). **F.** *Triatoma bahiensis*, **G.** *Triatoma lenti* (Fonte: Mendonça et al 2016), **H.** *Triatoma petrocchiai* (Fonte: Galvão e Gurgel-Gonçalves 2015). **I.** Mapa de hipótese (linhas) e os dados de ocorrência (pontos) para 5 membros. **J.** Dados de ocorrência (pontos) e distribuições potenciais atuais para 5 membros. Fonte: Adaptado de Costa et al 2014.

Triatoma sherlocki - Segundo Costa et al (2014) esta espécie parece estar restrita à região noroeste central do estado da BA. Embora tenha sido considerada exclusivamente silvestre pelos autores que a descreveram, foram encontrados ninfas e adultos no intradomicílio em um assentamento informal de garimpo (Encantado), no município de Gentio do Ouro, BA, indicando que se encontra em um possível processo de domiciliação (Almeida et al 2009). Este fato gerou indagações a respeito do mecanismo de dispersão e dos aspectos biológicos de *T. sherlocki* que poderiam favorecer a transmissão de *T. cruzi*. Uma vez que se tratava de uma espécie braquíptera, experimentos de laboratório foram realizados e determinaram que este vetor não era capaz de voar, no entanto, o fato de possuir longas pernas (Almeida et al 2012) permitiu concluir que a sua chegada ao domicílio pode ter ocorrido por meio da marcha ou pelo transporte passivo. Visto que se detectou indícios da transição desta espécie do ambiente silvestre para o ambiente artificial, o seu potencial de colonização foi estimado através do estudo da sua capacidade reprodutiva em condições de laboratório. Foi realizada a avaliação da oviposição e da eclosão dos ovos comparada a outro membro do complexo *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*. Os resultados mostraram que *T. sherlocki* foi menos prolífico em condições artificiais (Lima-Neiva et al 2012). Contudo, estudos adicionais sobre diferentes parâmetros do ciclo biológico demonstraram o alto potencial desta espécie para colonizar habitações humanas, uma vez que foi capaz de completar o seu desenvolvimento em condições de laboratório com baixa taxa mortalidade. Além disso, se concretizar a sua colonização, *T. sherlocki* poderá representar um problema para o controle vetorial não só por se tratar de uma espécie autóctone, mas também por exibir alta resistência ao jejum (Lima-Neiva et al 2017). A avaliação detalhada dos parâmetros biológicos e comportamentais ao longo do ciclo de desenvolvimento revelaram estratégias de sobrevivência de *T. sherlocki*. A variabilidade do comportamento dos diferentes estádios ninfais frente a condições ambientais adversas (diferentes do habitat natural) foi observada quando parte das ninfas de 5º estágio exibiram um atraso no desenvolvimento, o que corresponderia a um *trad-off* entre sobrevivência e reprodução (Menu et al 2010, Lima-Neiva et al 2017). Esta plasticidade biológica de *T. sherlocki* poderia favorecer a sua adaptação às habitações humanas com consideráveis consequências para o risco de transmissão de *T. cruzi* para a população local, visto que espécimes coletados no ambiente silvestre nas adjacências dos domicílios das localidades de Santo Inácio e

de Encantado apresentaram taxa de 10,9% (Almeida et al 2009) e 20% (Lima-Neiva 2014) de infecção natural por *T. cruzi-like*. A avaliação do tempo de defecação ao longo do ciclo biológico mostrou também que os primeiros estádios ninfais defecam mais rapidamente, sugerindo alto potencial vetorial em relação aos últimos estádios e adultos. Adicionalmente, parte das ninfas de quinto estágio exibiu um comportamento de giro do corpo e deposição de fezes/urina próximo ao local da picada no hospedeiro, o que aumenta o risco de contágio caso o inseto esteja infectado por *T. cruzi* (Lima-Neiva 2014).

Triatoma melanica - De acordo com informações disponíveis, esta espécie ocorre no estado de MG (Costa et al 2003a, 2014) e já foi registrada no sul da BA, no limite com o aquele estado. Este triatomíneo apresenta hábitos exclusivamente silvestres e habita afloramentos rochosos. No município de Espinosa, MG, colônias capturadas no ambiente silvestre foram analisadas quanto à fonte de alimentação, os resultados mostraram que os espécimes alimentaram-se majoritariamente de cabra, tatu e gambá (Costa et al 1998b). Esta espécie raramente é encontrada nos domicílios, podendo, eventualmente, invadí-los, principalmente nos períodos mais secos, no entanto, ainda não foi verificado nenhum indício de colonização. *Triatoma melanica* foi encontrada naturalmente infectada por *T. cruzi-like* no município de Espinosa, 6,6% (Costa et al 1998b) e na localidade Olho d'água, município de Urandi, no sul da BA, 32% (9/28) (Lima-Neiva et al 2009). A avaliação da sua capacidade vetorial em condições de laboratório, considerando o tempo de defecação, mostrou um alto percentual (>39%) de espécimes de todos os estádios defecando em menos de 30 segundos após o repasto sanguíneo (Folly-Ramos et al 2016).

Triatoma b. macromelasoma - Até o momento foi registrada apenas no estado de PE, com exceção da zona da mata e da região metropolitana (Costa et al 2014), podendo ser encontrada no ambiente silvestre, peridomiciliar e intradomiciliar (Gumiel 2011, Costa et al 1998b). O registro de diferentes morfotipos do complexo *T. brasiliensis* em algumas regiões de PE, situadas entre as áreas de distribuição de *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* (Gumiel 2011), e os estudos morfológicos comparativos entre híbridos experimentais e parentais (*T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis*), sugeriram a existência de uma área de hibridação natural em PE e também a origem híbrida de *T. b. macromelasoma* (Costa et al 2009, 2014). Pesquisas entomológicas realizadas no peridomicílio, no município de Petrolina,

mostraram que esta subespécie coloniza rochas, cercas de madeira, abrigos de animais e feixes de madeira seca, alimentando-se principalmente de humanos e cabra. No ambiente silvestre, os resultados mostraram que maior proporção de espécimes alimentava-se de ave e tatu (Costa et al 1998b). Em relação a infecção natural por *T. cruzi*, são necessários mais estudos, uma vez que este triatomíneo ainda não foi encontrado naturalmente infectado com *T. cruzi* (Costa et al 1998b, Gumiel 2011). Entretanto, experimentos realizados em condições de laboratório sobre a suscetibilidade de híbridos de *T. b. brasiliensis* e *T. juazeirensis* demonstraram os parentais e especialmente os híbridos foram suscetíveis a cepa TcI 0354, mostrando a importância epidemiológica das áreas de ocorrência dos morfotipos do complexo de espécies *T. brasiliensis* em PE (Correia 2015).

Triatoma juazeirensis - Sua distribuição geográfica foi registrada no estado da BA e alguns espécimes foram capturados no sudoeste de PE (Costa et 2014). Esta espécie foi capturada no ambiente silvestre, onde, a maioria dos espécimes alimentava-se de sangue de tatu e; no peridomicílio, alimentava-se majoritariamente de sangue de cabra e de humano (Costa et al 1998b). Em 2008, buscas ativas no ecótopo silvestre na localidade de Gameleira, município de Central (BA), resultou na captura de espécimes, em afloramento rochosos, com 42% de infecção natural por *T. cruzi-like* (11/26) (Lima-Neiva et al 2009). Um experimento de laboratório visando estimar o potencial reprodutivo através da taxa de oviposição e eclosão dos ovos de *T. juazeirensis* comparado a *T. sherlocki*, mostrou que *T. juazeirensis* apresentou maior capacidade reprodutiva, sugerindo que poderia formar colônias numerosas no domicílio (Lima-Neiva et al 2012).

Triatoma petrocchiae - Segundo Gurgel-Gonçalves et al (2012), esta espécie foi registrada nos estados da BA, Ceará (CE), Paraíba (PB), PE e RN, no bioma Caatinga. Trata-se de uma espécie silvestre que coabita com roedores silvestres, *Kerodon rupestris* (Wied-Neuwied, 1820) (roedor conhecido como mocó), em afloramentos rochosos (Sherlocki & Guitton 1967, Lent e Wygodzinsky 1979). Nas últimas décadas, entretanto, vem sendo registradas invasões nos domicílios de PE (Silva et al 2012) e indícios de colonização no RN. Neste último estado, espécimes capturados no intradomicílio e no peridomicílio apresentaram taxa de infecção natural por *T. cruzi-like* de 1,3% (2/150) (Barbosa-Silva 2017).

Triatoma lenti - Espécie originalmente descritas a partir de exemplares da BA (Sherlocki & Serafim 1967), no entanto, houve referência a ocorrência de *T. lenti* em

Goiás (GO) (Gurgel-Gonçalves et al 2012). Esta espécie já foi encontrada infectada com *T. cruzi-like* e capturada no ambiente silvestre, onde habita solos pedregosos com refúgios para mamíferos, além de ser capturada no domicílio e em currais (Sherlocki & Serafim 1967). Em 1984, Heitzmann-Fontenelle estudando o ciclo biológico de *T. lenti* (frasco dos espécimes recebidos rotulado de *T. pessoai*) comparado a outros triatomíneos apontou as dificuldades de adaptação desta espécie e de *T. brasiliensis* às condições de laboratório. Carcavallo et al (1994), ao estudar o ciclo biológico da espécie *T. lenti* em condições de laboratório, verificaram que 1/3 dos espécimes morreram e que ela foi capaz de produzir uma geração por ano. Além disso, os pesquisadores observaram que em condições críticas as ninfas realizaram o “canibalismo”, o que seria uma possibilidade adicional de sobrevivência.

T. bahiensis - Os poucos estudos realizados foram direcionados para esclarecer o *status* taxonômico desta espécie, a qual foi, em um primeiro momento, sinonimizada (Sherlock & Serafim 1972, Lent e Wygodzinsky 1979) e recentemente validada (Mendonça et al 2014, 2016). Assim, estudos sobre seus aspectos ecológicos, biológicos e comportamentais devem ser realizados para conhecer seu potencial vetorial.

Triatoma b. brasiliensis - É o vetor de maior importância epidemiológica em áreas semiáridas do nordeste do Brasil (Costa et al 2003a). Apresenta a maior distribuição geográfica em comparação com os demais membros do complexo de espécies *T. brasiliensis*, com ocorrência registrada nos seguintes estados: CE, Maranhão (MA), PB, Piauí (PI), RN (Costa et al 2014, Dale et al 2018). Em GO e TO sua presença é eventual e parece estar correlacionada ao transporte passivo desse vetor. Esta subespécie é a mais provável para colonizar novas áreas, conforme projeções feitas pela modelagem de nicho ecológico para o período 2020-2050 (Costa et al 2014). De fato, sua notável plasticidade biológica possibilita uma variedade de relações ecológicas que podem influenciar nos ciclos de transmissão de *T. cruzi*. No ambiente silvestre, a coabitação de *T. b. brasiliensis* com *K. rupestris* em conglomerados rochosos é antiga e foi observada por Neiva (1914) logo após a sua descrição. Desde então, essa associação vem sendo reportada por vários autores (Sarquis et al 2010, Bezerra et al 2014) e, recentemente, este roedor foi apontado como potencial reservatório de *T. cruzi* em áreas do RN (Almeida et al 2016). Apesar de ser reconhecido como um triatomíneo rupestre, estudos recentes

demonstraram a infestação do cacto Xiquexique, *Pilosocereus gounellei*, por essa subespécie (Valença-Barbosa et al 2014) e a sua associação com outros mamíferos, além dos roedores, como morcegos e marsupiais (Alencar 1987, Sarquis et al 2010, Bezerra et al 2014). No peridomicílio, *T. b. brasiliensis* infesta muros de pedra (serrotes), galinheiros, curral de caprinos, curral de bovinos, pilhas de madeira, pilhas de tijolos, amontoado de pedras, entre outros (Lucena 1970, Costa et al 1998b, Barbosa-Silva et al 2016, Liliuso et al 2017), exibindo alta variedade de hábitos alimentares incluindo: humanos, roedores, caprinos, suínos, felinos, tatu, cães, galinha, répteis, etc (Costa et al 1998b, Bezerra et al 2014, Valença-Barbosa et al 2015, Almeida et al 2016). Esse ecletismo alimentar, considerado uma característica pré-adaptativa (Aragão 1983), confere a esse vetor a capacidade de explorar novas possibilidades ambientais e ecológicas. *Triatoma b. brasiliensis* apresenta uma das mais altas taxas de infecção por *T. cruzi*, dependendo da região geográfica, como em municípios do estado do RN em ecótopos silvestres (172 - 72,5% de infecção natural) (Liliuso et al 2017) e peridomiciliares (176 - 30,7%) e infesta o intradomicílio e peridomicílio em alguns estados (Costa et al 1998b, Costa et al 2003a, Barbosa-Silva et al 2016, Liliuso et al 2017). A avaliação de diferentes parâmetros biológicos de *T. b. brasiliensis* em condições de laboratório evidenciaram que essa espécie é capaz de produzir duas gerações anuais, o que implicaria em uma maior capacidade de infestação do domicílio (Soares et al 2000) e, quanto ao tempo de defecação, uma alta proporção (>39%) de espécimes deste vetor, de todos os estádios, defecaram em menos de 30 segundos após a alimentação (Folly-Ramos et al 2016), mostrando considerável capacidade na transmissão de *T. cruzi*.

1.6. Plasticidade fenotípica e a Morfometria Geométrica

O fenótipo é o resultado da interação entre genes e ambiente. A plasticidade fenotípica (ou variabilidade fenotípica) pode ser definida como a capacidade de um genótipo exibir vários fenótipos em resposta às variações ambientais (Fordyce 2006). Esta flexibilidade nos fenótipos é universal para os seres vivos e pode se manifestar em praticamente qualquer caráter: morfológico, bioquímico, fisiológico, comportamental e história de vida, etc (Whitman & Agrawal 2009). A variabilidade na expressão de um caráter possibilita que os organismos interajam com a heterogeneidade dos ecossistemas, auxiliando-os a ter um bom desempenho em ambientes variáveis. Praticamente qualquer fator abiótico ou biótico pode induzir a

plasticidade, tais como: temperatura, luz, nutrição, fotoperíodo, aglomeração, predador, parasito, etc (Poulin e Thomas 1999, Agarwala 2007, Shingleton et al 2007, Pener & Simpson 2009, Gangur et al 2017, Sugahara & Tanaka 2018). Os estímulos dos fatores abiótico/biótico podem ser recebidos por qualquer modalidade sensorial: química, visual, térmica, mecânica (tátil, acústico), as quais desencadeiam respostas no caráter (plasticidade), mediadas por mecanismos bioquímicos/fisiológicos subjacentes, que estão sendo elucidados gradativamente nos últimos anos à medida que se desenvolvem novas abordagens e ferramentas moleculares (Shingleton et al 2007, Whitman & Agrawal 2009).

A plasticidade fenotípica pode ser adaptativa, quando forças específicas de seleção natural atuam nos caracteres, aumentando o valor adaptativo (*fitness*), pressupondo o envolvimento de múltiplos genes e processos reguladores que atuam em hierarquias diferentes para produzir uma mudança complexa e coordenada como observado em respostas imunes, defesas contra predadores, aclimatizações, diapausa, mudanças na história de vida, dispersões, etc (West-Eberhard 2003, Lytinen et al 2004, Schmid-Hempel 2005). Em contraste, a mudança fenotípica não adaptativa consiste em simples suscetibilidades a estresses ambientais químicos ou físicos. Estresses como toxinas, má nutrição, temperaturas extremas, pH, níveis de O₂ e osmolaridade podem alterar diretamente os processos químicos, enzimáticos, celulares e de desenvolvimento, não regulados pelo organismo (Whitman & Agrawal 2009). Neste caso, o fenótipo novo teria um valor adaptativo reduzido em relação ao ancestral (Ghalambor et al 2007). Casos de plasticidade fenotípica não adaptativa foram reportados em hospedeiros manipulados por parasitóides e herbicidas mudando a morfologia de salamandras (Kenyon e Hunter 2007, Levis et al 2016).

Atualmente, modelos teóricos e estudos empíricos sugerem que caracteres exibindo plasticidade não adaptativa sob forte seleção direcional são capazes de potencializar a rápida evolução adaptativa (Chevin et al 2010, Ghalambor et al 2015). Considerando a evolução adaptativa, a plasticidade fenotípica pode auxiliar a especiação e, neste cenário, teria um papel primário em relação ao isolamento reprodutivo (Gorur, 2005). No contexto dos triatomíneos, este fato é evidente, pois muitas espécies reconhecidas e bem definidas ainda podem realizar cruzamentos interespecíficos (Dujardin et al 2009). Além da importância evolutiva, a plasticidade fenotípica tem importância ecológica, especialmente, porque amplia o nicho ecológico de espécies e populações que são capazes de expressar respostas

plásticas adaptativas (Dujardin 2011). Assim, o conhecimento das causas, dos determinantes e das consequências da plasticidade fenotípica, é essencial também para a compreensão do desenvolvimento e da manutenção da biodiversidade (Pigliucci 2005, Pigliucci et al 2006, Forsman 2014).

Na perspectiva da Biologia Evolutiva, a descrição da plasticidade morfológica, que se trata de um caráter contínuo (métrico), através do uso de ferramentas matemáticas acuradas e da visualização dos resultados morfométricos de forma gráfica e clara contribui para o entendimento de questões evolutivas (Falconer 1960, Wagner 1984, Bookstein 1991). Neste contexto, a Morfometria Geométrica (MoG) vem sendo considerada um método adequado, pois permite a análise e quantificação da variação do tamanho e da conformação das estruturas. A análise separada do tamanho e da conformação são informativos quanto ao seu determinismo genético, sua hereditariedade, sua sensibilidade ao meio ambiente e sua capacidade de fornecer informações indiretas sobre a diferenciação genética de populações naturais. Dessa forma, este método pode auxiliar a compreensão da evolução e da importância ecológica do fenótipo (Dujardin 2011).

A MoG fundamenta-se na análise dos pontos anatômicos de referência (PARs) (*landmarks*), os quais contêm informações do tamanho, da conformação, da distância e da posição relativa entre os PARs. A correspondência anatômica (homologia) dos PAR nas estruturas entre as espécies ou populações estudadas permitem a captura da informação sobre a geometria da estrutura, possibilitando a reconstrução da conformação após as análises multivariadas (Rohlf & Bookstein 2003, Dujardin 2011). Além da descrição mais acurada da conformação, as coordenadas cartesianas, resultantes da conversão dos PAR, permitem a associação da conformação com outros tipos de dados, tais como ecológicos, genéticos, biomecânicos, ambientais ou outros fatores relevantes (Rohlf & Corti 2000).

Nas últimas décadas, a aplicação da MoG tem sido útil para auxiliar na resolução de várias questões em diversas áreas do conhecimento tais como: Biologia Evolutiva, Antropologia Física, Paleontologia e Sistemática (Baylac et al 2003, Baylac e Friess 2005). Na Entomologia Médica, tem sido útil para a diferenciação de espécies crípticas ou isomórficas, para avaliar a estrutura populacional de espécies, o fluxo de indivíduos, e as variações morfológicas relacionadas ao ambiente e ao isolamento geográfico (Dujardin 2011). No grupo dos

triatomíneos há estudos sobre a caracterização e identificação de espécies (Gumiel et al 2003), diferenciação de espécies crípticas (Nattero et al 2017), variações morfológicas relacionadas à fonte alimentar (Nattero et al 2013) e ao estado nutricional (Hernández et al 2018), monitoramento vetorial pela ação de inseticidas (Dujardin et al 1997a, 2007, Hernández et al 2013), avaliação de populações geograficamente distantes (Dujardin et al 1997b), distinção entre populações silvestres e domiciliares (Dujardin et al 1999b), tendo aplicação para a vigilância e controle vetorial da DC.

2. JUSTIFICATIVA

A influência de fatores bióticos e abióticos na plasticidade fenotípica dos triatomíneos tem sido investigada e, em alguns casos, bem documentada. Estudos demonstraram o efeito da temperatura e da umidade (Juarez 1970) e do tipo de fonte alimentar (Costa et al 1987, Guarneri et al 2000) nos parâmetros do ciclo biológico de diferentes espécies. O efeito de fatores externos, eventualmente, suscitou discussões sobre a plasticidade fenotípica adaptativa e suas implicações para a ecoepidemiologia da doença de Chagas (Menu et al 2010, Lima-Neiva et al 2017). Alterações fenotípicas induzidas por parasitos nos seus hospedeiros foram demonstradas (Poulin e Thomas 1999), entretanto, este é um tema controverso em relação à interação *T. cruzi*-vetor. Embora, por convenção, admita-se que *T. cruzi* não seja patogênico para o triatomíneo (Zeledón et al 1970, Juarez 1970), evidências dos efeitos deste parasito no ciclo de desenvolvimento (Botto-Mahan, 2008), comportamento (Ramírez-Sierra et al 2010), reprodução (Fellet et al 2014) e morfologia (Nouvellet et al 2011) estão sendo reportados, mostrando a necessidade de mais estudos a serem desenvolvidos com diferentes linhagens do parasito analisadas em diferentes espécies de triatomíneos correlacionando-os também às condições ambientais.

A variação fenotípica também é sinalizada na morfologia e, neste caso, a MoG é uma técnica eficiente e útil para descrever a variabilidade morfológica de populações. Pesquisas em sistemas naturais levantaram evidências de que o ecótopo (Batista et al 2012), o tipo de fonte alimentar em conjunto com o habitat (Nattero et al 2015), o estado de nutrição (Hernández et al 2018) e o parasito (Nouvellet et al 2011) influenciam na morfologia dos triatomíneos. Análises dos

parâmetros morfométricos como tamanho e conformação, separadamente, são informativos quanto ao seu determinismo genético, sua hereditariedade, sua sensibilidade ao meio ambiente e sua capacidade de fornecer informações indiretas sobre a diferenciação genética de populações naturais. Dessa forma, a MoG pode auxiliar na compreensão de processos evolutivos, bem como na elucidação de fatores ligados a interação ecológica do fenótipo (Dujardin et al 2009, Dujardin 2011).

A importância de *T. b. brasiliensis* para a saúde pública em áreas semiáridas do nordeste impulsionou o levantamento de informações relevantes para a caracterização do seu potencial vetorial. Pesquisas sobre as suas taxas de infecção natural, índices de infestação domiciliar (Costa et al 1998b, Costa et al 2003, Barbosa-Silva 2017), distribuição geográfica (Costa et al 2014), tempo de defecação (Soares et al 2000, Folly-Ramos et al 2016), fontes de alimentação (Costa et al 1998b, Valença-Barbosa et al 2015, Almeida et al 2016) capacidade de ocupar diferentes ambientes: silvestre, peridomiciliar e intradomiciliar (Costa et al 1998b, Sarquis et al 2010, Bezerra et al 2014, Valença-Barbosa et al 2014, Liliuso et al 2017) deram suporte para o controle da DC. No entanto, apesar dos esforços de controle e vigilância entomológica, em 2015 registrou-se a ocorrência de um surto de DC associado à ingestão de caldo-de-cana, com provável contaminação por *Triatoma b. brasiliensis* infectado no município de Marcelino Vieira, estado do Rio Grande do Norte (Vargas et al 2018).

No Rio Grande do Norte, a dinâmica de povoamento do espaço geográfico ao longo de décadas, com desmatamento do bioma Caatinga para implementação de atividades econômicas, foram as principais causas do processo de desertificação. Este fenômeno é observado desde a década de 1970 e na região do Seridó ocorre de forma mais intensa, onde foi caracterizado o núcleo de desertificação (MMA 2007). Em um cenário de mudanças climáticas ou aquecimento global, áreas de intensa desertificação são suscetíveis ao agravamento da seca e, conseqüentemente, à perda da flora e da fauna ou migração da fauna local para ambientes estáveis, além de afetar a saúde da população humana (Leal et al 2005, Marengo 2008).

Neste contexto, o levantamento de informações sobre as infestações de ecótopos naturais e artificiais por *T. b. brasiliensis* é crucial para evitar a ocorrência de casos e surtos da DC. Adicionalmente, estudos sobre a variabilidade métrica alar

de populações desta subespécie em áreas com intenso impacto antrópico e suscetíveis ao agravamento da seca são necessários para o conhecimento das possíveis respostas deste vetor frente a pressões seletivas, considerando também a reconhecida variabilidade genética de *T. b. brasiliensis* (Monteiro et al 2004). Estas pressões seletivas podem ser impostas por fatores bióticos, tais como a interação vetor-parasito e vetor-espécies hospedeiras e/ou fatores abióticos como as características microclimáticas de diferentes ecótopos, os quais podem atuar em sinergia.

Diante do cenário exposto acima, o presente estudo se propôs não só analisar o papel deste vetor na dinâmica de transmissão de *T. cruzi*, mas também avaliar a possível influência de fatores de fatores externos na variabilidade morfológica das asas de *T. b. brasiliensis* de localidades do município de Caicó, situado na região do Seridó do estado do RN. A MoG foi usada para analisar as variações do tamanho do centróide e da conformação da estrutura alar das populações desta subespécie de acordo com as seguintes abordagens: comparações (i) entre localidades - testando a hipótese de diferenciação entre as populações pelo isolamento por distância e/ou barreira física; (ii) entre ecótopos (silvestres-peridomiciliar) - testando a hipótese de diferenciação entre as populações relacionadas ao tipo de ecótopo, pressupondo diferenças nas variáveis microclimáticas (temperatura, umidade, insolação, iluminação, etc) e tipo/disponibilidade da fauna que compõe os recursos tróficos explorados por *T. b. brasiliensis* presentes nestes ambientes e (iii) entre grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*, provenientes do mesmo ambiente/localidade - testando a hipótese de variabilidade morfológica influenciada pelo parasito.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

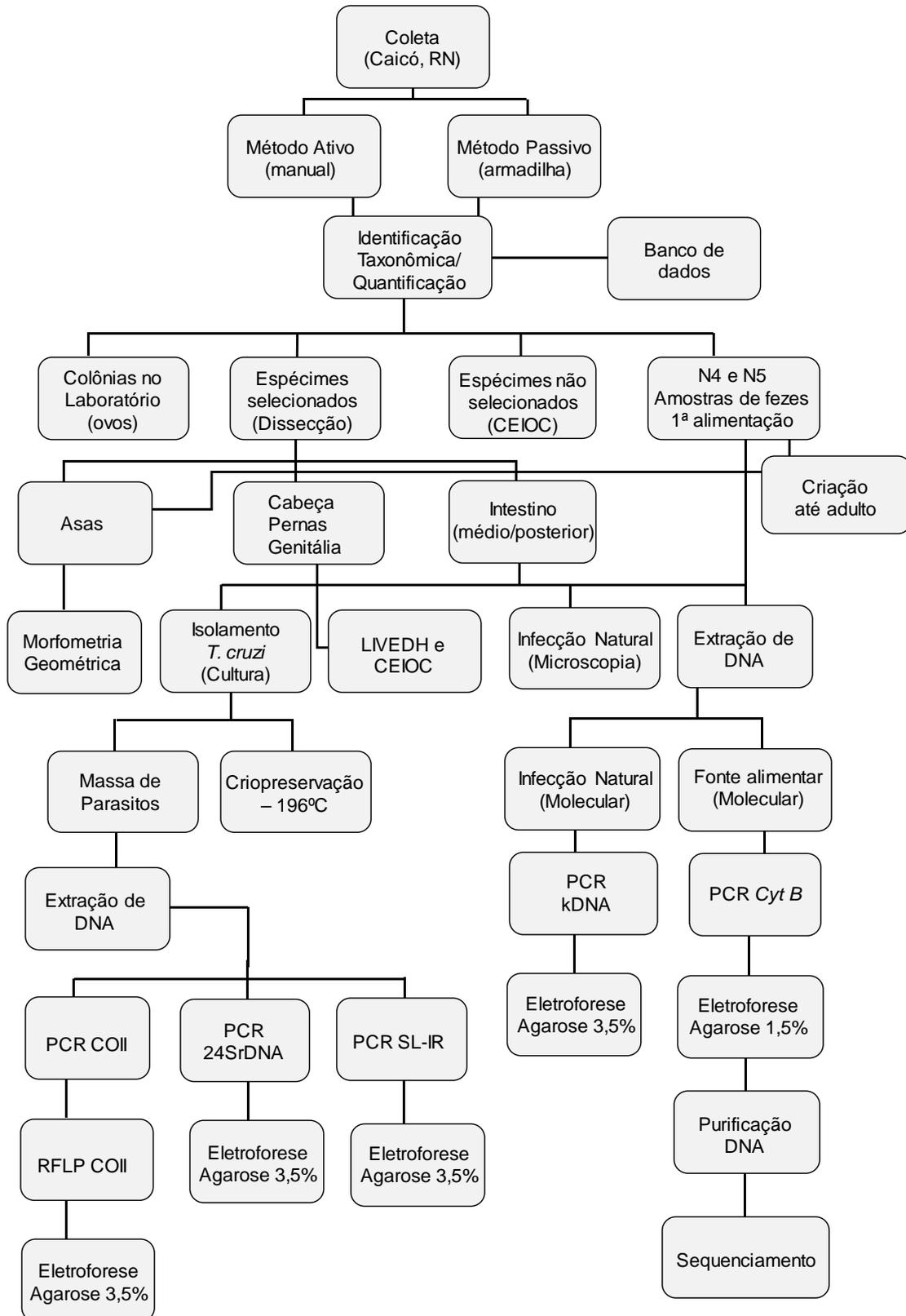
Analisar o papel de *T. b. brasiliensis* nos ciclos transmissão de *T. cruzi* e avaliar a possível influência de fatores bióticos e abióticos na variabilidade morfológica das asas de populações deste vetor em áreas do município de Caicó, região do Seridó do Rio Grande do Norte, Brasil.

3.2. Específicos

- ✓ Avaliar o índice de infecção natural por *T. cruzi* das populações de *T. b. brasiliensis* capturadas ecótopos silvestres: conservado, modificado e peridomiciliares;
- ✓ Determinar as fontes de alimentação das populações de *T. b. brasiliensis* capturadas ecótopos silvestres: conservado, modificado e peridomiciliares e inferir suas possíveis fontes de infecção por *T. cruzi*;
- ✓ Identificar as Unidades Discretas de Tipagem (DTUs TcI-TcVI) de *T. cruzi* circulantes nas populações *T. b. brasiliensis* capturadas em ecótopos silvestres conservado, modificado e peridomiciliares;
- ✓ Caracterizar a variabilidade morfológica das asas de populações de *T. b. brasiliensis* entre ecótopos (silvestres e peridomiciliares) e entre diferentes localidades;
- ✓ Verificar se a variabilidade morfológica das asas de populações de *T. b. brasiliensis* pode estar relacionada a sua possível suscetibilidade à infecção natural por *T. cruzi*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Fluxograma do desenho experimental



4.1. Área de estudo

O estado do RN [5°46'45.32"S; 35°12'03.30"O (capital)] situa-se na região nordeste do Brasil e faz fronteira com Oceano Atlântico (norte e leste), estados da Paraíba (sul) e Ceará (oeste) (Figura 4.1). Sua área territorial é de 52.810,70 Km², o que representa 0,62% do território nacional e 3,14 % da região nordeste. No interior do estado, os climas árido e semiárido são contínuos do sul até o litoral setentrional, perfazendo 70% da sua superfície. O clima úmido ocorre no litoral oriental e o sub-úmido seco ao sul da região oeste, litoral oriental e nas áreas serranas. Na região do semiárido a caatinga é a vegetação predominante, esta compõe a porção setentrional do estado e caracteriza-se por ser uma vegetação arbustiva-arbórea densa de estrutura irregular, muitas vezes formando moitas e deixando o solo parcialmente descoberto (IDEMA, 2015).

O RN é composto por 167 municípios distribuídos em quatro mesorregiões geográficas: Oeste Potiguar, Central Potiguar, Agreste Potiguar e Leste Potiguar (Figura 4.1). Segundo o último censo demográfico do IBGE (2010), a população do estado compreende 3.168.027 habitantes. Desde a década de 1950 até 2010, a população residente em área urbana vem aumentando, representando no último censo (2010) 2.465.439 habitantes, enquanto a população residente em áreas rurais se mantém estável, 702.694 habitantes (censo de 2010) (IBGE, 2018). No que diz respeito às atividades econômicas do RN, o plantio de cana-de-açúcar, no litoral, foi a primeira atividade econômica que serviu de base para o povoamento do estado; a pecuária, no início do século XVIII, e a economia algodoeira foram desenvolvidas no espaço sertanejo, esta última foi objeto de exportação (Felipe et al 2011). Assim, a agricultura, a pecuária e a mineração são as principais atividades econômicas que causam impacto antrópico do estado (Rio Grande do Norte 2010).

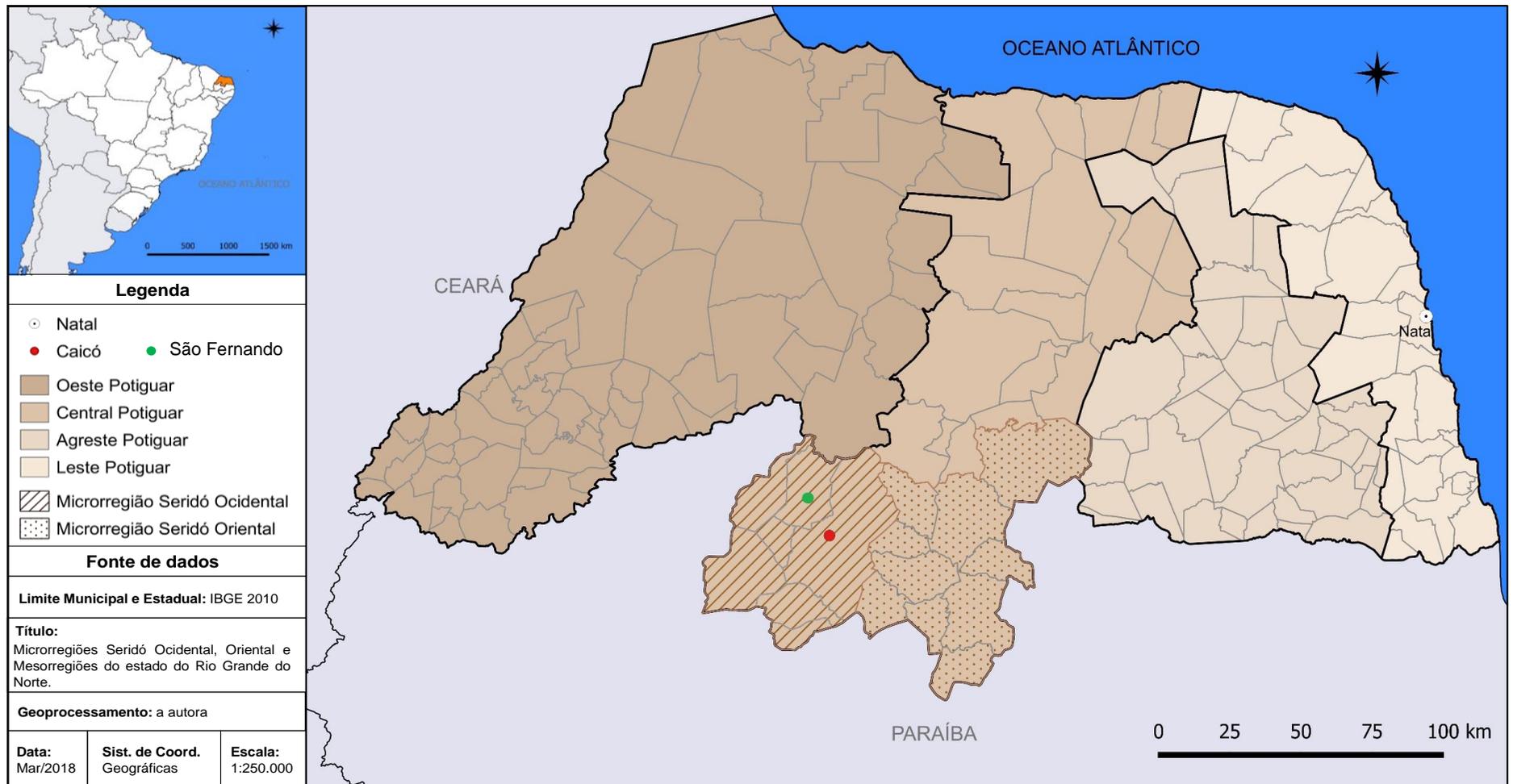


Figura 4.1. Mapa do Rio Grande do Norte com a divisão das mesorregiões, microrregiões Ocidental e Oriental da região do Seridó e municípios. Ponto em vermelho destacando o município de Caicó e ponto verde o município de São Fernando.

O município de Caicó (6°27'30"S 37°05'52"O), localidade tipo de *T. b. brasiliensis*, situa-se no interior do RN, ao sul da mesorregião Central e junto com mais 6 municípios compõe a microrregião Seridó Ocidental (Figura 4.1). Este município distancia-se da capital Natal em 273 km, possui 1.228,583 Km² de extensão territorial e uma população de 62.709 habitantes (censo de 2010) (IBGE, 2018). Quanto à classificação climática de Köppen, o clima de Caicó é o semiárido (IDEMA, 2017), sendo considerado um dos municípios mais quentes do RN com registro de temperatura máxima de 40°C (mín. de 16,8°C e média compensada de 28°C). O período de chuvas se concentra nos primeiros meses do ano, com índice pluviométrico de 630 anuais, de acordo com dados de 1995-2017 (INMET, 2018). Características climáticas registradas em 2016 são mostradas na tabela 4.1 e na figura 4.2. Caicó foi colonizado por volta de 1700, período em que se iniciou o desmatamento da Caatinga para introdução da agricultura e da pecuária como consequência do surgimento e da ampliação dos primeiros núcleos demográficos (IBGE 2018, Cariglio 2010). Atualmente, a economia local é diversificada e baseia-se majoritariamente na prestação de serviços, correspondendo 87% do PIB do município. O setor industrial contribui com 7,4% do PIB e a agropecuária, que foi a base da economia até o início da década de 1970, representa hoje 4,8% do PIB (IBGE 2018).

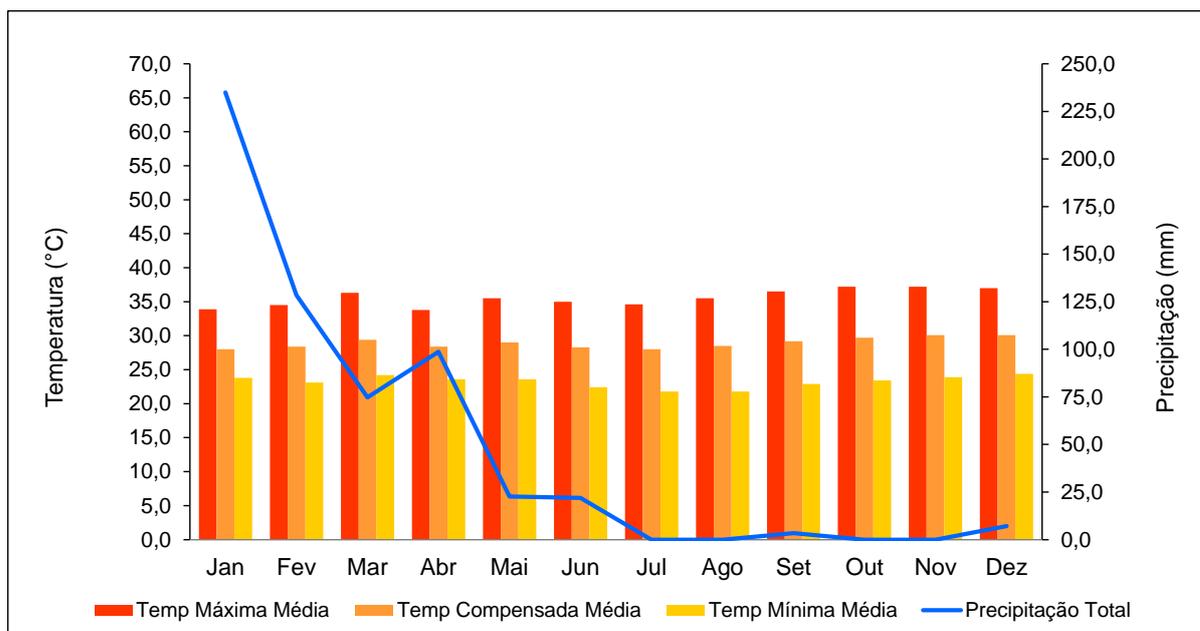


Figura 4.2. Variáveis climáticas registradas mensalmente para o município de Caicó em 2016. Fonte de dados: INMET, estação meteorológica 82690 Caicó.

Tabela 4.1. Características climáticas de Caicó em 2016.

Município	Caicó
Temperatura média anual (°C)	28,9
Temperatura máxima média do mês mais quente (°C)	37,2
Temperatura mínima média do mês mais frio (°C)	21,8
Precipitação anual (mm)	591,8
Precipitação do mês mais chuvoso (mm)	234,9
Precipitação do mês mais seco (mm)	0
Umidade relativa média do mês mais chuvoso (%)	72,7
Umidade relativa média do mês mais seco (%)	50,4
Altitude (m)	169

Fonte dos dados: INMET, estação meteorológica 82690 Caicó.

4.1.2. Seleção das localidades de estudo em Caicó

Durante a expedição de campo, 15 localidades foram visitadas, 10 na área rural de Caicó: Barra do Lagedo, Fazenda Fortuna, Inácio (fazenda), Montanhas, Nova Descoberta, Pedra do Sino, Pedregulho, Sítio Riacho do Santo, Serraria e Sítio São Bernardo de Elias e 2 na área Urbana: Batalhão de Polícia Ambiental e Batalhão de Engenharia de Construção. Foram pesquisadas também 2 localidades do município de São Fernando: Sítio Marcação e Sítio Serrote. Recebemos também de moradores espécimes capturados em outras três localidades: Barra Nova, São José do Seridó e Serrote Branco. Estes foram apresentados junto com os resultados de ocorrência e infestação de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais das 18 localidades.

Para o estudo da variabilidade morfométrica das asas de *T. b. brasiliensis* e sua possível relação com a infecção natural, fonte alimentar e ecótopo, selecionamos 5 localidades de acordo com os seguintes critérios: (i) número de espécimes capturados, pois precisávamos de um tamanho amostral adequado para as análises, (ii) estudos prévios realizados na área (Costa et al 1998b, Lima 2013, Almeida et al 2016) e (iii) estimativas do grau de interferência humana e de animais domésticos no ecótopo silvestre de acordo com observações de campo. Dessa forma, foram selecionadas as localidades: Sítio Pedregulho, Sítio Inácio, Sítio São Bernardo de Elias (SSBE), Sítio Riacho do Santo (SRS) e o Batalhão de Engenharia de Construção (BEC) (Figura 4.3).

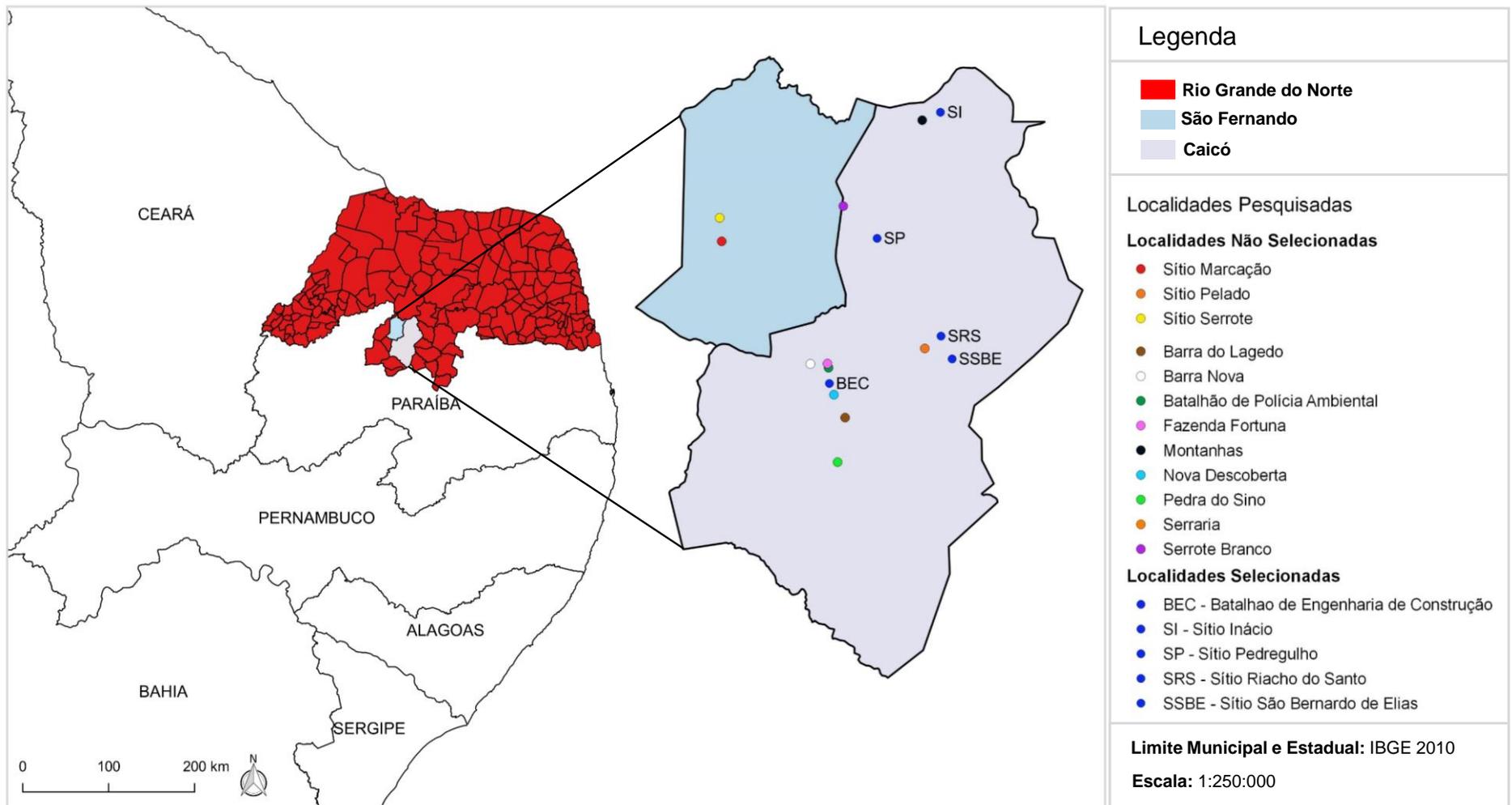


Figura 4.3. Localização dos pontos de coleta nas áreas de estudo dos municípios de Caicó e São Fernando, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Geoprocessamento: a autora.

Entre as cinco localidades escolhidas, o BEC é a única localizada dentro do perímetro da área urbana. Apesar desta característica, o seu campus possui uma área conservada com fauna e flora nativas preservadas. Esta área é circundada por muros altos, o seu acesso é permitido apenas aos soldados que a utilizam para treinamento. Este ambiente também é protegido da caça e, eventualmente, animais domésticos como gatos são retirados para manter preservada a fauna local. As demais localidades situam-se na zona rural, todas as famílias desenvolvem atividades econômicas de subsistência como a criação de bovinos, caprinos, ovinos, etc. Nestes sítios, os animais domésticos podem, ocasionalmente, circular no ambiente silvestre modificado (SM). Assim, estimamos o grau de interferência humana e de animais domésticos no ecótopo silvestre modificado de acordo com observações de campo: visualização dos animais domésticos ou seus vestígios (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Distância dos pontos de coleta no ecótopo silvestre modificado até as UD's e observação de sinais de interferência humana ou de animais domésticos.

Localidade	Distância da UD	OAD	Sinais de Interferência
Sítio Pedregulho	300 m	não	fezes de bovinos
Sítio Inácio	20-50 m	não	lixo
Sítio São Bernardo de Elias	300 m	não	não foi observado
Sítio Riacho do Santo	200-300 m	não	não foi observado

Abreviações: UD. Unidade Domiciliar, OAD. observação de animais domésticos

4.2. Captura de triatomíneos

Para realização da captura e transporte dos triatomíneos, este trabalho obteve autorização (número 43393-1 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade/Ministério do Meio Ambiente (ICMBio - Sisbio). Foi realizada uma expedição entre os dias 08 a 23 de novembro de 2016, período seco na região (Figura 4.2). As capturas foram efetuadas com a colaboração dos agentes de endemias da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) de Caicó, que sugeriram locais de maior probabilidade de infestação com base nos dados da Vigilância Entomológica (VE). As investigações foram realizadas nos ambientes intradomiciliar (Figura 4.4 A-F) e peridomiciliar (Figura 4.5 A-F) das Unidades Domiciliares (UDs) e,

em algumas localidades, no ambiente silvestre modificado a ~ 50-300m das UDs (Figura 4.6 A-F).



Figura 4.4. Pesquisa entomológica no ambiente intradomiciliar das UDs na área rural de Caicó, RN. **A.** Busca ativa embaixo do colchão, **B.** detecção de vestígios de fezes de triatomíneo na parede, **C.** ninfa de 5º estágio em uma casa desabitada (retângulos azuis), **D.** vistoria em um ninho de galinha mantido no interior do domicílio, **E.** vistoria de caixas de papelão que estavam embaixo da cama, **F.** ninfa de 5º estágio encontrada nas caixas de papelão embaixo da cama (ao fundo um ninho de galinha mantido dentro do quarto, seta azul clara). Fotos: acervo da autora.



Figura 4.5. Pesquisa entomológica no ambiente peridomiciliar das UD em áreas rurais de Caicó, RN. **A.** Casa construída de concreto e ao fundo um galinheiro encostado na parede da casa (seta azul clara), **B.** curral de bovinos composto por muro de pedras (seta azul claro), **C.** vistoria de uma pilha de telhas, **D.** chiqueiro de porco construído ao redor de um afloramento rochoso: cobertura (seta contínua), cerca de estacas (seta pontilhada), afloramento rochoso (seta tracejada), **E.** pedra com resíduo de sangue usada para matar triatomíneos no dia anterior a nossa visita (retângulo preto), **F.** ninfa de 3º estágio encontrada em uma cerca de pedra a 10 metros da casa. Fotos: acervo da autora.



Figura 4.6. Pesquisa entomológica no ambiente silvestre a ~20-300m das UDs em áreas rurais de Caicó, RN. **A.** Vista geral do afloramento rochoso com vegetação típica do bioma Caatinga, **B.** coleta noturna, **C.** armadilhas de Noireau preparadas para a instalação (seta azul clara), **D.** armadilha presa a uma vara (~ 2,5m) para possibilitar o seu posicionamento no interior da fenda da rocha, **E.** instalação de uma armadilha em um serrote (muro de pedra), **F.** ninfa de 5^o estágio presa na fita adesiva da armadilha. Fotos: acervo da autora.

O intradomicílio foi definido como espaços fechados por portas, compreendendo casas, onde principalmente humanos habitam (algumas pessoas tem o hábito de criar animais dentro de casa) (Figura 4.4 D e F). O peridomicílio foi caracterizado como o ambiente no entorno da casa, em um raio de até 300 m, onde animais domesticados (galinhas, cães, gatos, caprinos, suínos, bovinos, etc) dormem ou são criados (Figura 4.5 A-D). O ambiente silvestre modificado, foi determinado após um raio de ~ 20 a 300m do peridomicílio, onde se avistava os afloramentos rochosos, ecótopos onde triatomíneos e roedores silvestres são visualizados, nos quais vestígios de humanos e animais domésticos podem ser encontrados. O ambiente silvestre conservado (SC), referente ao BEC, foi caracterizado pela presença de afloramentos rochosos e fauna e flora nativa preservada sem circulação de animais domésticos (Almeida et al 2016).

Buscas ativas com auxílio de pinça e lanterna foram executadas no intradomicílio, estas foram realizadas durante o dia (8:30h-10:30h), sendo examinados fendas nas paredes, atrás de mobiliários, objetos encostados na parede, papelões embaixo dos colchões, espaços embaixo das camas e ninhos de galinhas, etc (Figura 4.4 A-F). No peridomicílio, as coletas ativas foram feitas durante o dia (8:30h-10:30h) e à noite entre 19:30h e 20:30h, pois durante as vistorias noturnas observamos maior número de insetos na superfície dos ecótopos. Foram vistoriadas pilhas de telhas, pedras e madeiras, muros de pedras (serrotes), galinheiros, chiqueiros, currais de bovinos, caprinos e ovinos, entre outros (Figura 4.5 A-F). Nos afloramentos rochosos no ambiente modificado, empregou-se a coleta ativa, descrita acima, e a coleta passiva por meio da utilização de 50 armadilhas de Noireau (Figura 4.6 C), nas quais se utilizou pintinhos como isca. As armadilhas foram instaladas ao pôr do sol às 17:00h e retiradas às 6:00h do dia seguinte. Após a instalação das armadilhas, buscas ativas foram executadas até as 20:00h, sendo as capturas feitas manualmente e com o auxílio de pinças (Figura 4.6 A-F).

À medida que os espécimes eram coletados, os mesmos eram acondicionados em tubos de plástico (Tubos Falcon® de 50 mL) (Figura 4.4 F), que continham em seu interior papel filtro dobrados em sanfona para facilitar a locomoção dos triatomíneos e reduzir a umidade. Os tubos tiveram as suas tampas perfuradas para a oxigenação dos insetos e foram devidamente rotulados com as informações de procedência (coordenada geográfica, nome da localidade, ambiente, ecótopo e data). De acordo com as normas de Biossegurança, os triatomíneos foram

adeguadamente acondicionados em uma caixa para material biológico e transportados por uma empresa especializada. O material biológico foi processado e analisado no Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera (LIVEDH) do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, no Rio de Janeiro e, posteriormente, análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular e Hematologia (LDMH) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.3. Identificação e manutenção dos triatomíneos

No LIVEDH, todos os triatomíneos foram quantificados e identificados quanto ao estágio evolutivo. A identificação das espécies foi realizada pelo exame morfológico de acordo com as chaves de identificação de Lent & Wygodzinsky (1979) e Costa et al (2013). Todos os espécimes receberam um código e foram registrados em um banco de dados, elaborado no *software Excel*, que reuniu as informações de campo e de laboratório. As ninfas de 4º e 5º estádios, ao se tornarem adultas, tiveram sua identificação específica confirmada. Os triatomíneos coletados nas localidades que não foram selecionadas para o estudo foram depositados na coleção Jane Costa & Lima-Neiva, do IOC. Colônias formadas a partir dos ovos postos por algumas populações estão sendo mantidas no insetário do LIVEDH (Figura 4.7 A), alimentadas quinzenalmente em camundongos *Mus musculus* (Linnaeus, 1758), os quais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2%, dose 0,08 ml/100g de peso como pré-anestésico, e cloridrato de quetamina 5%, dose 0,2 ml/100g de peso como anestésico geral, ambos pela via intraperitoneal, procedimento aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ, licença LW-18/19. Os espécimes provenientes das localidades selecionadas para o estudo foram individualizados em tubos Falcon de 50ml/25ml e rotulados com o código correspondente às suas informações do banco de dados (Figura 4.7 B).

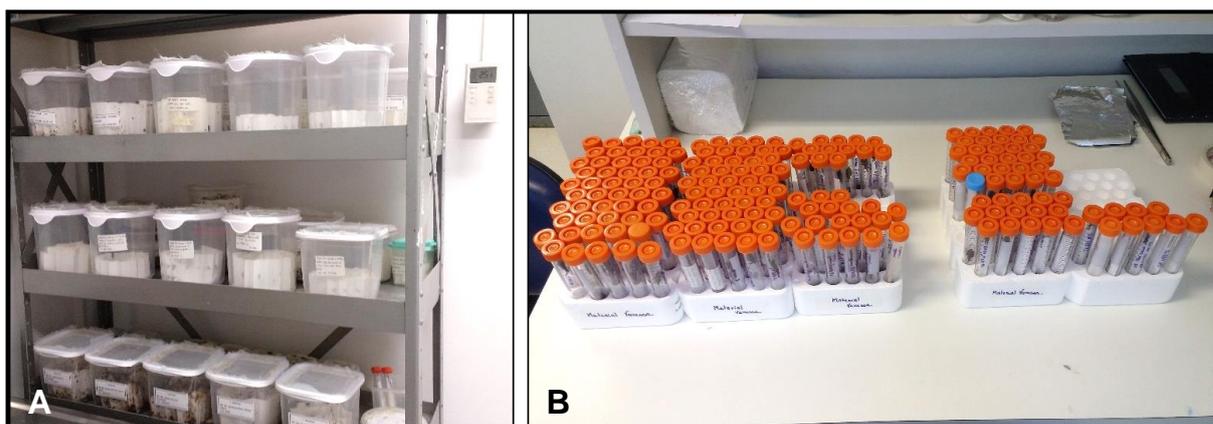


Figura 4.7. A. Colônias de *T. b. brasiliensis* mantidas no insetário do LIVDH, B. Espécimes individualizados em tubos Falcon 25mL para posterior dissecação. Fotos: acervo da autora.

4.4. Processamento do material biológico, exame parasitológico do conteúdo intestinal e isolamento de *T. cruzi*

Em ambiente estéril da cabine de biossegurança, cada inseto foi mergulhado em álcool a 70% por 10 segundos, seco com gaze hidrófila e em seguida o mesmo foi dissecado (Figura 4.8 A e B). Foram retiradas as pernas, as asas e a cabeça, as quais foram acondicionadas em microtubo do tipo *Eppendorf* de 1,5 mL (pernas e cabeça) e papel alumínio (asas), devidamente rotulados com o seu código. A dissecação do intestino consistiu em remover a cutícula dorsal do abdômen com auxílio de pinças e tesoura, em seguida, procedeu-se a retirada do intestino médio e posterior. O intestino foi macerado em placa de Petri estéril, contendo uma solução estéril de 3,0 mL de salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffer Saline* - PBS) (1M, pH = 7,2 - 7,4) com 100µg de 5-fluorocitosina (substância antifúngica) e 150 µL de Penicilina-Streptomicina (antibiótico), seguindo protocolo de Gonçalves (2000). Após a maceração, a solução homogeneizada foi dividida em três partes:

(i) 100µL para o exame direto, esta alíquota foi colocada ente lâmina e lamínula para pesquisa de tripanosomatídeos ao microscópio óptico em aumento de 400 x;

(ii) 1mL para isolamento do parasito, esta amostra foi semeada em 2 tubos de ensaio (500µL em cada) contendo 4 mL de meio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) (Camargo 1964), 20% de soro fetal bovino e ágar e sangue ou NNN, Novyl & McNeal (1904) e Nicolle (1908), para o isolamento do parasito (Figura 4.8 D). Os tubos foram incubados a 28°C e, após isto, 100µL da cultura foram examinados ao

microscópio óptico uma vez por semana, durante 5 meses, para detecção do parasito. As culturas positivas foram repicadas, quando necessário, até 2 vezes. A partir das culturas positivas, rica em flagelados (Figura 4.8 E), foi retirada uma alíquota de 3mL e semeada em meio LIT para o desenvolvimento e multiplicação do parasito, visando a formação da massa de parasitos (Figura 4.8 F) para posterior caracterização molecular de *T. cruzi*. Por fim, uma alíquota de cada cultura rica em parasitos foi criopreservada em Nitrogênio Líquido a -196°C;

(iii) 1,9mL para análise molecular da fonte alimentar e da infecção natural, esta alíquota foi colocada em 2 microtubos do tipo *Eppendorf* de 1,5 mL (950µL em cada). As pernas e os extratos do intestino foram conservados em freezer a -20°C do LIVEDH para posteriores análises moleculares. As cabeças foram guardadas em tubos do tipo *Eppendorf* e serão usadas para análises sobre a variabilidade morfológica. As asas foram utilizadas no presente estudo para o estudo da variabilidade morfométrica, utilizando a MoG.

As ninfas de 4º e de 5º estádios que foram alimentadas quinzenalmente em camundongos por um período de 1 ano e meio, visando o seu desenvolvimento até a fase adulta para utilizar as asas na MoG, tiveram as fezes/urina coletadas (somente após a primeira alimentação no laboratório) para análise molecular da fonte alimentar e pesquisa de *T. cruzi* pelo exame direto à fresco. Neste procedimento, as ninfas foram alimentadas individualmente até a repleção, após isso, foram colocadas em um *Eppendorf* de 1,5 mL, onde os dejetos eram eliminados de forma espontânea, sem compressão abdominal (Figura 4.8 C). As amostras de fezes/urina eram misturadas a 200-300µL de PBS e conservadas a -20°C para posteriores análises moleculares.

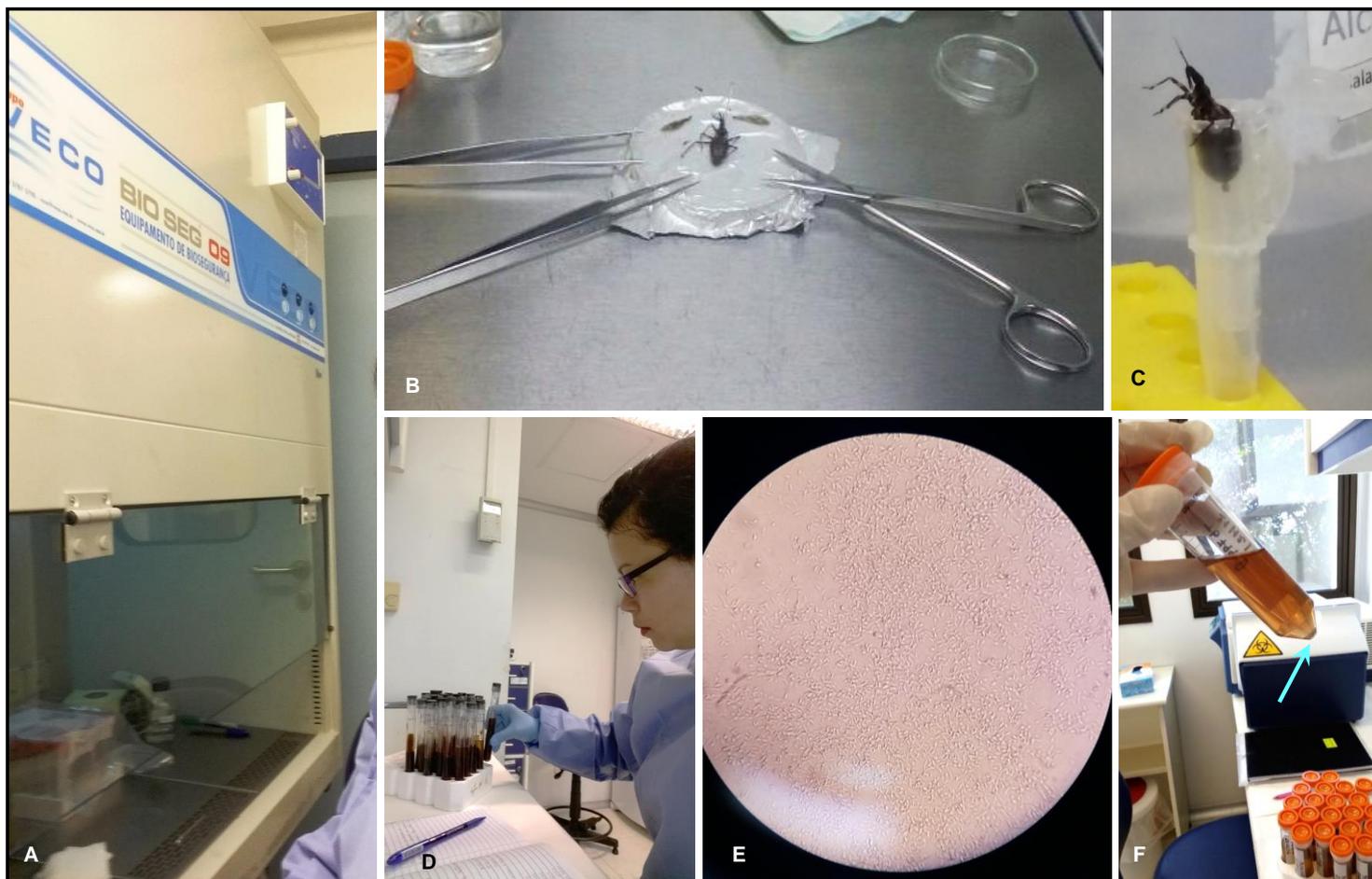


Figura 4.8. Obtenção das amostras do conteúdo intestinal dos espécimes de *T. b. brasiliensis*. **A.** Cabina de Biossegurança onde os insetos foram dissecados, **B.** Exemplo de um espécime no momento da dissecção com suas asas extirpadas, **C.** Ninfa de 5^o estágio ingurgitada em um *Eppendorf* de 1,5 mL, onde suas fezes foram eliminadas de forma espontânea, **D.** Checagem de possível contaminação das culturas (NNN/LIT) por fungos para posterior checagem quanto à positividade do parasito, **E.** Observação ao microscópio óptico (400x) de alíquota de cultura positiva rica em flagelados, **F.** Massa de parasitos (seta azul clara) em meio LIT. Fotos: acervo da autora.

4.5. Análise molecular da fonte alimentar e da infecção natural por *T. cruzi*

4.5.1. Extração de DNA

Parte das amostras de extrato de intestino dos triatomíneos (alíquota de 200µL) teve o DNA total extraído empregando o Kit de extração *Illustra Blood GenomicPrep Mini spin kit* (GE Healthcare Life Science, Chicago, USA), seguindo as instruções do fabricante e, em uma fração das amostras, utilizou-se o método Fenol-Clorofórmio. Neste método, 500µL de extrato de intestino foram incubados com 10µL Proteinase K (20mg/mL) e 25 µL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10% *overnight*, a uma temperatura de 56°C. Em seguida, utilizou-se 500µL de fenol-clorofórmio (1:1) e 500µL de clorofórmio para a purificação do DNA antes da precipitação com 50µL de acetato de sódio 3M e 1mL de etanol absoluto. Os pellets obtidos foram ressuspensos em 30µL de H₂O ultra-pura (Sambrook et al 1998). A concentração de DNA foi estimada utilizando o aparelho Nanoespectrofotômetro DS-11 (Uniscience, Flórida, USA) e o grau de pureza foi determinado pela reação de absorvância em uma faixa de comprimento de onda de 260/280 nm. A concentração final do DNA (20 - 50 ng/µL) foi alcançada após diluição em H₂O ultra-pura quando necessário. O DNA extraído foi conservado a -20°C para análises posteriores.

4.5.2. Identificação molecular de *T. cruzi*

A identificação molecular de *T. cruzi* foi realizada empregando-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR). Nesta técnica, os iniciadores 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA-3') foram empregados com o objetivo de amplificar regiões hipervariáveis dos minicírculos do kDNA de *T. cruzi*, resultando na obtenção de produtos de 330 pb (Sturm et al 1989, Wincker et al 1994), seguindo o protocolo adaptado de Wincker et al (1994). Uma vez que esses iniciadores amplificam para *T. rangeli* (perfil de bandas 300pb, 360pb e 760pb) utilizamos controle positivo para *T. rangeli* de acordo com (Moreira et al 2017). Neste mesmo ensaio, em um formato multiplex (PCR multiplex), adicionou-se os iniciadores P2B (5'-AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT-3') e P6R (5'-GCTGCACCTTGACCTGACATT-3'), visando amplificar um fragmento de 163pb correspondente a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos pertencentes aos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus* (Uehara et al 2012, Moreira et al

2017), os quais funcionaram como controle da extração de DNA. Os reagentes usados na PCR foram: 2,5µL de 10X Taq Buffer (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 2,5µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs 0,2 mM, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 4,5µL MgCl₂ (25mM, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 1µL de cada iniciador 121 e 122 (10pmol/µL), 0,3µL de cada iniciador P2B e P6R (10pmol/µL), 0,2µL da Taq DNA polimerase convencional (Solução estoque: 5U/µL) (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 7,7µL de H₂O ultra-pura e 5µL de DNA molde, perfazendo volume final de 25µL. Controles positivos, 5µL DNA (2ng/ µL) de cultura acelular de *T. cruzi* da cepa Y e 5µL DNA (2ng/ µL) de cultura acelular de *T. rangeli* da cepa Macias e controle negativo, a mesma mistura da reação sem DNA, foram utilizados para o monitoramento das etapas de extração de DNA e mistura dos reagentes. A PCR foi realizada no aparelho Axygen® MaxyGene™ (Biocristal) de acordo com o seguinte perfil térmico: 2 ciclos (98°C, 1 min e 64°C, 1min), 33 ciclos de desnaturação (94°C, 1min), anelamento (64°C, 1min) e extensão final de 72°C por 10 min (Wincker et al 1994). O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3,5%, onde também se utilizou marcador molecular de 50pb para determinar, de forma comparativa, o tamanho do fragmento. Em seguida, as bandas foram coradas em solução de brometo de etídio 0,04% por 10 minutos e visualizadas em transluminador com luz ultravioleta.

4.5.3. Identificação das fontes alimentares

Para a identificação das fontes alimentares dos triatomíneos, foi realizada a PCR com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores universais para animais vertebrados (mamíferos, aves, anfíbios, répteis e peixes) que amplificam um segmento do gene Citocromo B (*Cyt B*) do DNA mitocondrial (mtDNA), resultando em um produto de 307pb (excluindo os iniciadores). Tais iniciadores, denominados L14841 (5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') e H15149 (5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'), foram desenvolvidos por Kocher et al (1989) e, segundo Malmqvist et al (2004), não amplificam o DNA do triatomíneo presente no tecido que compõem os órgãos internos do abdômen. Neste estudo, seguiu-se o protocolo adaptado por Dias et al (2010).

As reações ocorreram em um volume final de 50 µL com os seguintes reagentes: 5µL de 10X Taq Buffer (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 5µL de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs 0,2mM, Thermo Scientific, Massachusetts,

USA)), 4µL MgCl₂ (25mM, Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 1µL de cada iniciador L14841 e H15149 (10pmol/ µL), 0,3µL da Taq DNA polimerase (Solução estoque: 5U/µL) (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), 28,7µL de H₂O ultra-pura e 5µL de DNA molde. Controles positivo, 5µL DNA (2ng/µL) de porco, e negativo, a mesma mistura da reação sem DNA, foram utilizados para o monitoramento das etapas de extração de DNA e mistura dos reagentes. A PCR foi realizada no aparelho Axygen® MaxyGene™ (Biocristal) de acordo com o seguinte perfil térmico: *Hot Start* (5 min, 94°C), seguido por 30 ciclos de desnaturação (60s, 93°C), anelamento (60s, 50°C), extensão (60s, 72°C) e extensão final (5 min, 72°C). O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, onde também se utilizou marcador molecular de 100pb para determinar, de forma comparativa, o tamanho do fragmento. Em seguida, as bandas foram coradas em solução de brometo de etídio 0,04% por 10 minutos e visualizadas em transluminador com luz ultravioleta.

Após a PCR, as amostras de produto amplificado foram purificadas utilizando o kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare Life Science, Chicago, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para o sequenciamento das amostras, 6,5µL de produto de PCR purificado e 1µL dos iniciadores (L14841 e H15149) foram colocados em microtubos do tipo *Eppendorf* de 1,5 mL e levados para a Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA - PDTIS/FIOCRUZ (RPT01A), onde foi realizada a reação de sequenciamento (Otto et al 2008). As sequencias obtidas foram editadas com o auxílio dos programas *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.4.1* (Hall 2005) e *Mega7*, versão 7.0.26 (Kumar et al 2016). Após esta etapa, as sequencias foram comparadas com as sequencias depositadas na base de dados do GenBank usando a ferramenta Blast.

4.6. Caracterização molecular de *T. cruzi*

A massa de parasitos crescida no meio LIT foi lavada em PBS (1M, pH = 7,2 - 7,4), empregando o método de centrifugação: 2.500 rpm durante 15 min a 4°C. Após o terceiro procedimento, o pellet foi ressuspensão em 300µL de H₂O ultra-pura e armazenado a -20°C até o momento da extração de DNA. O DNA genômico foi extraído empregando o Kit de extração *Illustra Blood GenomicPrep Mini spin kit* (GE Healthcare Life Science, Chicago, USA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA eluído foi armazenado a -20°C para os posteriores ensaios de PCR. A

caracterização molecular dos isolados de *T. cruzi* em DTU foi realizada de acordo com o protocolo proposto por D'Ávila et al (2009), utilizando um ensaio de três etapas como apresentado por Martins et al (2015) (Figura 4.9): **(i)** PCR do gene mitocondrial referente a subunidade 2 da citocromo oxidase (COII), empregando os iniciadores Tcmit-10 (5'-CCATATATTGTTG-CATTATT-3') e Tcmit-21 (5'-TTGTAATAGGAGTCATGTTT-3') desenhados para amplificar um fragmento de 375pb do DNA do maxicírculo de *T. cruzi* (Freitas et al 2006). Em seguida foi realizada a análise do polimorfismo do gene COII, empregando a endonuclease de restrição Alu I na técnica *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Este marcador é capaz de distinguir as DTUs: haplótipo mitocondrial A (TcI) e haplótipo mitocondrial C (TcII) do haplótipo mitocondrial B (TcIII-VI); **(ii)** PCR do domínio divergente do gene 24S α do DNA ribossomal (24S α rDNA), usando os iniciadores D71 (5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3') e D72 (5'-TTTTCAGAATGGCCGAACAGT- 3') (Souto & Zingales 1993); **(iii)** PCR do espaçador intergênico dos genes minixon de *T. cruzi* (SL-IR) pelo uso de iniciadores TcIII (5'-CTCCCCAGTGTGGCCTGGG-3') e UTCC (5'-CGTACCAATATAGTACAGAACTG- 3') (Burgos et al 2007), visando a distinção de populações pertencentes a TcIII de TcI, TcII e cepas híbridas. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3,5%, onde também se utilizou marcador molecular de 50pb para determinar, de forma comparativa, o tamanho do fragmento. Em seguida, as bandas foram coradas em solução de brometo de etídio 0,04% por 10 minutos e visualizadas em transluminador com luz ultravioleta.

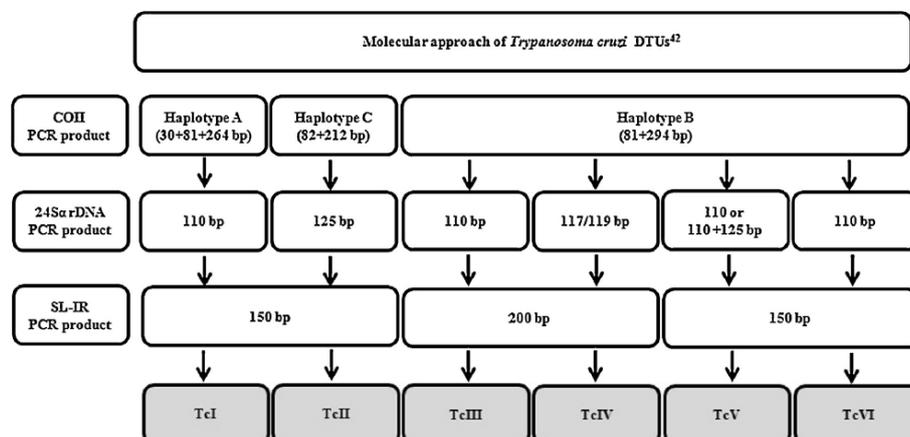


Figura 4.9. Protocolo para genotipagem proposto por D'Ávila et al (2009) usando um ensaio de três etapas: análise do polimorfismo do gene mitocondrial da subunidade citocromo oxidase 2 (COII), amplificação do domínio divergente D7 do gene 24S α rDNA e amplificação da região intergênica *spliced leader* (SL-IRac). Fonte: Martins et al (2015).

4.7. Análise das alterações morfológicas das asas de populações de *T. b. brasiliensis* de Caicó, RN.

4.7.1. Espécimes utilizados

Foram capturadas imagens de 731 asas anteriores (esquerda e direita), hemiélitro, de machos e fêmeas de *T. b. brasiliensis* coletados no ambiente silvestre e peridomiciliar de cinco localidades: Pedregulho, Inácio, SSBE, SRS e o BEC (Tabela 4.3). As asas, extirpadas previamente dos espécimes, tiveram parte do cório e do clavo, próximos da articulação com o tórax, removidos por meio de um corte transversal e montadas em álcool 70% entre lâminas e lamínulas para que ficassem planas, garantindo uma padronização e minimização de possíveis distorções (Figura 4.10 A-B). As asas foram fotografadas com o seu respectivo código de identificação e escala, utilizando câmera digital (Sony DSC-HX300) adaptada ao estereomicroscópio (Leica MZ 12.5) com objetiva de 0,8 (aumento de 8x). Asas deformadas (ausência de uma ou mais veias), rasgadas e que não apresentavam a mesma possibilidade de visualização dos PARs foram excluídas. Após essa seleção utilizou-se a asa direita para realização das análises das populações entre localidades e ambientes (peridomiciliar e silvestres) (Tabela 4.3). Para as comparações dos grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*, adicionamos as asas esquerdas na tentativa de minimizar o problema do tamanho da amostra. Assim, foram utilizadas tanto a asa direita quanto a asa esquerda para aumentar o n amostral de cada grupo, bem como o poder estatístico (Tabela 4.4).

Tabela 4.3. Número de asas (direita e esquerda) de *T. b. brasiliensis* fotografadas separadas por localidade, ambiente e sexo. Os números de asas direita selecionadas e usadas nas análises da MoG entre localidades e ambientes estão destacadas em cinza.

Localidade	Ambiente	Fêmea AD	Fêmea AE	F Total	Macho AD	Macho AE	M Total	FM Total
Pedregulho	Peridomicílio	23	22	45	26	23	49	94
	Silvestre	17	16	33	9	8	17	50
Inácio	Peridomicílio	42	40	82	34	34	68	150
	Silvestre	9	10	19	12	8	20	39
SRS	Peridomicílio	44	44	88	33	31	64	152
	Silvestre	22	20	42	17	14	31	73
BEC	Silvestre	21	22	43	26	26	52	95
SSBE	Peridomicílio	10	8	18	23	24	47	65
	Silvestre	4	4	8	2	3	5	13
Total		192	186	378	182	171	353	731

Abreviações: SRS. Sítio Riacho do Santo, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção de Caicó, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, AD. asa direita, AE. asa esquerda, F. fêmea, M. macho, FM. fêmea e macho.

Tabela 4.4. Número de asas (direita e esquerda) de *T. b. brasiliensis* usadas nas análises da MG entre grupos positivos e negativos, segundo a infecção natural por *T. cruzi*, empregando a PCR.

Localidade	Ambiente	Fêmea AD/AE Pos	Fêmea AD/AE Neg	F Total	Macho AD/AE Pos	Macho AD/AE Neg	M Total	FM Total
Pedregulho		8	11	19	10	14	24	43
Inácio	Peridomicílio	8	19	27	10	8	18	45
SRS		38	12	50	19	19	38	88
SSBE		4	6	10	12	12	24	34
BEC	Silvestre	24	5	29	27	16	43	72
Pedregulho		6	13	19				
Total		88	66	154	78	69	147	282

Abreviações: AD. asa direita, AE. asa esquerda, Pos. positivos e Neg. negativos para a infecção natural por *T. cruzi*, F. fêmea, M. macho, FM. fêmea e macho.

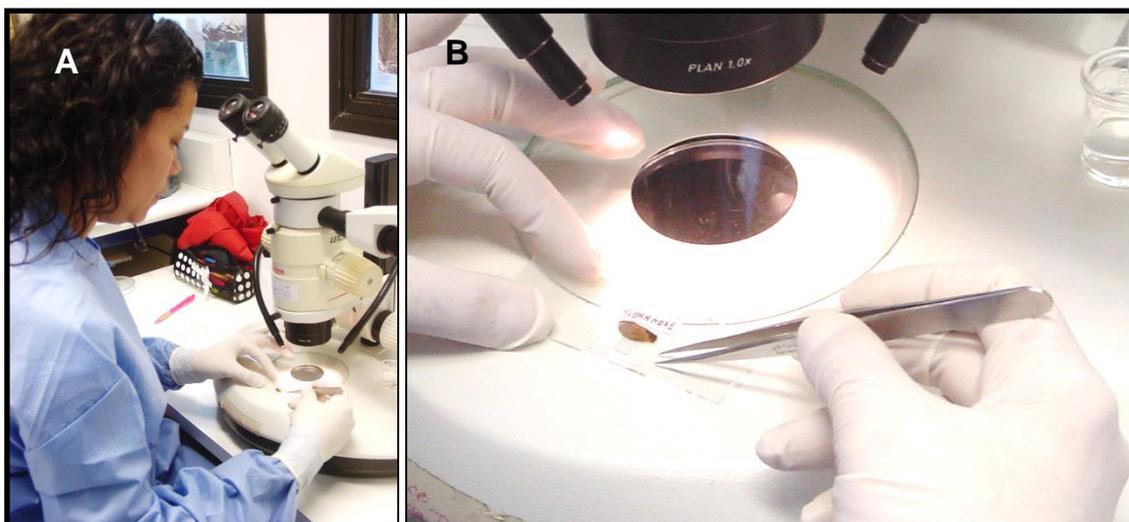


Figura 4.10. A-B. Montagem de uma asa esquerda de *T. b. brasiliensis* em álcool 70% entre lâmina e lamínula para ser fotografada. Fotos: acervo da autora.

4.7.2. Análises morfométricas e estatísticas

Foram escolhidos PARs do tipo I (localizados nas interseções das veias das asas), definidos a partir da metodologia sugerida por Bookstein (1991), para as análises das populações entre: i) localidades (8 PARs), ii) ambientes (8 PARs) e quanto a infecção natural por *T. cruzi* (10 PARs). A coleta dos PARs foi realizada nas fotos digitais de cada estrutura alar, seguindo o sentido horário da base para o ápice (Figura 4.11).

Utilizou-se o Tamanho Centróide (TC), um estimador de tamanho derivado das coordenadas dos PARs definido pela raiz quadrada da soma das distâncias elevadas ao quadrado entre o centro de massa e cada ponto (Rohlf e Slice 1990). Os valores de TC passaram por uma transformação logarítmica e foram usados para avaliar a variação do tamanho (Bookstein 1991). A avaliação comparativa do tamanho foi feita entre machos e fêmeas e entre os grupos, classificados de acordo com a localidade de origem, ambiente de coleta (silvestre e peridomiciliar), e infecção natural por *T. cruzi*. Os valores do TC foram obtidos a partir da matriz de coordenadas gerada com base nos PAR da estrutura alar dos espécimes. As variações no tamanho das asas entre os grupos foram medidas empregando a análise de variância de uma via (*one way ANOVA*). A comparação por pares foi feita por meio do teste t Student. Os resultados foram apresentados em diagramas de

caixa (*Box plot*), mostrando a mediana, a média e as medidas de dispersão (mínimo, máximo e os quartis).

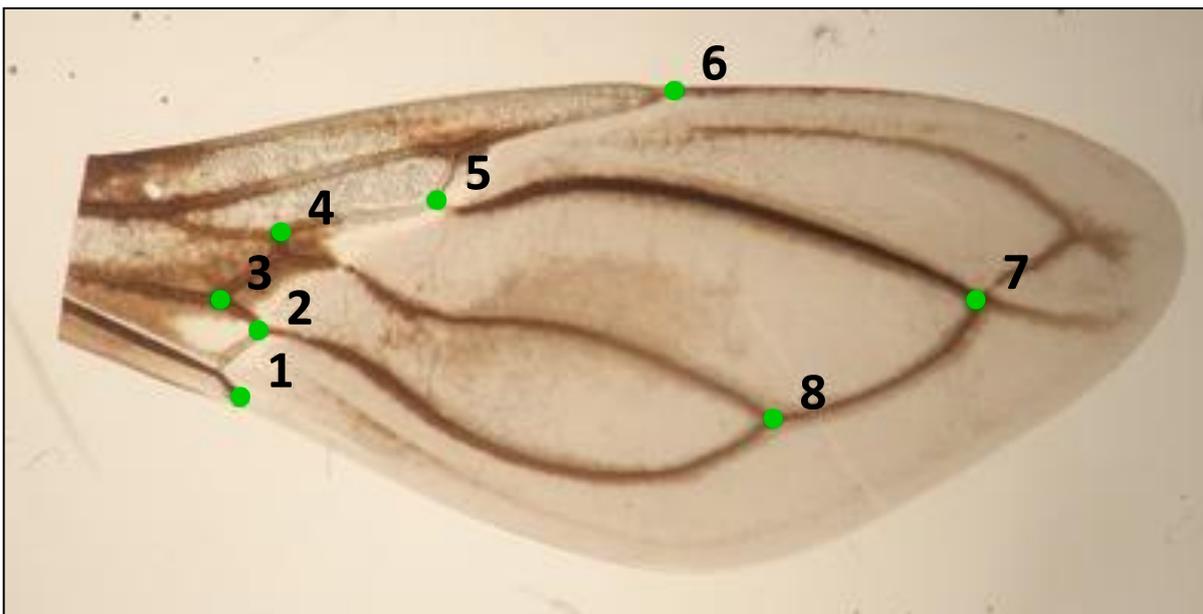


Figura 4.11. Asa direita de *T. b. brasiliensis* mostrando os oito Pontos Anatômicos de Referência (PAR) do tipo I: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 utilizados para as análises morfométricas. Fotos: acervo da autora.

A Análise Generalizada de Procrustes (AGP) foi usada para calcular as variáveis de conformação (Rohlf e Slice 1990). Neste método procederam-se as três etapas essenciais: (i) a eliminação do efeito de posição dos PARs pelo deslocamento do ponto médio de cada configuração (conjunto dos PARs) para a origem do plano cartesiano, superimposição; (ii) a eliminação do efeito de tamanho pela proporcionalização do Tamanho Centróide de cada configuração a uma medida única, eliminando o efeito de tamanho e posição, desta forma todos os valores tornaram-se equivalentes, proporcionalização e (iii) a eliminação do efeito de orientação pela rotação das imagens, possibilitando o ajuste dos PARs na menor distância possível, rotação.

As variáveis da conformação, em escala global, foram obtidas pelas projeções ortogonais (ORP) dos espécimes alinhados sob um espaço Euclidiano tangente à configuração consenso. Estas variáveis foram acessadas por meio da obtenção dos componentes uniformes (deformações globais) e as variáveis localizadas pela obtenção dos componentes não uniformes (deformações parciais) baseadas na deformação de cada estrutura em relação à configuração consenso. Posteriormente, esses dois conjuntos de variáveis foram combinados em uma matriz, nas quais foi

aplicado uma Análise de Componentes Principais (ACP), os componentes principais resultantes foram considerados como variáveis finais de conformação e utilizados para subseqüentes análises, tais como a Análise Discriminante (AnD). A utilização dos componentes principais como variáveis de conformação permite reduzir a dimensionalidade de maneira que, quando necessário, se adapta ao número de variáveis dos grupos de *T. b. brasiliensis* de menor tamanho amostral.

A AnD foi utilizada para estudar as diferenças das variáveis de conformação entre grupos definidos *a priori* (Monteiro e Reis 1999). Esta técnica de estatística multivariada proporciona a análise de grupos par a par, aumentando o poder de discriminação dos mesmos, além de verificar quais variáveis possuem maior relevância para discriminar os grupos. A sua significância estatística foi estimada empregando o método de reamostragem *bootstrapping* (1000 ciclos) (Zelditch et al 2004). A eficiência da análise discriminante na classificação dos grupos foi testada calculando-se a porcentagem dos indivíduos corretamente classificados (validação cruzada), com base nas variáveis de conformação, utilizando o método de Máxima Verossimilhança (*Maximum likelihood* – MLi) (Dujardin et al 2017). A distância de Mahalanobis (DM), métrica de similaridade, foi calculada com o objetivo de quantificar as distâncias entre os grupos através do agrupamento dos espécimes de acordo com a localidade de origem, o ambiente de coleta (silvestre, peridomiciliar) e a infecção por *T. cruzi*. Sua significância foi estimada empregando o teste de Lambda de Wilks.

As distribuições dos espécimes entre sexos e entre ambientes (silvestre, peridomiciliar) foram projetadas ao longo do fator discriminante 1 (FD1) e apresentadas em histogramas. As distribuições dos espécimes entre localidades e entre grupos positivos e negativos por *T. cruzi* (segundo resultados da PCR), no espaço de conformação definido pelos dois primeiros fatores discriminantes (FD1 e FD2) foram apresentadas em mapas fatoriais, mostrando polígonos convexos coloridos que agrupam todos os espécimes, representados por pontos coloridos, pertencente a um dado grupo. Foram produzidos também gráficos em árvore de similaridade morfológica aplicando a análise de agrupamento pelo método de ligação simples (*single linkage*) com base nas DM para testar a separação de grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*. O efeito da influência do tamanho na forma alar (alometria) foi verificado por meio de uma regressão linear dos fatores discriminantes (variável dependente) contra os valores de TC (variável

independente). Todas as análises foram realizadas no *software* XYOM (Dujardin e Dujardin 2019).

5. RESULTADOS

5.1. Captura de triatomíneos e fauna observada

Um total de 1.147 espécimes da subespécie *T. b. brasiliensis* e das espécies *T. pseudomaculata* e *T. petrocchiai* foi capturado, cuja distribuição por localidade está apresentada na tabela 5.1. *Triatoma b. brasiliensis* foi a subespécie mais abundante, representando 95,2% (1092/1147) dos triatomíneos capturados, seguida de *T. pseudomaculata* (4,6% - 53/1147) e de *T. petrocchiai* (0,2% - 2/1147). Padrões diferentes de distribuição, destes vetores, foram observados nos ambientes investigados, onde *T. b. brasiliensis* predominou em todos eles: intradomicílio (93,8% - 15/16), peridomicílio (93,5% - 772/825) e silvestre (modificado e conservado) (99,7% - 305/306), enquanto quantidades insignificantes de *T. petrocchiai* foram coletadas no intradomicílio (1/16) e no ambiente silvestre modificado (1/306) e poucos espécimes de *T. pseudomaculata* foram capturados apenas no peridomicílio (6,4% - 53/825), mostrando que *T. b. brasiliensis* foi o vetor que mais infestou os diferentes ambientes investigados (Tabela 5.2).

As buscas ativas nas 16 UDs, distribuídas em 15 localidades, mostraram que 18,7% (3/16) delas foram positivas no intradomicílio: Inácio (2 N4, 3 N5 e 3 Mc), Sítio Pelado (1 N5) e Batalhão da Polícia Ambiental (1 fêmea). No peridomicílio, 87,5% (14/16) foram positivas (Tabela 5.1). Em apenas uma localidade (Inácio), observou-se a presença de triatomíneos no intra e peridomicílio. Em 7 localidades foram investigados afloramentos rochosos no ambiente silvestre modificado e em apenas uma localidade (BEC) exploramos o ambiente silvestre conservado. Todos os ambientes silvestres foram positivos para a presença de triatomíneos (Tabela 5.1), o ambiente silvestre das demais localidades não foi pesquisado. Seis espécimes capturados por moradores foram incluídos no cálculo da infestação. Segundo os moradores, esses triatomíneos foram capturados no intradomicílio: Barra Nova (1 Mc), São José do Seridó (1 F), Pedregulho (3 F), Serrote Branco (1 F) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Número de triatomíneos por espécie, ambiente e fase de desenvolvimento coletados em 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte em novembro de 2016.

Município	Localidade	Espécie	Ambiente	Fase de desenvolvimento							Total	
				N1	N2	N3	N4	N5	Mc	F		
	Barra Nova (Mo)	<i>T. b. brasiliensis</i>	Intradomicílio							1		1
	Barra do Lagedo	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio	4	8	28	27	2		1	3	73
	Batalhão de Polícia Ambiental	<i>T. b. brasiliensis</i>	Intradomicílio								1	1
	Batalhão de Engenharia de Construção	<i>T. b. brasiliensis</i>	Silvestre Conservado	1	7	9	23	31		29	27	127
	Fazenda Fortuna	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio			1		2				3
	Sítio Inácio	<i>T. b. brasiliensis</i>	Intradomicílio				2	3		2		7
	Sítio Inácio	<i>T. petrochiae</i>	Intradomicílio							1		1
Caicó	Sítio Inácio	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio		2	32	30	57		33	22	176
	Sítio Inácio	<i>T. b. brasiliensis</i>	Silvestre Modificado			4	1	6		10	7	28
	Sítio Inácio	<i>T. petrochiae</i>	Silvestre Modificado							1		1
	Montanhas	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio				1					1
	Nova Descoberta	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio	2	1		1					4
	Nova Descoberta	<i>T. pseudomaculata</i>	Peridomicílio								1	1
	Nova Descoberta	<i>T. b. brasiliensis</i>	Silvestre Modificado	1	1			1				3
	Pedra do Sino	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio		5	3	2	6		1	3	20
	Pedra do Sino	<i>T. b. brasiliensis</i>	Silvestre Modificado		1							1
	Pedregulho (Mo)	<i>T. b. brasiliensis</i>	Intradomicílio								3	3

Abreviações: Mo. Triatomíneo capturado pelo morador, N1. ninfa de primeiro estágio, N2. ninfa de segundo estágio, N3. ninfa de terceiro estágio, N4. ninfa de quarto estágio, N5. ninfa de quinto estágio, Mc. macho, F. fêmea.

(...continuação)

Tabela 5.1. Número de triatomíneos por espécie, ambiente e fase de desenvolvimento coletados em 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte em novembro de 2016.

Município	Localidade	Espécie	Ambiente	Fase de desenvolvimento						Total	
				N1	N2	N3	N4	N5	Mc		F
Caicó	Pedregulho	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio	2	22	46	42	22	15	14	163
	Pedregulho	<i>T. b. brasiliensis</i>	Silvestre Modificado		1	5		11	8	14	39
	Sítio Riacho do Santo	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio		3	14	63	98	29	44	251
	Sítio Riacho do Santo	<i>T. b. brasiliensis</i>	Silvestre Modificado			3	10	15	14	16	58
	São José do Seridó (Mo)	<i>T. b. brasiliensis</i>	Intradomicílio							1	1
	Serraria	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio	1							1
	Serraria	<i>T. b. brasiliensis</i>	Silvestre Modificado	6	3	1	1	1			12
	Serrote Branco (Mo)	<i>T. b. brasiliensis</i>	Intradomicílio							1	1
	Serrote Branco	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio							1	1
	Sítio São Bernardo de Elias	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio	2	3	5	13	15	17	8	63
Sítio São Bernardo de Elias	<i>T. b. brasiliensis</i>	Silvestre Modificado	4	2	18	4	3	3	3	37	
São Fernando	Sítio Pelado	<i>T. b. brasiliensis</i>	Intradomicílio					1			1
	Sítio Marcação	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio		2	2	3	4			11
	Sítio Marcação	<i>T. pseudomaculata</i>	Peridomicílio		3	10	10	19	2	1	45
	Sítio Serrote	<i>T. b. brasiliensis</i>	Peridomicílio		1	1	1	2			5
	Sítio Serrote	<i>T. pseudomaculata</i>	Peridomicílio				2	3	2		7
Total				23	65	182	236	302	169	170	1147

Abreviações: (Mo). Triatomíneo capturado pelo morador, N1. ninfa de primeiro estágio, N2. ninfa de segundo estágio, N3. ninfa de terceiro estágio, N4. ninfa de quarto estágio, N5. ninfa de quinto estágio, Mc. macho, F. fêmea.

Tabela 5.2. Número de triatomíneos por espécie, ambiente, fase de desenvolvimento e proporção de ninfas e adultos capturados em 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte.

Ambiente	Espécie	Fase de desenvolvimento							N (n)	Ad (n)	Total	N (%)	Ad (%)
		N1	N2	N3	N4	N5	Mc	F					
Intradomicílio	<i>T. b. brasiliensis</i>	0	0	0	2	4	3	6	6	9	15	37,5	62,5
	<i>T. pseudomaculata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>T. petrochiae</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	6,25
	Total	0	0	0	2	4	4	6	6	10	16	37,5	62,5
Peridomicílio	<i>T. b. brasiliensis</i>	11	47	132	183	208	96	95	581	191	772	75,3	24,7
	<i>T. pseudomaculata</i>		3	10	12	22	4	2	47	6	53	88,7	11,3
	<i>T. petrochiae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	11	50	142	195	230	100	97	628	197	825	76,1	23,9
Silvestre modificado	<i>T. b. brasiliensis</i>	11	8	31	16	37	35	40	103	75	178	57,9	42,1
	<i>T. pseudomaculata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>T. petrochiae</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	100
Silvestre conservado	<i>T. b. brasiliensis</i>	1	7	9	23	31	29	27	71	56	127	55,9	44,1
	Total	12	15	40	39	68	65	67	174	132	306	56,9	43,1
Total		23	65	182	236	302	169	170	808	339	1147	70,4	29,6

Abreviações: N1. ninfa de primeiro estágio, N2. ninfa de segundo estágio, N3. ninfa de terceiro estágio, N4. ninfa de quarto estágio, N5. ninfa de quinto estágio, Mc. macho, F. fêmea, N (n). número total de ninfas, Ad (n). número total de adultos, N (%). percentual de ninfas, Ad (%). percentual de adultos, *T. Triatoma, b. brasiliensis*.

Nesta expedição, realizada no período seco na região (novembro 2016), observou-se maior concentração dos estádios ninfais (70,4% - 808/1147) em relação aos adultos (29,6% - 339/1147) (Tabela 5.2). Entre as formas imaturas, as ninfas de quinto estágio (N5) exibiram a maior porcentagem de espécimes (26,3%), seguida das ninfas de quarto (N4) (20,6%) e terceiro (N3) (15,9%) estádios. Os adultos apresentaram o maior percentual (29,6%) quando comparados com cada estágio ninfal (Figura 5.1). Machos (Mc) e Fêmeas (F) foram coletados, tecnicamente, na mesma proporção: 14,7% e 14,8%, respectivamente. A razão de machos e fêmeas ($R = Mc/F$) apresentou pequena variação entre os ecótopos: intradomiciliar ($R_{M/F} = 0,6$), peridomiciliar ($R_{M/F} = 1,0$) e silvestre ($R_{M/F} = 0,9$). O percentual de ninfas (N) de *T. b. brasiliensis* foi maior do que o de adultos (Ad) no peridomicílio (N = 75,3%, Ad = 24,7%), no ambiente silvestre (N = 57,0%, Ad = 43%) e menor no interior das casas (N = 37,5%, Ad = 62,5%), evidenciando a colonização intensa por este vetor no peridomicílio e colonização e invasões no intradomicílio.

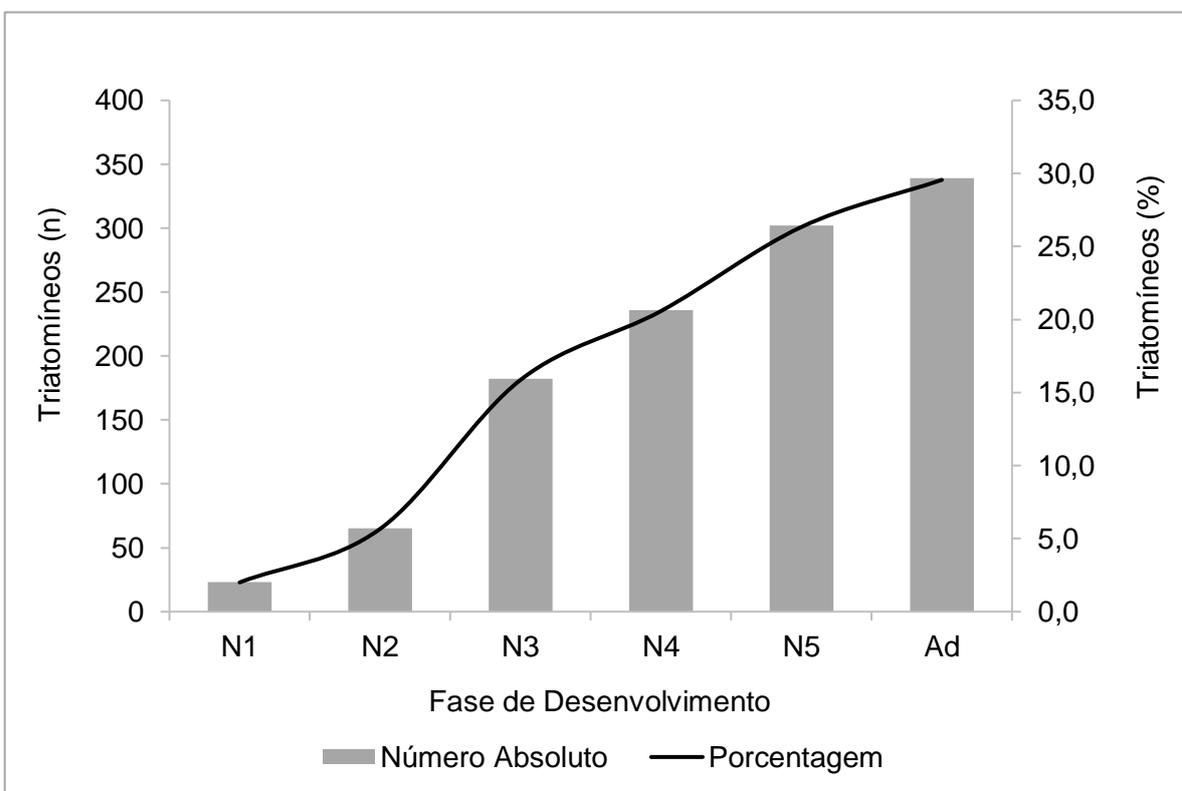


Figura 5.1. Distribuição dos triatomíneos, de acordo com as fases de desenvolvimento, coletados em 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte. N1. ninfas de 1º estágio, N2. ninfas de 2º estágio, N3. ninfas de 3º estágio, N4. ninfas de 4º estágio, N5. ninfas de 5º estágio, Ad. adultos.

As formas imaturas de *T. b. brasiliensis* dominaram, em termos de número absoluto, sobre as demais espécies em quase todos os ambientes pesquisados, exceto no peridomicílio, onde *T. pseudomaculata* mostrou maior proporção de ninfas (N = 88,7%, Ad = 11,3) (Tabela 5.2).

Considerando todos os ecótopos, onde se capturou os triatomíneos, o curral de boi (peridomicílio) foi o mais infestado, representando 52,3% (600/1147), seguido do afloramento rochoso (silvestre) 26,6% (305/1147), pilha de telhas (peridomicílio) 8,8% (101/1147) e galinheiro (peridomicílio) 8,2% (94/1147) do total de triatomíneos coletados (Tabela 5.3 e Figura 5.2).

Tabela 5.3. Número de triatomíneos coletados por ambiente e ecótopo provenientes de 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte.

Ambiente	Ecótopo	Espécie	Total
Intradomicílio	NI	<i>T. b. brasiliensis</i>	1
Intradomicílio	depósito	<i>T. b. brasiliensis</i>	1
Intradomicílio	sala	<i>T. petrochiae</i>	1
Intradomicílio	sala	<i>T. b. brasiliensis</i>	7
Intradomicílio	banheiro	<i>T. b. brasiliensis</i>	4
Intradomicílio	NI	<i>T. b. brasiliensis</i>	1
Intradomicílio	quarto	<i>T. b. brasiliensis</i>	1
Peridomicílio	varanda	<i>T. b. brasiliensis</i>	6
Peridomicílio	afloramento rochoso	<i>T. b. brasiliensis</i>	4
Peridomicílio	cerca de madeira	<i>T. b. brasiliensis</i>	1
Peridomicílio	cerca de madeira	<i>T. pseudomaculata</i>	7
Peridomicílio	curral de boi	<i>T. b. brasiliensis</i>	600
Peridomicílio	curral de cabras	<i>T. b. brasiliensis</i>	3
Peridomicílio	galinheiro	<i>T. pseudomaculata</i>	46
Peridomicílio	galinheiro	<i>T. b. brasiliensis</i>	48
Peridomicílio	muro de concreto	<i>T. b. brasiliensis</i>	4
Peridomicílio	pilha de telhas	<i>T. b. brasiliensis</i>	101
Peridomicílio	serrote	<i>T. b. brasiliensis</i>	5
Silvestre	serrote	<i>T. b. brasiliensis</i>	1
Silvestre	afloramento rochoso	<i>T. b. brasiliensis</i>	304
Silvestre	afloramento rochoso	<i>T. petrochiae</i>	1
Total			1147

Abreviações: NI. Não Informado

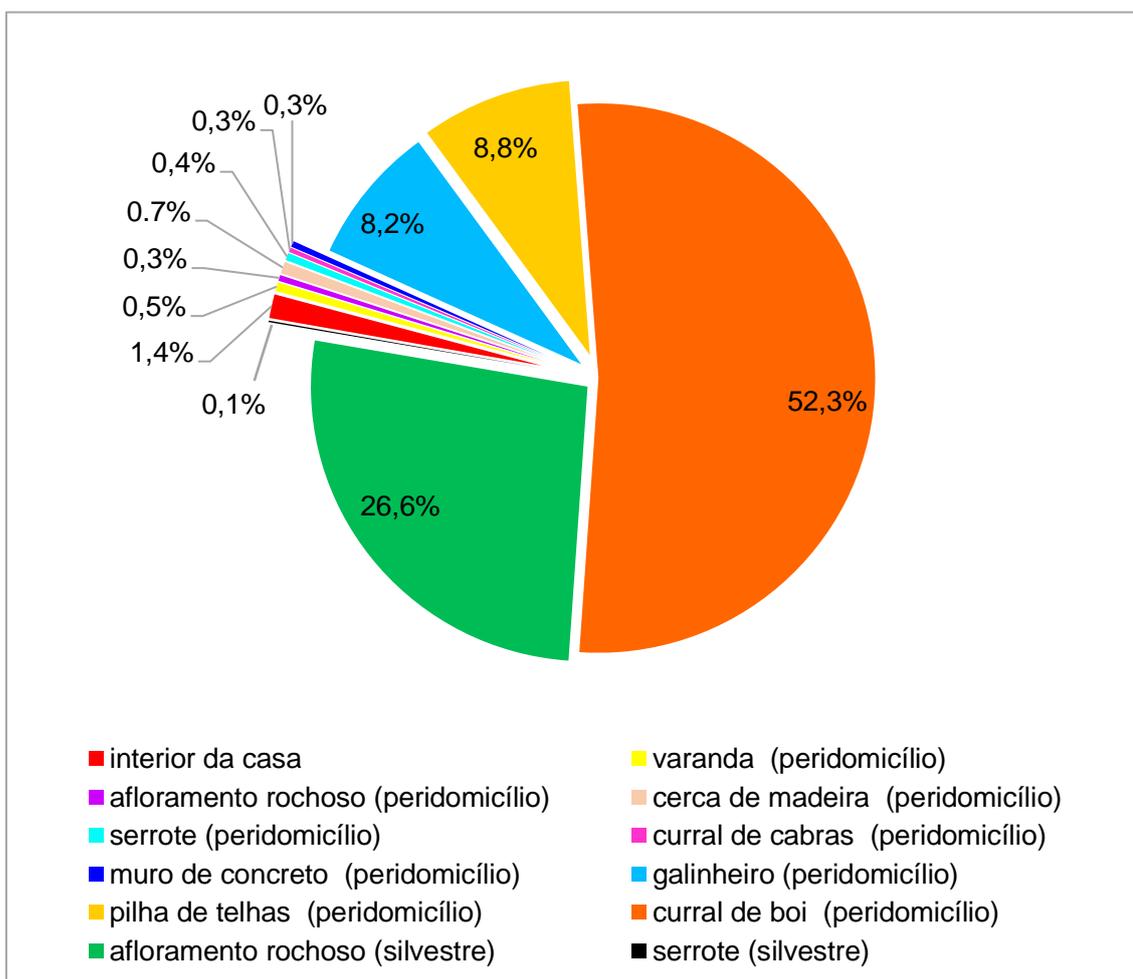


Figura 5.2. Distribuição dos triatomíneos coletados nos ecótopos naturais e artificiais de 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte.

Triatoma b. brasiliensis foi a subespécie de triatomíneo que predominou no intradomicílio, peridomicílio e no ambiente silvestre, colonizando ecótopos naturais e artificiais conforme demonstrado de forma detalhada na Figura 5.3. No peridomicílio, o galinheiro e a cerca de madeira foram os ecótopos onde se observou a presença tanto de *T. b. brasiliensis* (galinheiro: 51,1% - 48/94) (cerca de madeira: 12,5% - 1/8) quanto de *T. pseudomaculata* (galinheiro: 48,9% - 46/94) (cerca de madeira: 87,5% - 7/8). Em um dos galinheiros investigados, no Sítio Marcação, município de São Fernando, colônias de *T. b. brasiliensis* (n =11) e *T. pseudomaculata* (n= 44) coabitavam. Nos afloramentos rochosos, no ambiente silvestre, foram coletados *T. b. brasiliensis* (99,7% - 305/306) e *T. petrocchiaie* (0,3% - 1/306), esta última espécie foi capturada na mesma rocha em que se coletaram espécimes de *T. b. brasiliensis* (n = 28), na localidade Inácio, em Caicó. Na localidade mencionada foram capturados *T.*

b. brasiliensis (87,5% - 7/8) e *T. petrocchiai* (12,5% - 1/8) na sala da mesma casa que estava desabitada.

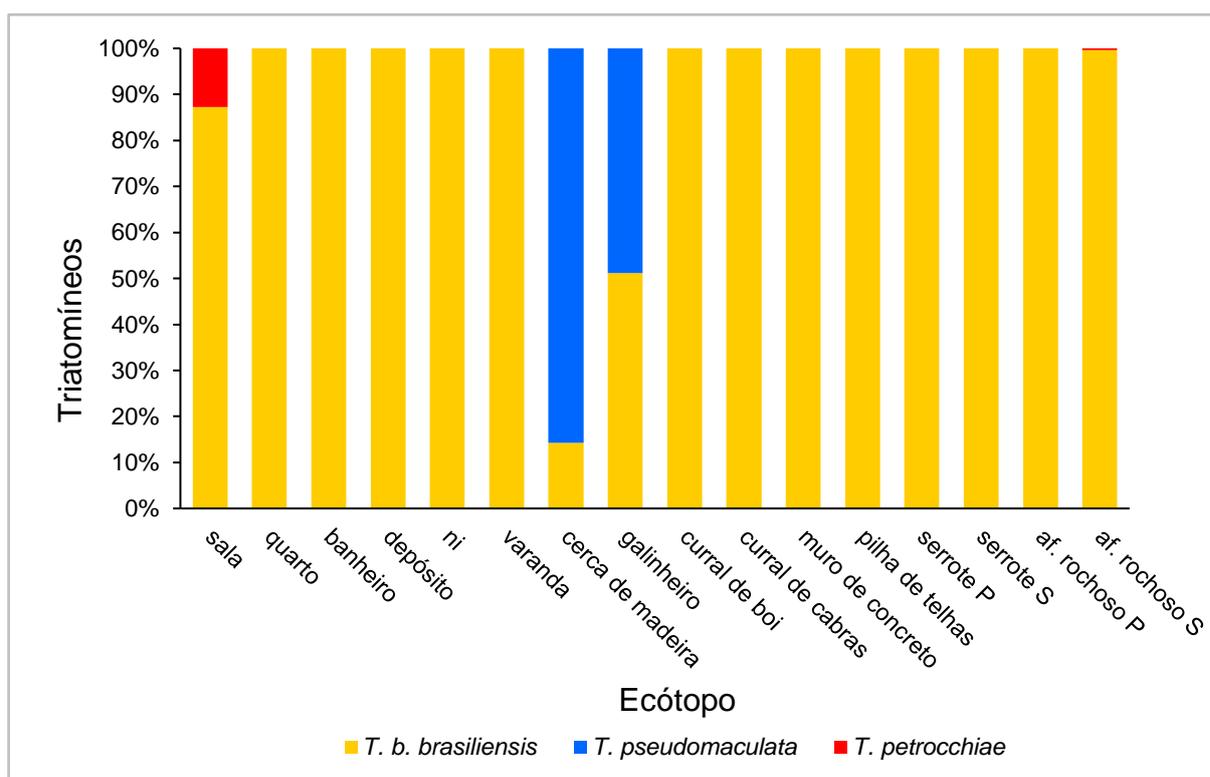


Figura 5.3. Distribuição das espécies de triatomíneos coletadas nos ecótipos naturais e artificiais de 18 localidades dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte. Abreviações: ni. não informado, af. rochoso P. afloramento rochoso peridomicílio, serrote P. cerca de pedras peridomicílio, serrote S. cerca de pedras silvestre, af. rochoso, S. afloramento rochoso silvestre.

Ao longo de dez dias, durante a execução das capturas ativas e passivas, observou-se uma variedade de animais, vertebrados e invertebrados, nos ecótipos pesquisados (ou em suas proximidades) onde os triatomíneos estabeleceram colônias. Os animais presentes nestes ambientes pertenciam a diferentes classes dos filos Chordata (Mammalia, Ave, Reptilia e Amphibia) e Arthropoda (Arachnida). É importante ressaltar que os artrópodes anteriormente mencionados se tratava de carrapatos ingurgitados (classe Arachnida) encontrados coabitando com *T. b. brasiliensis* em um serrote (cerca de pedras), onde galinhas dormiam à noite. A lista dos animais, em alguns casos os seus vestígios (fezes, urina e pistas do seu comportamento de forrageamento), observados no intradomicílio, peridomicílio e ambiente silvestre das localidades rurais de Caicó e São Fernando pode ser verificada na tabela 5.4 e nas figuras 5.4, 5.5 e 5.6.

Tabela 5.4. Fauna de vertebrados e invertebrados observada durante as capturas de triatomíneos em diferentes ecótopos dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte.

Filo	Fauna Observada		Intradomicílio	Peridomicílio	Silvestre	
	Classe	Nome popular	local	local/anexo	local	
Chordata	Mammalia	Mocó	-	-	rochas*	
		Roedor	sala	-	-	
		Gato do mato	-	-	arbustos	
		Gato doméstico	quarto	-	-	
		Tatu	-	-	buraco no chão	
		Morcego	cozinha	-	-	
		Boi	-	curral	-	
		Cavalo	-	curral	-	
		Carneiro	-	curral	-	
		Cabra	-	curral	-	
		Cachorro	cozinha	quintal	-	
		Coelho	-	quintal	-	
		Galinha	-	serrote	-	
		Galinha da Angola	-	galinheiro	-	
		Pavão	-	galinheiro	-	
	Aves	Peru	-	galinheiro	-	
		Ganço	-	quintal	-	
		Pato	-	quintal	-	
		Reptilia	Cobra	-	quintal	-
			Lagarto	-	serrote	-
	Amphibia	Sapo	quarto	-	-	
	Arthropoda	Arachnida	Carrapato	-	serrote	-



Figura 5.4. Fauna de vertebrados observada durante as capturas de triatomíneos no intradomicílio das UDs da área rural dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte. **A.** Cadela alimentando os seus filhotes na despensa, **B.** galinha chocando ovos no quarto, **C.** morcego no chão, **D.** roedor escalando a parede de uma casa desabitada a uma distância de ~20m da casa habitada, **E.** sapo atrás do guarda roupa, **F.** gato transitando no quarto. Fotos: acervo da autora.

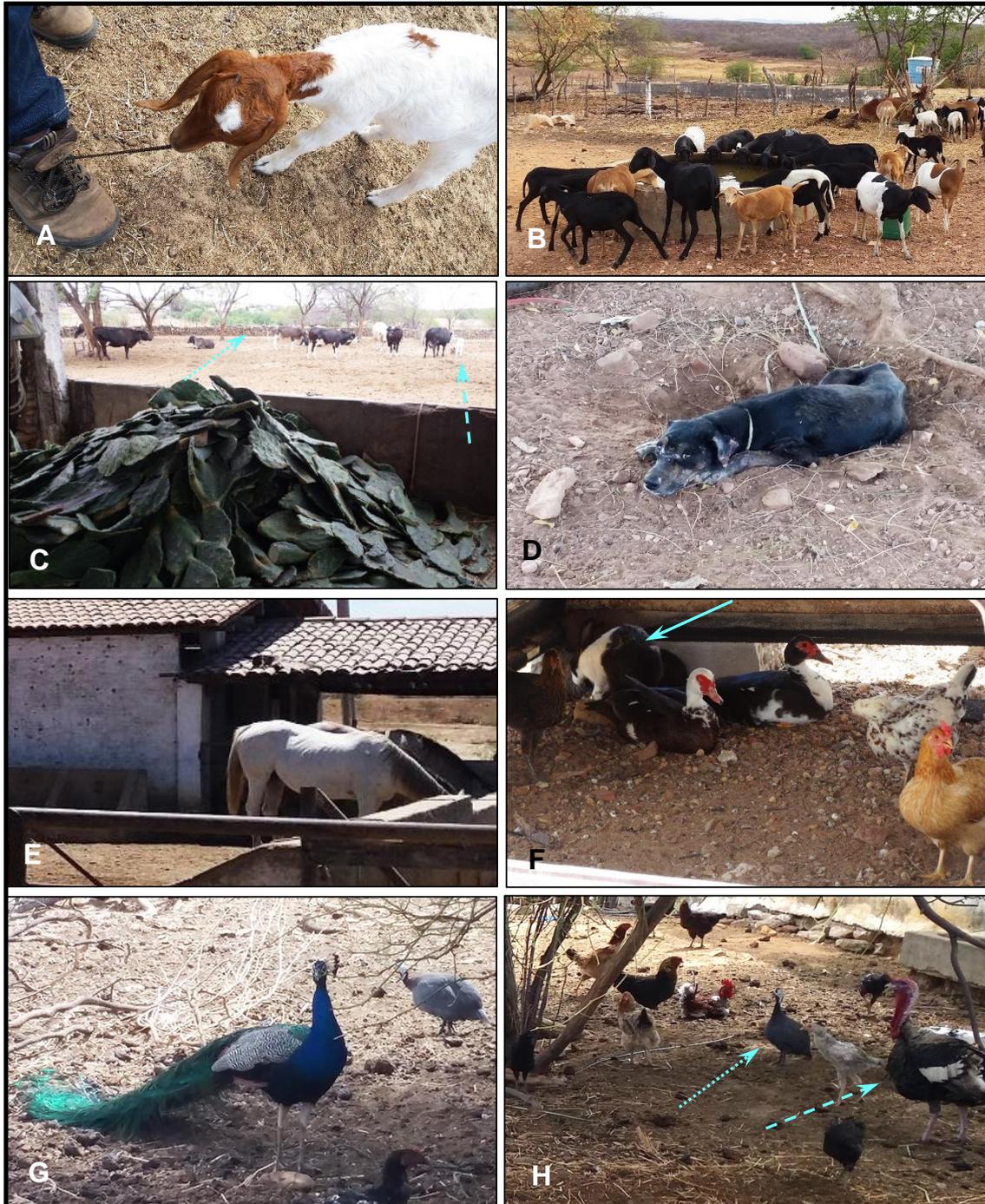


Figura 5.5. Fauna de vertebrados observada durante as capturas de triatomíneos no peridomicílio das UD's da área rural dos municípios de Caicó e São Fernando, Rio Grande do Norte. **A.** cabra dentro do curral, **B.** carneiros no quintal bebendo água, **C.** vacas e bezerros dentro do curral: bezerro (seta tracejada), cerca de pedras ao redor do curral (seta pontilhada), cacto *Opuntia cochenillifera* (palma) usado para alimentar bovinos, **D.** cachorro doente amarrado em uma árvore, **E.** cavalos alimentando-se no interior de um estábulo, **F.** coelho (seta azul clara), galinhas e patos em um abrigo, **G.** Pavão dentro do galinheiro, **H.** galinha da angola (seta pontilhada) e peru (seta tracejada) dentro do galinheiro. Fotos: acervo da autora.

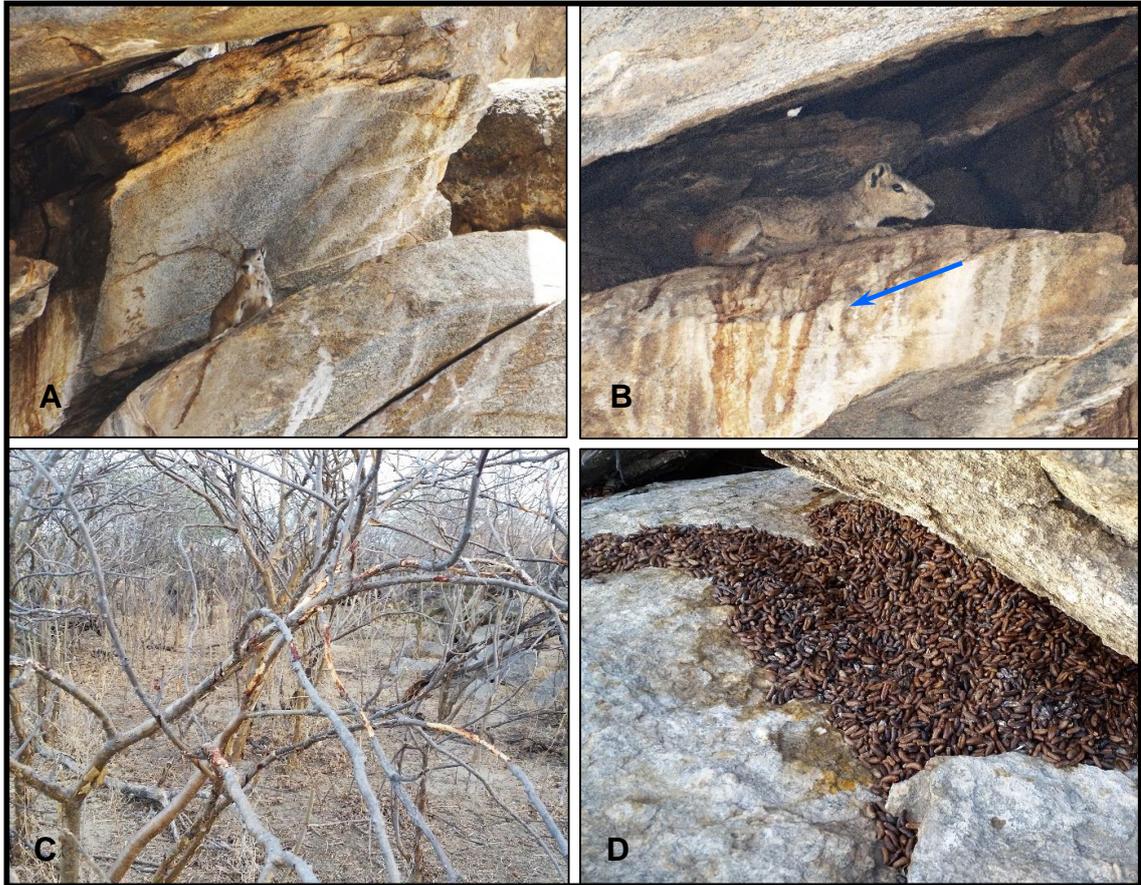


Figura 5.6. Roedor mocó (*K. rupestris*) observado durante as capturas de triatomíneos no ambiente silvestre modificado a uma distância de 20 a 300 m das UDs da área rural dos municípios de Caicó, Rio Grande do Norte. **A-B.** mocós em um afloramento rochoso com vestígios de urina (seta azul), **C.** árvores do entorno dos afloramentos rochosos com galhos parcialmente roídos supostamente pelo mocó, **D.** acúmulo de fezes e vestígios de urina nos sulcos das rochas do afloramento rochoso habitado pelos mocós. Fotos: acervo da autora.

5.2. Infecção Natural por *T. cruzi*

5.2.1. Microscopia óptica (MO)

O exame parasitológico direto das fezes para detecção de *T. cruzi-like* foi realizado apenas em insetos vivos ou recém-mortos (encontrados com o corpo flexível). A pesquisa de flagelados foi feita em uma amostra (selecionada aleatoriamente) dos espécimes coletados nas localidades: Pedregulho, Inácio, SSBE, SRS e BEC. Um total de 286 espécimes de *T. b. brasiliensis* foi examinado e 103 estavam positivos para a presença de *T. cruzi-like*, o que resultou em uma taxa de infecção natural (IN) de 36,0%. Todas as localidades apresentaram insetos infectados com *T. cruzi-like*, sendo detectados os maiores percentuais de barbeiros infectados em SRS (58,5%) e no BEC (54,1%). Verificou-se também que os maiores índices de IN foram encontrados no peridomicílio (P) em relação ao ambiente silvestre modificado das localidades: SRS (P= 59,3%, SM= 56,5%), SSBE (P= 26,9%, SM= 0,0%) e Pedregulho (P= 13,6%, SM= 10,0%). A tabela 5.5 apresenta o número de espécimes coletados, examinados, infectados e o valor percentual de espécimes infectados.

Tabela 5.5. Índice de infecção natural, empregando a microscopia óptica, de *T. b. brasiliensis* coletado em diferentes ambientes de 5 localidades do município de Caicó, Rio Grande do Norte.

Localidade	Ambiente	Col.	Positivo/Examinado					IN (%)	IN (%) Total
			N4	N5	Macho	Fêmea	Total		
Pedregulho	Silvestre	39	0/0	1/4	0/4	1/12	2/20	10,0	12,5
	Peridomicílio	163	0/6	2/18	2/10	2/10	6/44	13,6	
SSBE	Silvestre	37	0/2	0/1	0/3	0/3	0/9	0,0	20,0
	Peridomicílio	63	0/2	2/7	4/11	1/6	7/26	26,9	
Inácio	Silvestre	29	1/1	3/5	5/9	3/5	12/20	60,0	29,4
	Peridomicílio	176	0/10	3/22	4/10	1/6	8/48	16,7	
BEC	Silvestre	127	0/1	6/8	9/18	5/10	20/37	54,1	54,1
SRS	Silvestre	58	0/1	2/6	7/8	4/8	13/23	56,5	58,5
	Peridomicílio	251	1/6	14/25	7/7	13/21	35/59	59,3	
Total		943					103/286		36,0

Abreviações: SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção, SRS. Sítio Riacho do Santo, Col. Espécimes coletados, N4. ninfa de quarto estágio, N5. ninfa de quinto estágio, IN. infecção natural.

A figura 5.7 apresenta o número de barbeiros examinados, os positivos e o índice de IN por *T. cruzi*, através da MO, distribuídos em diferentes ecótopos. Os resultados mostraram que, no peridomicílio, o ecótopo com maior percentual de IN foi o curral de boi (17,8% - 51/156) aproximando-se da taxa observada para o afloramento rochoso, no ambiente silvestre (16,4% - 47/109).

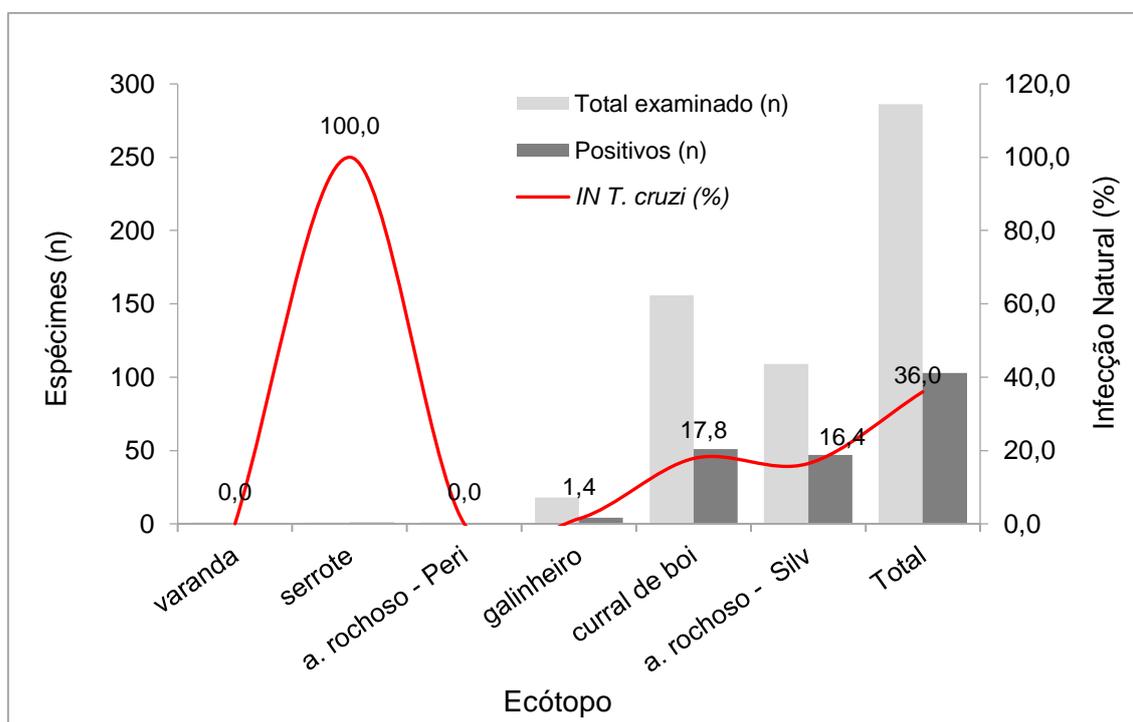


Figura 5.7. Índice de infecção natural de *T. b. brasiliensis*, avaliados pela MO (n= 286), coletados em diferentes ecótopos do peridomicílio e do ambiente silvestre das localidades: Pedregulho, Inácio, SSBE (Sítio São Bernardo de Elias), SRS (Sítio Riacho do Santo) e BEC (Batalhão de Engenharia de Construção) do município de Caicó, Rio Grande do Norte. Serrote. cerca de pedras, P. peridomicílio, Silv. silvestre.

5.2.2. Meio de Cultura (MC)

Com o objetivo de isolar o parasito para posterior caracterização genética, alíquotas (500µL) do extrato intestinal de *T. b. brasiliensis* foram semeados em tubos de ensaio contendo LIT/NNN. Das 129 amostras semeadas, 27 apresentaram contaminação por fungos e bactérias. Entre as 102 culturas que não contaminaram, observou-se o crescimento do parasito em 52 (51% - 52/102). Considerando-se os resultados obtidos neste método, as localidades BEC (80% - 8/10), SRS (70,9% - 22/31) e Inácio (58% - 18/31) foram as que apresentaram as maiores taxas de IN por *T. cruzi* concordando com os resultados da MO (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Índice de infecção natural, por meio do semeio de amostras de conteúdo intestinal em meio de cultura, de *T. b. brasiliensis* coletados em diferentes ambientes das localidades do município de Caicó, Rio Grande do Norte.

Localidade	Ambiente	Col.	Positivo/Examinado					IN (%)	IN (%) Total
			N4	N5	Macho	Fêmea	Total		
Pedregulho	Silvestre	39	0/0	0/2	0/2	1/6	1/10	10,0	15,0
	Peridomicílio	163	0/1	1/7	1/2	0/0	2/10	20,0	
SSBE	Silvestre	37	0/0	0/0	0/3	0/0	0/3	0,0	11,1
	Peridomicílio	63	0/0	1/4	0/1	0/1	1/6	16,6	
Inácio	Silvestre	29	0/0	2/3	7/7	6/6	15/16	93,7	58,0
	Peridomicílio	176	0/1	3/13	0/1	0/0	3/15	20,0	
BEC	Silvestre	127	0/0	5/6	2/3	1/1	8/10	80,0	80,0
SRS	Silvestre	58	0/0	1/3	3/3	3/5	10/14	71,4	70,9
	Peridomicílio	251	0/1	7/11	3/3	2/2	12/17	70,6	
Total		943					52/102		51,0

Abreviações: SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção, SRS. Sítio Riacho do Santo, Col. Espécimes coletados, N4. ninfa de quarto estádio, N5. ninfa de quinto estádio, IN. Infecção Natural.

É importante ressaltar que algumas amostras avaliadas pela MO com resultado negativo foram positivas quando semeadas no MC, reforçando o valor confirmatório deste método. Dos 100 espécimes avaliados pelas duas técnicas (mesmos espécimes), a MO detectou 43% (43/100) de positivos, enquanto o MC detectou 51% (51/100).

5.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR convencional multiplex foi empregada como alternativa para a detecção de infecção em insetos que se encontravam mortos no momento da dissecação (impossibilitando o exame parasitológico *in vivo*) e de possíveis espécimes falso-negativos avaliados pela MO. Deste modo, utilizamos os iniciadores 121 e 122 para amplificar regiões hipervariáveis dos minicírculos do kDNA para a identificação de *T. cruzi*. Dos 280 espécimes examinados, o fragmento amplificado correspondente a 330pb foi detectado em 165 amostras, resultando em um índice de IN de 58,9%. Algumas amostras apresentaram, além do fragmento de 330pb, um fragmento de 760pb, sugerindo infecção mista por *T. rangeli* (Figura 5.8). Análises moleculares adicionais estão em andamento para confirmação da infecção por essa outra espécie de protozoário. Todas as amostras consideradas neste estudo

apresentaram o fragmento de 163pb referente à região 12S do RNA ribossomal do triatomíneo. Todas as localidades apresentaram taxas de IN superiores às taxas calculadas com base na MO. Os maiores índices de IN foram registrados nas localidades SRS (72,5% - 66/91), BEC (70,2% - 33/47) e Inácio (61,0% - 36/59). Em relação ao ambiente, taxas mais altas de barbeiros infectados foram detectadas no ambiente silvestre (SM e SC) comparadas às do peridomicílio das localidades Inácio (SM= 100,0%, P= 51,1%), SRS (SM= 79,2%, P= 68,9%) e BEC (SC= 70,2%), enquanto em SSBE observou-se o inverso (P= 36,0%, SM= 28,6%) (Tabela 5.7).

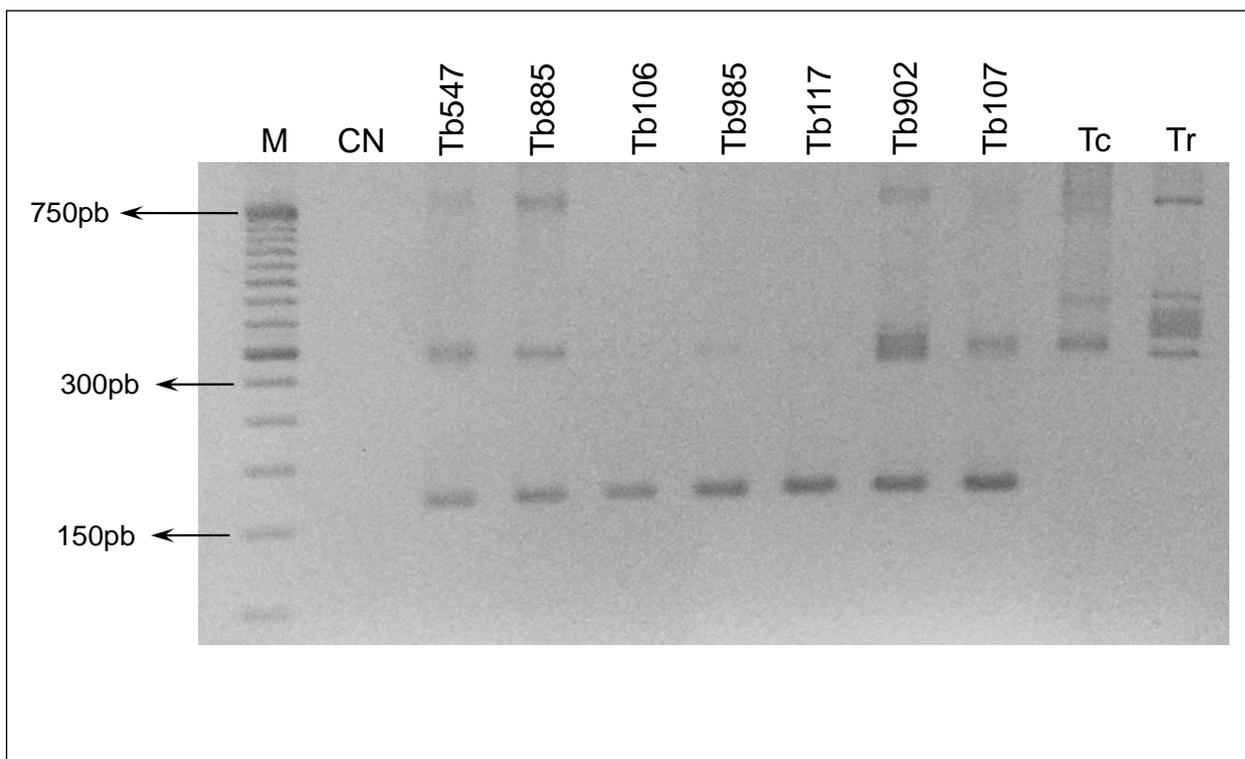


Figura 5.8. Análise, via PCR, da região hipervariável dos minicírculos do kDNA para identificação molecular de *T. cruzi*. Canaleta 1. CN controle negativo (reagentes da PCR sem DNA); canaletas 2. Tb547, 3. Tb885, 5. Tb985, 6. Tb117, e 8. Tb630 espécimes infectados por *T. cruzi* (330pb); canaletas 2. Tb547, 3. Tb885 e 7. Tb902 espécimes com possibilidade de infecção por *T. rangeli* (760pb), 4. Tb106 espécime não infectado canaleta 9. Tc controle positivo de *T. cruzi* (DNA extraído, Cepa CL Brenner); canaleta 10: Controle positivo de *T. rangeli* (DNA extraído, Cepa Macias). M. Marcador Molecular 50pb. Gel de agarose 3,5% corado com brometo de etídio.

Tabela 5.7. Índice de infecção natural, utilizando a PCR convencional multiplex, de *T. b. brasiliensis* coletados em diferentes ambientes das localidades dos municípios de Caicó, Rio Grande do Norte.

Localidade	Ambiente	Col.	Positivo/Examinado					IN (%)	IN (%) Total
			N4	N5	Macho	Fêmea	Total		
Pedregulho	Silvestre	39	0/0	1/3	2/3	3/11	6/17	35,3	36,0
	Peridomicílio	163	0/3	2/5	5/13	5/12	12/33	36,4	
SSBE	Silvestre	37	0/1	0/0	1/3	1/3	2/7	28,6	34,4
	Peridomicílio	63	0/2	2/8	4/8	3/7	9/25	36,0	
Inácio	Silvestre	29	0/0	4/4	5/5	3/3	12/12	100,0	61,0
	Peridomicílio	176	0/3	12/20	9/16	3/8	24/47	51,1	
BEC	Silvestre	127	0/0	8/9	13/22	12/16	33/47	70,2	70,2
SRS	Silvestre	58	0/0	4/5	10/12	5/7	19/24	79,2	72,5
	Peridomicílio	251	4/6	9/16	17/12	22/28	47/67	70,1	
Total		943					164/279		58,8

Abreviações: SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, SRS. Sítio Riacho do Santo, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção, Col. Espécimes coletados, N4. ninfa de quarto estágio, N5. ninfa de quinto estágio, IN. Infecção Natural.

No que se refere as taxas de IN por ecótopo, usando a PCR, os resultados mostraram que o ecótopo do peridomicílio com maior percentual de IN foi o curral de boi (56,3% - 85/151) aproximando-se da taxa observada para o afloramento rochoso, no ambiente silvestre (67,3% - 72/107). Deste total de espécimes (n= 280) avaliados pela PCR, 184 foram os mesmos avaliados pela MO. A análise comparativa destas duas técnicas mostrou um maior número de amostras positivas para a PCR (58,7% - 108/184) em relação a MO (43,5% - 80/184). Adicionalmente, os 96 espécimes restantes (dos 280) tratavam-se de espécimes mortos não avaliados pela MO. Nestes espécimes, a presença de kDNA de *T. cruzi* foi detectada em 59,3% (57/96) das amostras, evidenciando a maior sensibilidade desta ferramenta molecular. É importante mencionar que 16 espécimes negativos para a PCR foram positivos para a MO.

As análises demonstraram que na maioria dos ecótopos do peridomicílio (4/6) foi detectado barbeiros infectados com *T. cruzi*. Destes, o curral de boi foi o que apresentou a maior taxa de IN (56,3% - 85/151), equiparando-se ao afloramento rochoso do ambiente silvestre (67,3% - 72/107). Apesar de termos examinado poucos espécimes do intradomicílio (1/2 - não mostrados na tabela), os resultados

evidenciaram que uma N5 encontrada no banheiro de uma casa desabitada em Inácio (~ 20m de uma casa habitada) estava infectada com *T. cruzi* (Figura 5.9).

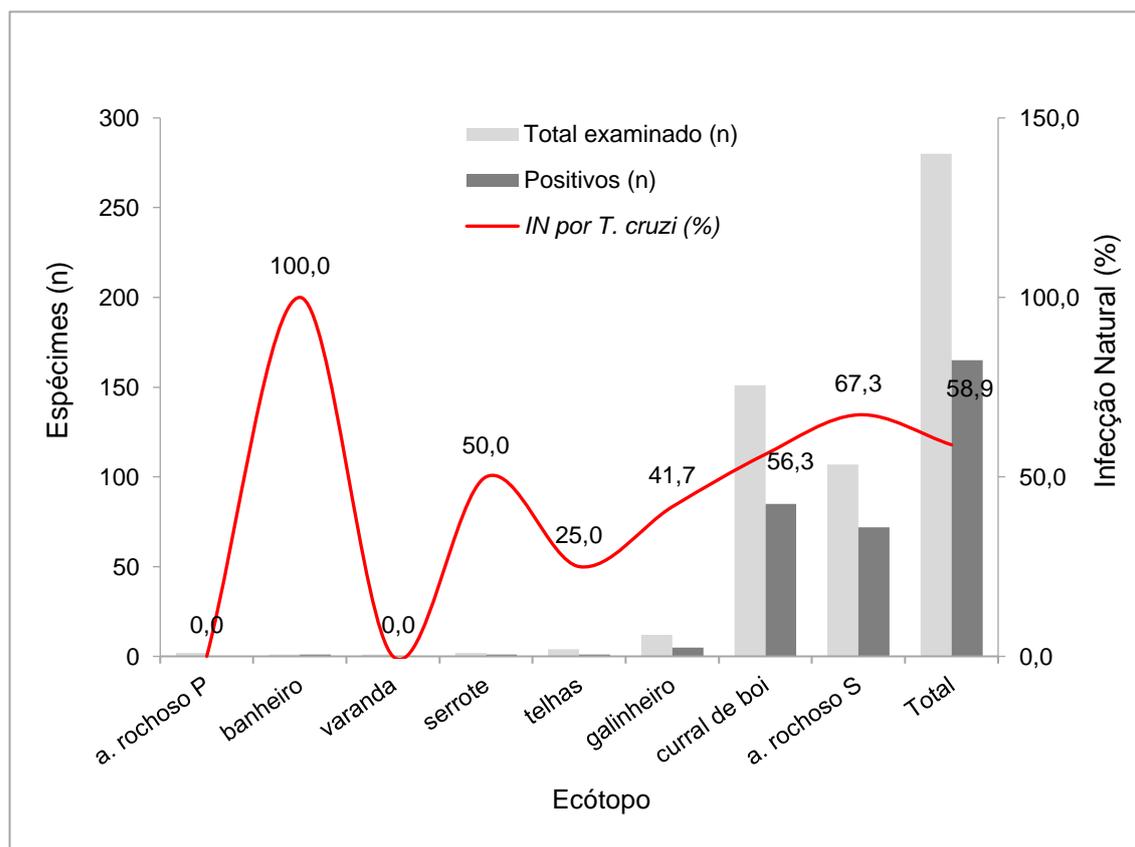


Figura 5.9. Índice de infecção natural de *T. b. brasiliensis*, avaliados pela PCR (n= 280), coletados em diferentes ecótipos do peridomicílio e do ambiente silvestre das localidades: Pedregulho, Inácio, SSBE (Sítio São Bernardo de Elias), SRS (Sítio Riacho do Santo) e BEC (Batalhão de Engenharia de Construção) do município de Caicó, Rio Grande do Norte. a. afloramento rochoso, serrote. cerca de pedras, P. peridomicílio, S. silvestre.

5.3. Identificação das fontes alimentares

As fontes alimentares foram identificadas a partir de amostras de extratos de intestino de *T. b. brasiliensis*. Dos 452 espécimes dissecados, 280 tiveram o seu DNA total extraído e submetido à reação de amplificação (PCR) do gene *Cyt B* (mtDNA), empregando os iniciadores L14841 e H15149. Destas 280 amostras, 54 amplificaram o fragmento correspondente à região do gene alvo (Figura 5.10). O baixo sucesso da amplificação do *Cyt B* pode ter sido devido ao fato de uma parte dos indivíduos apresentarem baixo estado nutricional, sobretudo os espécimes capturados no ambiente silvestre.

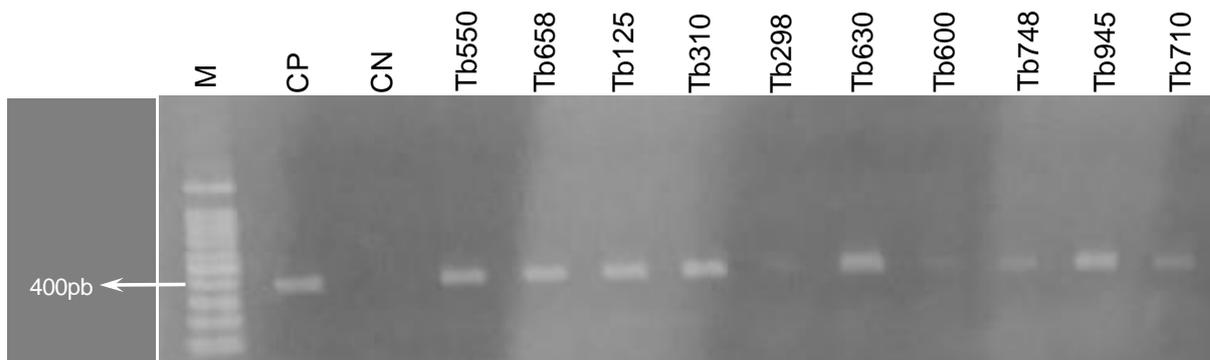


Figura 5.10. Gel de agarose (1,5%) mostrando os produtos de amplificação do gene *Cyt B* pela Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando os iniciadores L14841/H15149 para identificação das fontes alimentares de *T. b. brasiliensis*. Canaleta 1. CP controle positivo (DNA extraído de amostra de sangue de porco doméstico *Sus domesticus*); canaleta 2. CN controle negativo (reagentes sem DNA); amostras de conteúdo intestinal de *T. b. brasiliensis* que amplificaram para o fragmento 375pb: canaleta 3. Tb550, 4. Tb658, 5. Tb125, 6. Tb 885, 7. Tb298, 8. Tb630, 9. Tb630 10. Tb748, 11. Tb 945 e 12. Tb710. M Marcador Molecular de 100pb.

A escassez de sangue no intestino do inseto resulta em baixa concentração de DNA extraído do conteúdo intestinal, dificultando a amplificação do fragmento correspondente ao *Cyt B*. Embora tenhamos observado que a maioria dos triatomíneos capturados no peridomicílio estavam ingurgitados, ao chegarem no laboratório permaneceram por um tempo em jejum até o momento da dissecação para a análise da fonte alimentar. Neste período, os triatomíneos eliminaram fezes e urina, ocasionando a perda de material a ser analisado, essa pode ser outra explicação para o baixo número de amostras que tiveram o gene alvo amplificado. Das 54 amostras que amplificaram o *Cyt B*, 39 foram sequenciadas, exibindo variação de identidade BLAST de 89 a 99% (Tabela 5.8). O sequenciamento permitiu a identificação de nove espécies de vertebrados, as quais pertenciam às classes Mammalia e Aves. Os mamíferos foram a maioria e se distribuíram através de seis ordens: Rodentia (53,8% - 21/39), Primata (20,5% - 8/39), Artiodactyla (17,9% - 7/39), Carnivora (2,6% - 1/39), Galliformes (2,6% - 1/39) e uma sequência que apresentou 94% de identidade com um marsupial endêmico da Austrália que pertence a ordem Dasyuromorphia (2,6% - 1/39). Das nove espécies identificadas, 6 eram domésticas: *Homo sapiens* (homem), *Bos taurus* (boi), *Gallus gallus* (galinha), *Mus musculus* (camundongo), *Capra hircus* (cabra), *Felis catus* (gato doméstico) e 3 eram silvestres com diferentes graus de sinantropia: *Kerodon rupestris* (mocó), *Galea spixii* (preá) e *Planigale maculata* (marsupial) (Tabela 5.8).

Tabela 5.8. Lista das fontes alimentares e da infecção natural por *T. cruzi* de *T. b. brasiliensis* capturados no intradomicílio, peridomicílio e ambiente silvestre de diferentes localidades de Caicó, Rio Grande do Norte. As fontes alimentares detectadas em vetores infectados pelo *T. cruzi* estão em negrito.

Espécime	Localidade	Ambiente	Ecótopo	FD	IN (MO)	IN (PCR)	Cultura	IN Global	Afiliação da espécie no Gen Bank	Nome Popular	ID (%)	Código no Gen Bank
Tb08	Pedregulho	Peridomicílio	curral	N5	1	-	1	1	Gallus gallus	galinha	89	DQ512917.1
Tb125	Pedregulho	Peridomicílio	curral	N5	0	-	-	0	<i>Mus musculus</i>	camundongo	98	KT376849.1
Tb126	Pedregulho	Peridomicílio	curral	N5	0	-	-	0	<i>Mus musculus</i>	camundongo	99	KT376849.1
Tb189	Pedregulho	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	0	0	-	0	<i>Galea spixii</i>	preá	93	GU0674492.1
Tb191	Pedregulho	Silvestre	af. rochoso	Macho	0	1	-	1	Galea spixii	preá	95	MVZ-Mamm197805
Tb269	SSBE	Peridomicílio	serrote	Fêmea	0	1	-	1	Homo sapiens	humano	94	KX697544.1
Tb292	SSBE	Peridomicílio	serrote	Macho	-	-	-	-	<i>Homo sapiens</i>	humano	96	KX697544.1
Tb303	SSBE	Peridomicílio	af. rochoso	N5	0	0	-	0	<i>Capra hircus</i>	cabra	91	FM205715.1
Tb 310	SSBE	Peridomicílio	curral	N5	0	1	1	1	Bos taurus	boi	92	EU365345.1
Tb 435	Inácio	Peridomicílio	curral	N5	0	-	-	0	<i>Bos taurus</i>	boi	97	EU365345.1
Tb 451	Inácio	Peridomicílio	curral	N4	0	0	-	0	<i>Mus musculus</i>	camundongo	95	HQ270435.1
Tb488	Inácio	Peridomicílio	curral	Fêmea	-	0	-	0	<i>Homo sapiens</i>	humano	97	KX697454.1
Tb493	Inácio	Peridomicílio	curral	N5	1	1	1	1	Bos taurus	boi	98	EU365345.1
Tb546	Inácio	Peridomicílio	curral	N5	0	0	0	0	<i>Bos taurus</i>	boi	99	RM07-Bos
Tb 547	Inácio	Peridomicílio	curral	N5	-	1	-	1	Bos taurus	boi	93	MG847595.1
Tb550	Inácio	Peridomicílio	curral	N5	1	1	1	1	Bos taurus	boi	99	RM07-Bos
Tb622	Inácio	Intradomicílio	casa des.	N5	-	1	-	1	Kerodon rupestris	mocó	90	GU1367220.1
Tb626	Inácio	Silvestre	af. rochoso	Macho	0	1	-	1	Homo sapiens	humano	96	KX697544.1
Tb630	Inácio	Silvestre	af. rochoso	N5	1	1	1	1	Kerodon rupestris	mocó	97	KR40
Tb657	BEC	Silvestre	af. rochoso	Macho	0	-	1	1	Kerodon rupestris	mocó	97	GU136722.1

Abreviações: Tb. *Triatoma brasiliensis*, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção, af. afloramento, des. desabitada, FD. Fase de desenvolvimento, IN. Infecção Natural, ID. identidade das sequencias obtidas no presente estudo com aquelas do GenBank, N5. ninfa de 5º estágio, (-) Espécime não foi avaliado pela(s) técnica(s), Pos/Ex. positivos/examinados.

(...Continuação)

Tabela 5.8. Lista das fontes alimentares e da infecção natural por *T. cruzi* de *T. b. brasiliensis* capturados no intradomicílio, peridomicílio e ambiente silvestre de diferentes localidades de Caicó, Rio Grande do Norte. As fontes alimentares detectadas em vetores infectados pelo *T. cruzi* estão em negrito.

Espécime	Localidade	Ambiente	Ecótopo	FD	IN (MO)	IN (PCR)	Cultura	IN Global	Afiliação da espécie no Gen Bank	Nome Popular	ID (%)	Código no Gen Bank
Tb658	BEC	Silvestre	af. rochoso	Macho	0	1	-	1	<i>Homo sapiens</i>	humano	93	KX697544.1
Tb683	BEC	Silvestre	af. rochoso	N5	1	1	1	1	<i>Felis catus</i>	gato	98	KX348260.1
Tb696	BEC	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	-	1	-	1	<i>Homo sapiens</i>	humano	94	MG761725.1
Tb710	BEC	Silvestre	af. rochoso	N5	1	1	-	1	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	95	GU136722.1
Tb754	BEC	Silvestre	af. rochoso	N5	0	1	0	1	<i>Galea spixii</i>	preá	90	GU067492.1
Tb763	BEC	Silvestre	af. rochoso	N5	1	1	-	1	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	96	KR40
Tb788	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	N5	0	1	0	1	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	98	GU136722.1
Tb789	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	N5	1	1	1	1	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	94	KR40
Tb798	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	Macho	0	1	1	1	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	97	KR40
Tb802	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	Macho	-	0	-	0	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	96	GU136722.1
Tb804	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	1	1	1	1	<i>Planigale maculata</i>	marsupial	94	KX604037.1
Tb820	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	N5	-	1	-	1	<i>Homo sapiens</i>	humano	97	KX697544.1
Tb854	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	N5	1	1	-	1	<i>Mus musculus</i>	camundongo	95	KY018919.1
Tb858	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	Fêmea	0	1	-	1	<i>Homo sapiens</i>	humano	97	KX697544.1
Tb902	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	N5	1	1	-	1	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	97	KR40
Tb904	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	N5	-	-	-	-	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	90	GU136722.1
Tb945	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	Fêmea	1	0	-	1	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	96	KR40
Tb962	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	N5	-	1	-	1	<i>Kerodon rupestris</i>	mocó	92	GU136722.1
Tb990	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	Macho	-	1	-	1	<i>Galea spixii</i>	preá	91	GU067492.1
Total Pos/Ex (%)					12/29 (41,3)	25/33 (75,7)	13/17 (76,4)	28/37 (75,6)				

Abreviação: Tb. *Triatoma brasiliensis*, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção, af. afloramento, des. desabitada, FD. Fase de desenvolvimento, IN. Infecção Natural, ID. identidade das sequencias obtidas no presente estudo com aquelas do GenBank, N5. ninfa de 5º estágio, (-) Espécime não foi avaliado pela(s) técnica(s), Pos/Ex. positivos/examinados.

No geral, a análise revelou que os hospedeiros utilizados como fontes alimentares mais frequentes de *T. b. brasiliensis* na área de estudo foram: *K. rupestris* (33% - 13/39) e *H. sapiens*, (20% - 8/39) seguidos de *B. taurus* (15,4% - 6/39), *G. spixii* e *M. musculus* (10,2% - 4/39) (Tabela 5.8 e Figura 5.11A). Dos 39 espécimes que se identificou a fonte alimentar, 28 estavam infectados por *T. cruzi*. Entre os espécimes infectados por este parasito, 35,7% (10/28) haviam se alimentado com sangue de mocó e 21,4% (6/28) de humano (Tabela 5.8, Figura 5.11B).

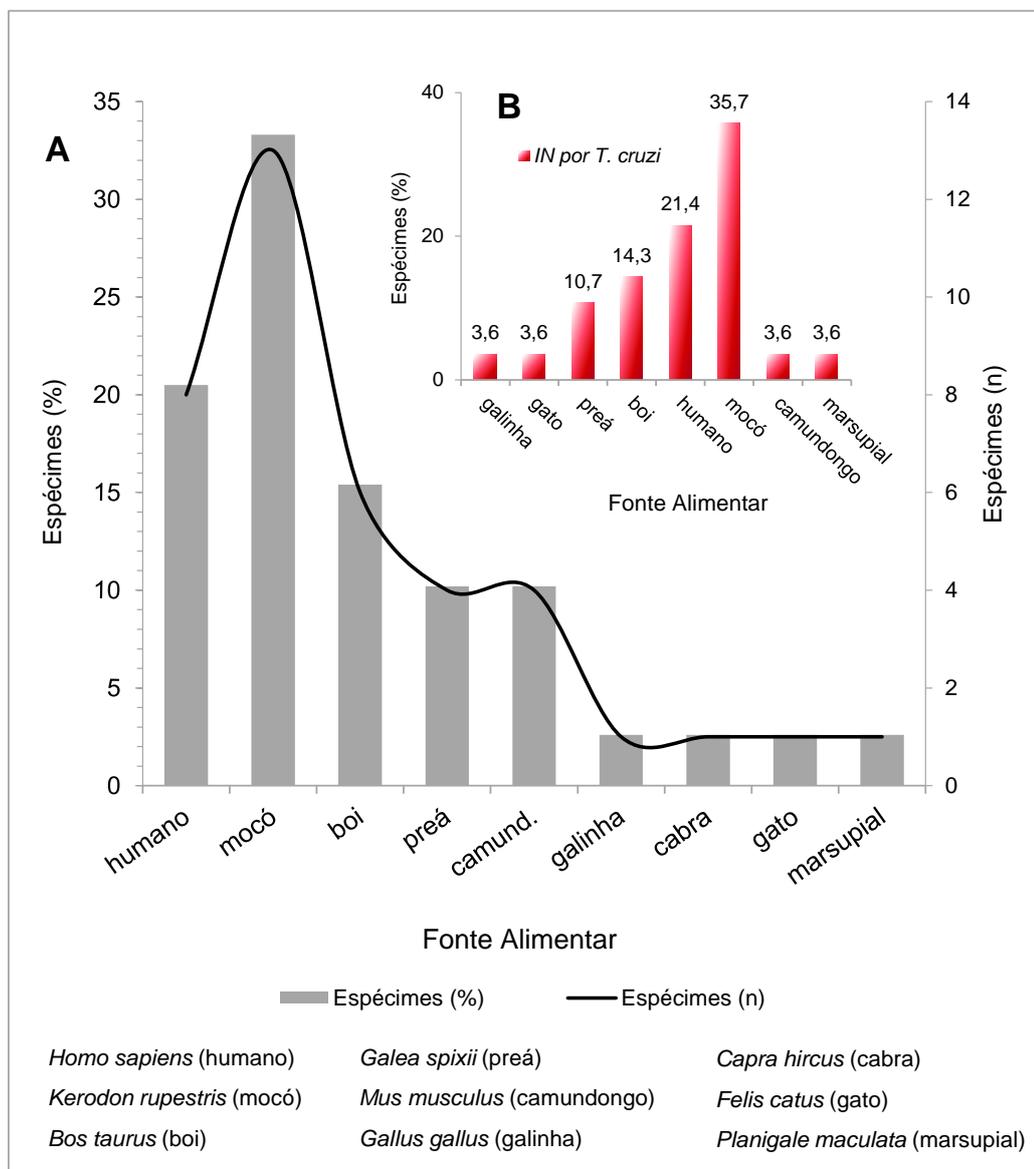


Figura 5.11. Distribuição das fontes alimentares de *T. b. brasiliensis* identificadas através do sequenciamento do gene *Cyt B* presente no conteúdo intestinal de espécimes, **A.** independente da positividade e **B.** dos positivos, capturados em ecótopos naturais e artificiais das localidades: Pedregulho, Inácio, Sítio São Bernardo de Elias, Sítio Riacho do Santo e Batalhão de Engenharia de Construção do município de Caicó, Rio Grande do Norte.

Os resultados mostraram que o tipo de fonte alimentar variou de acordo com o ambiente, o sangue do roedor silvestre *K. rupestris* foi identificado em espécimes de *T. b. brasiliensis* no peridomicílio (4 espécimes no curral de boi) e no intradomicílio (1 espécime na casa desabitada), além do ambiente silvestre. O sangue de gato doméstico (*F. catus*) foi identificado no ambiente silvestre (1 espécime no afloramento rochoso) (Tabela 5.8). No peridomicílio, os espécimes capturados em curral de boi alimentaram-se de uma maior diversidade de animais (6 espécies). Como esperado, detectou-se um maior percentual de sangue de *B. taurus* 33,3% (6/18), mas encontramos também um percentual considerável de *K. rupestris* e *M. musculus* 22,2% (4/18) neste ecótopo. No ambiente silvestre (modificado e conservado), os afloramentos rochosos também estavam sendo colonizados por espécimes que se alimentavam de uma variedade de animais (5 espécies). Entretanto, a metade das fontes alimentares identificadas foi de *K. rupestris* (50% - 8/16) seguida de *G. spixii* e *H. sapiens* 19% (3/16) (Figura 5.12).

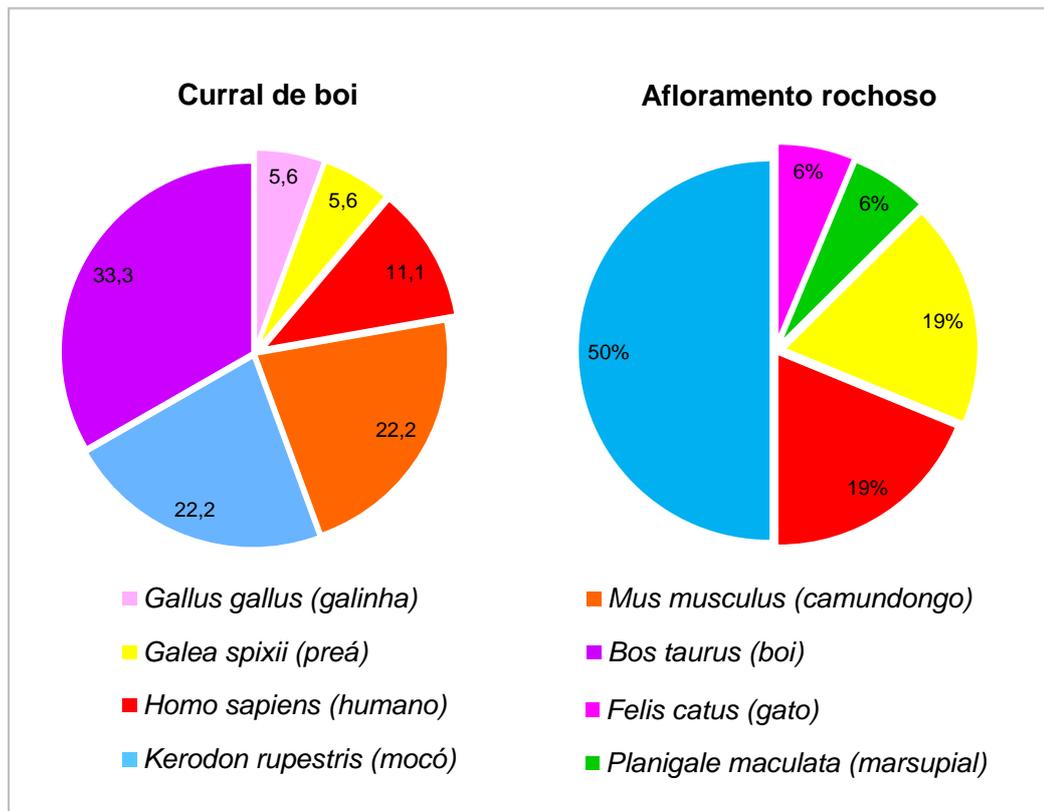


Figura 5.12. Distribuição das fontes alimentares de *T. b. brasiliensis* identificadas através do sequenciamento do gene *Cyt B* do mtDNA presente no conteúdo intestinal de espécimes capturados no curral de boi (peridomicílio) e nos afloramentos rochosos (silvestre modificado e conservado) das localidades: Pedregulho, Inácio, Sítio São Bernardo de Elias, Sítio Riacho do Santo e Batalhão de Engenharia de Construção do município de Caicó, Rio Grande do Norte.

Ao avaliar os insetos infectados por *T. cruzi* (n= 28) de acordo com o ecótopo, verificou-se que no curral de boi os maiores percentuais foram registrados para *B. taurus* (37% - 4/11) e *K. rupestris* (27% - 3/11). No afloramento rochoso, ambiente silvestre, o sangue de *K. rupestris* (46% - 7/15) e *H. sapiens* (27% - 4/15) foram os mais detectados nos insetos infectados (Figura 5.13). Em uma fêmea capturada em um serrote no peridomicílio e uma N5 capturada em uma casa desabitada foram identificados o sangue de *H. sapiens* e *K. rupestris*, respectivamente (Tabela 5.8).

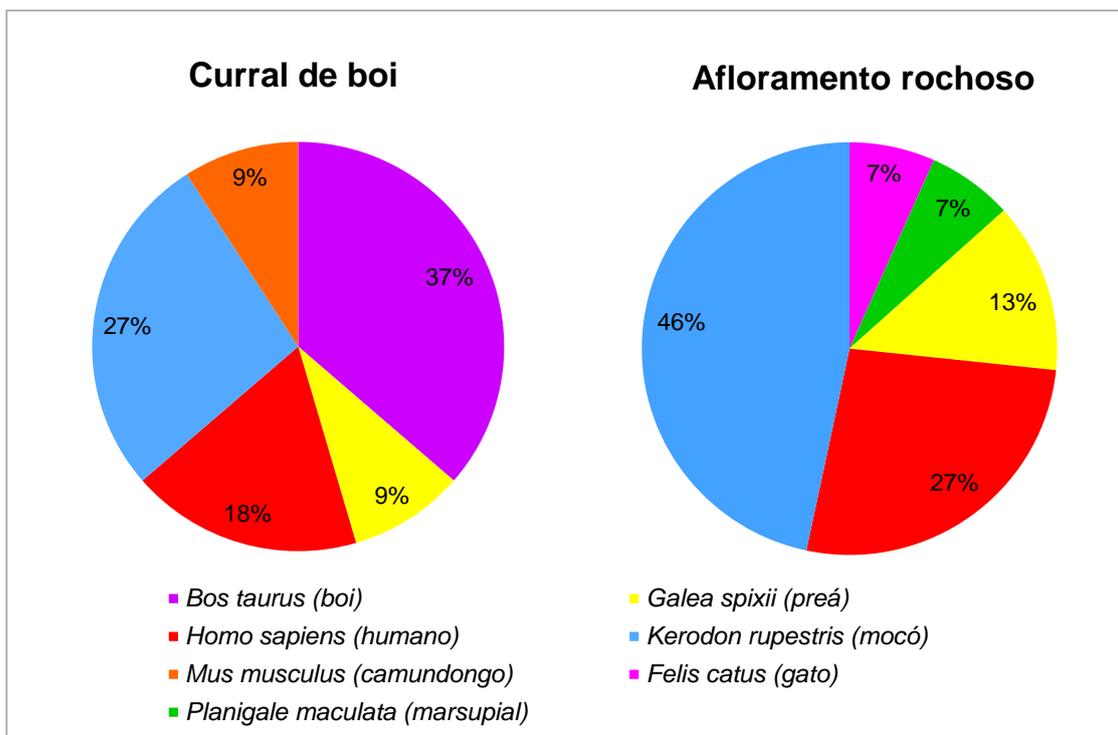


Figura 5.13. Distribuição das fontes alimentares de *T. b. brasiliensis* identificadas através do sequenciamento do gene *Cyt B* do mtDNA presente no conteúdo intestinal de espécimes infectados com *T. cruzi* capturados no curral de boi (peridomicílio) e nos afloramentos rochosos (silvestre modificado e conservado) das localidades: Sítio Pedregulho, Sítio Inácio, Sítio São Bernardo de Elias, Sítio Riacho do Santo e Batalhão de Engenharia de Construção do município de Caicó, Rio Grande do Norte.

5.4. Caracterização molecular de *T. cruzi*

A tipagem genética de *T. cruzi* foi realizada a partir de amostras das massas de parasitos crescidas em meio LIT, por meio da análise RFLP do gene COII (Haplótipos mitocondriais A: 30+81+264pb, B: 82+212pb e C: 81+294pb); PCR do locus 24S α do rDNA (110pb ou 125pb ou 117/119pb ou 110/125pb) e PCR do gene SL-IR (150pb ou 200pb) (Figura 5.14 A-C) conforme sugerido por D'ávila et al (2009)

em um ensaio de três etapas apresentado por Martins et al (2015) (ver Material e Métodos).

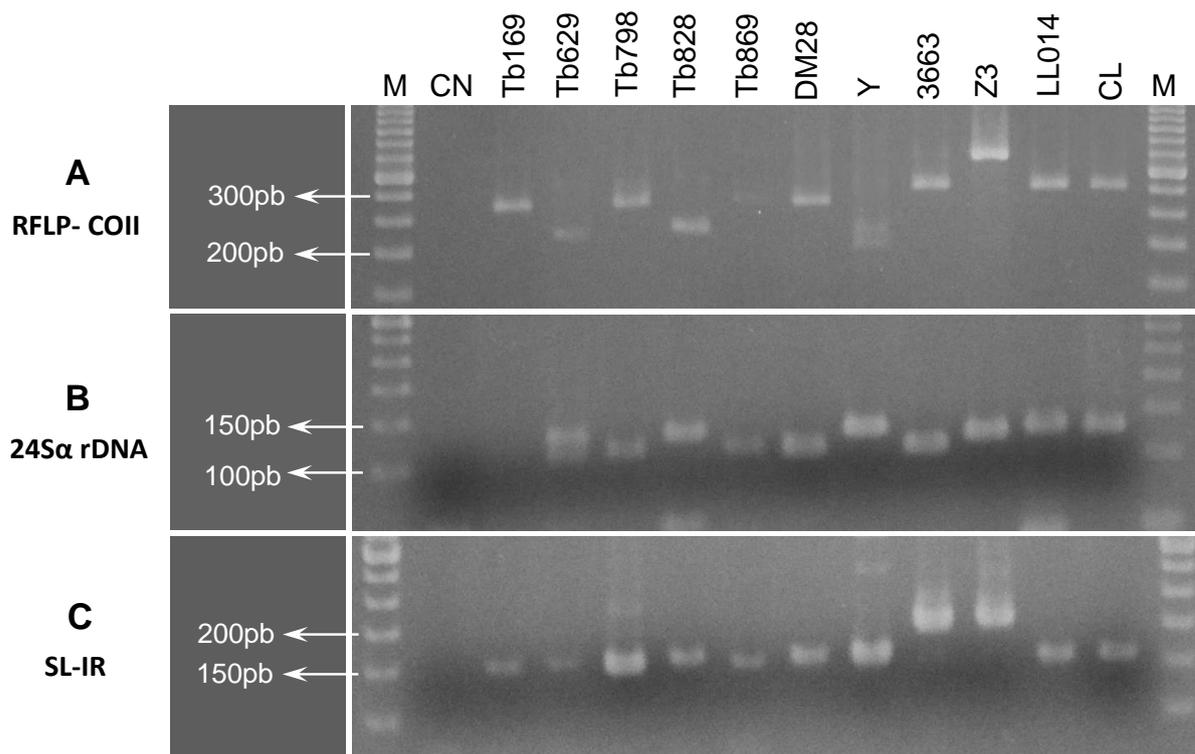


Figura 5.14. Géis de agarose (3,5%) representativos do ensaio em três etapas para caracterização dos isolados de *T. cruzi* em DTUs. **A.** Análise por RFLP do gene mitocondrial COII: canaleta 1. CN controle negativo; canaletas 2. Tb169, 4. Tb798 e 6. Tb869 fragmentos de restrição de 264, 81 e 30pb classificados como TcI (haplótipo mitocondrial A); canaleta 3. Tb629 e 5. Tb828 fragmentos de restrição de 212 e 81pb classificados como TcII (haplótipo mitocondrial C). Cepas e clones de *T. cruzi* usados como referência: canaletas 7. DM28 (TcI, haplótipo mitocondrial A); 8.Y (TcII, haplótipo mitocondrial C), 9. 3663, 11. LL014 e 12. CL Brenner fragmentos de restrição de 294 e 81pb, 10. Z3 (450pb) (TcIII-TcVI, haplótipo mitocondrial B). **B.** Análise do domínio divergente D7 do locus 24Sα do rDNA: canaleta 1. CN - controle negativo; canaletas 2. Tb169 (não amplificou), 3. Tb629 (125pb), 4. Tb798 (110pb), 5. Tb 828 (125pb) e 6. Tb869 (110pb). Cepas e clones de *T. cruzi* usados como referência: canaletas 9. DM28 (110pb); 10.Y (125pb), 11. 3663 (110pb). 12. Z3 (117-119pb), 13. LL014 (125pb), 14. CL Brenner (125pb). **C.** Análise do gene SL-IR para separar isolados de TcIII e TcIV de outras DTUs: canaleta 1. CN - controle negativo; canaletas 2. Tb169 (150pb), 3. Tb629 (150pb), 4. Tb798 (150pb), 5. Tb828 (150pb) e 6. Tb869 (150pb). Cepas e clones de *T. cruzi* usados como referência: canaletas 6. DM28 (150pb); 7.Y (150pb), 8. 3663 (200pb). 9. Z3 (200pb), 10. LL014 (150pb), 11. CL Brenner (150pb). M. Marcador Molecular de 50pb.

Dentre as 52 culturas positivas, 43 obtiveram sucesso na formação da massa de parasitos, das quais, até o presente momento, foram caracterizadas as linhagens de *T. cruzi* em 28 amostras. Os resultados mostraram que as DTUs circulantes em populações de *T. b. brasiliensis* da área de estudo foram TcI e TcII. A DTU detectada em maior frequência foi TcI 67,9% (19/28), presente tanto em populações do peridomicílio (7 amostras, curral de boi) quanto naquelas do ambiente silvestre (modificado conservado) (12 amostras, afloramento rochoso). A DTU TcII foi identificada em menor frequência 32,1% (9/28), porém se distribuiu em afloramentos rochosos no ambiente silvestre (6 amostras) e no curral de boi no peridomicílio (3 amostras) (Figura 5.15).

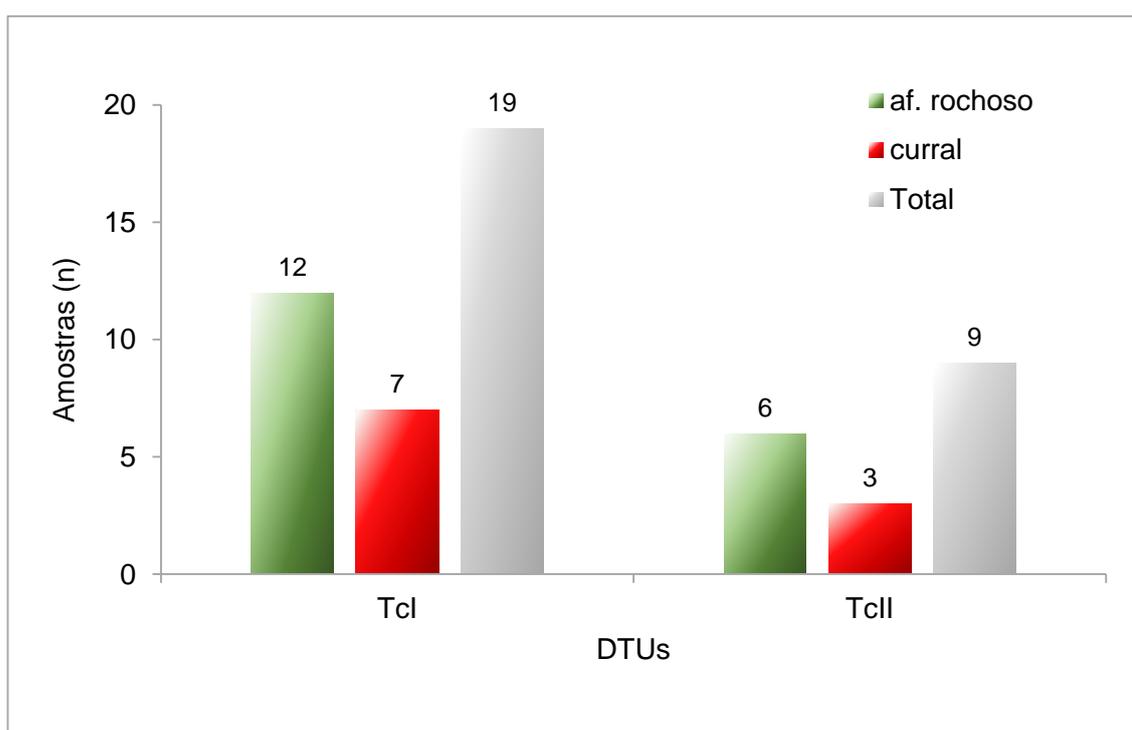


Figura 5.15. Distribuição das DTUs de *T. cruzi* isoladas de *T. b. brasiliensis* capturados no curral de boi (peridomicílio) e nos afloramentos rochosos (silvestre modificado e conservado) das localidades: Pedregulho, Inácio, SSBE (Sítio São Bernardo de Elias), SRS (Sítio Riacho do Santo) e BEC do município de Caicó, Rio Grande do Norte.

Ambas as DTUs TcI e TcII estão presentes em quase todas as localidades de estudo: Inácio, BEC e SRS. Em Pedregulho e no SSBE detectou-se apenas TcI ou TcII, respectivamente, possivelmente devido ao baixo número de amostras analisadas. Informações mais detalhadas podem ser verificadas na tabela 5.9.

Tabela 5.9. Lista das DTUs de *T. cruzi* isoladas de *T. b. brasiliensis* capturados no peridomicílio e no ambiente silvestre (modificado e conservado) das localidades de Caicó, Rio Grande do Norte.

Espécime	Localidade	Ambiente	Ecótopo	FD	COII - Alul	Haplótipo	24α rDNA	SL-IR	DTU
Tb08	Pedregulho	Peridomicílio	curral	N5	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb169	Pedregulho	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb310	SSBE	Peridomicílio	curral	N5	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII
Tb502	Inácio	Peridomicílio	curral	N5	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb550	Inácio	Peridomicílio	curral	N5	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb600	Inácio	Silvestre	af. rochoso	Macho	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb601	Inácio	Silvestre	af. rochoso	Macho	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb609	Inácio	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb623	Inácio	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb629	Inácio	Silvestre	af. rochoso	N5	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII
Tb630	Inácio	Silvestre	af. rochoso	N5	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII
Tb657	BEC	Silvestre	af. rochoso	Macho	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	TcI
Tb662	BEC	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII
Tb683	BEC	Silvestre	af. rochoso	N5	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII

Abreviações: FD. Fase de Desenvolvimento, COII, 24α rDNA e SL-IR são os marcadores usados para a identificação das DTUs. Tb. *Triatoma b. brasiliensis*; SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção, af. afloramento rochoso, N5. ninfa de 5º estágio. Cepas de Referência: TcI.: Dm28c, *Didelphis marsupialis*, Carabobo, Venezuela; TcII.: Y, *Homo sapiens*, São Paulo, Brasil; TcIII.: 3663, *Panstrongylus geniculatus*, Amazonas, Brasil; TcIV.: 4167, *Rhodnius brethesi*, Amazonas, Brasil; TcV.: 3253, *Homo sapiens*, Lages-Silva et al dados não publicados; TcVI.: CL Brenner, *Triatoma infestans*, Rio Grande do Sul, Brasil.

(Continuação...)

Tabela 5.9. Lista das DTUs de *T. cruzi* isoladas de *T. b. brasiliensis* capturados no peridomicílio e no ambiente silvestre de diferentes localidades de Caicó, Rio Grande do Norte.

Espécime	Localidade	Ambiente	Ecótopo	FD	COII - Alul	Haplótipo	24α rDNA	SL-IR	DTU
Tb684	BEC	Silvestre	af. rochoso	Macho	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb762	BEC	Silvestre	af. rochoso	N5	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII
Tb784	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	Macho	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb785	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	Macho	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb789	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	N5	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb798	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	Macho	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb804	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb828	Riacho do Santo	Silvestre	af. rochoso	Fêmea	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII
Tb852	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	N5	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII
Tb860	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	Fêmea	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb869	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	N5	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb885	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	N5	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl
Tb890	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	Macho	82pb 212pb	C	125pb	150pb	TcII
Tb903	Riacho do Santo	Peridomicílio	curral	N5	30pb 81pb 264pb	A	110pb	150pb	Tcl

Abreviações: FD. Fase de Desenvolvimento, COII, 24α rDNA e SL-IR são os marcadores usados para a identificação das DTUs. Tb. *Triatoma b. brasiliensis*; SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção de Caicó, af. afloramento rochoso, N5. ninfa de 5º estágio. Cepas de Referência: TcI.: Dm28c, *Didelphis marsupialis*, Carabobo, Venezuela; TcII.: Y, *Homo sapiens*, São Paulo, Brasil; TcIII.: 3663, *Panstrongylus geniculatus*, Amazonas, Brasil; TcIV.: 4167, *Rhodnius brethesi*, Amazonas, Brasil; TcV.: 3253, *Homo sapiens*, Lages-Silva et al dados não publicados; TcVI.: CL Brenner, *Triatoma infestans*, Rio Grande do Sul, Brasil.

5.5. Análise das alterações morfológicas das asas de populações de *T. b. brasiliensis* de Caicó, RN.

5.5.1. Variação do tamanho

5.5.1.1. Entre sexos, ambientes, localidades e grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*

Sexos - Os resultados mostraram que todas as populações de fêmeas avaliadas exibiram os maiores valores de TC das asas em relação aos machos do mesmo ambiente e localidade. No entanto, diferenças significativas foram observadas apenas para as populações de Pedregulho ($TC_F = 9,26 \pm 0,50$; $TC_M = 8,96 \pm 0,45$) (teste $t=2,2$, $p<0,0001$) e SRS ($TC_F = 8,79 \pm 0,33$; $TC_{Mc} = 8,00 \pm 0,32$) (teste $t=10,15$, $p<0,0001$) do peridomicílio (Figura 5.16 A-D) e de Inácio ($TC_F = 9,26 \pm 0,40$; $TC_{Mc} = 8,62 \pm 0,16$) (teste $t=4,9$, $p<0,0001$) e BEC ($TC_F = 8,69 \pm 0,40$; $TC_{Mc} = 8,35 \pm 0,26$) (teste $t=3,4$, $p<0,0001$) do ambiente silvestre (Figura 5.17 A-D), evidenciando dimorfismo sexual nas populações de *T. b. brasiliensis* da área estudada.

Ambientes - O tamanho (TC) das asas de fêmeas e machos variou entre os ambientes peridomiciliar e silvestre da mesma localidade. Houve diferença significativa entre asas das fêmeas de Inácio, na qual o valor de TC dos espécimes do ambiente silvestre foi mais alto que o valor de TC dos espécimes do peridomicílio ($TC_P = 8,91 \pm 0,36$; $TC_{SM} = 9,27 \pm 0,37$) (teste $t=-2,7$, $p<0,0001$) e de Pedregulho, onde se verificou asas maiores em indivíduos do peridomicílio ($TC_P = 9,26 \pm 0,50$; $TC_{SM} = 8,93 \pm 0,27$) (teste $t=2,43$, $p<0,0001$) (Figura 5.18 A-D). Diferenças significativas também foram observadas nos machos de Inácio ($TC_P = 8,03 \pm 0,34$; $TC_{SM} = 8,71 \pm 0,25$) (teste $t=-6,18$, $p<0,0001$), de SRS ($TC_P = 8,00 \pm 0,32$; $TC_{SM} = 8,81 \pm 0,23$) (teste $t=-8,99$, $p<0,0001$) e de SSBE ($TC_P = 8,19 \pm 0,20$; $TC_{SM} = 8,79 \pm 0,15$) (teste $t=-8,99$, $p<0,0001$), nas quais em todos os casos os valores de TC das asas dos exemplares do ambiente silvestre foram maiores do que as do peridomicílio (Figura 5.19 A-D).

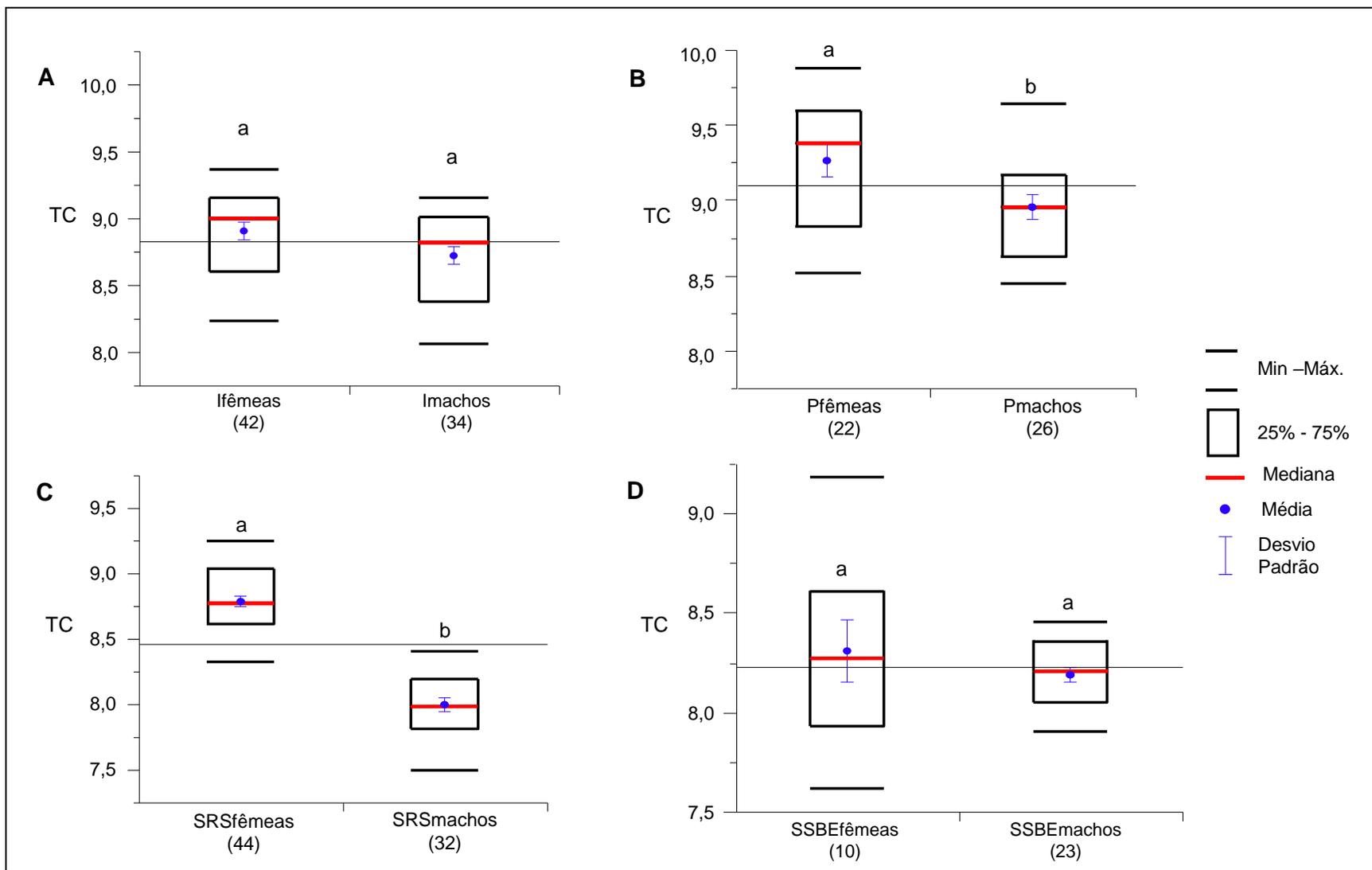


Figura 5.16. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* do peridomicílio entre sexos. **A.** Inácio (I), **B.** Pedregulho (P), **C.** Sítio Riacho do Santo (SRS) **D.** Sítio São Bernardo de Elias (SSBE). O número de asas testadas está entre parênteses, letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste t Student, $p < 0,0001$).

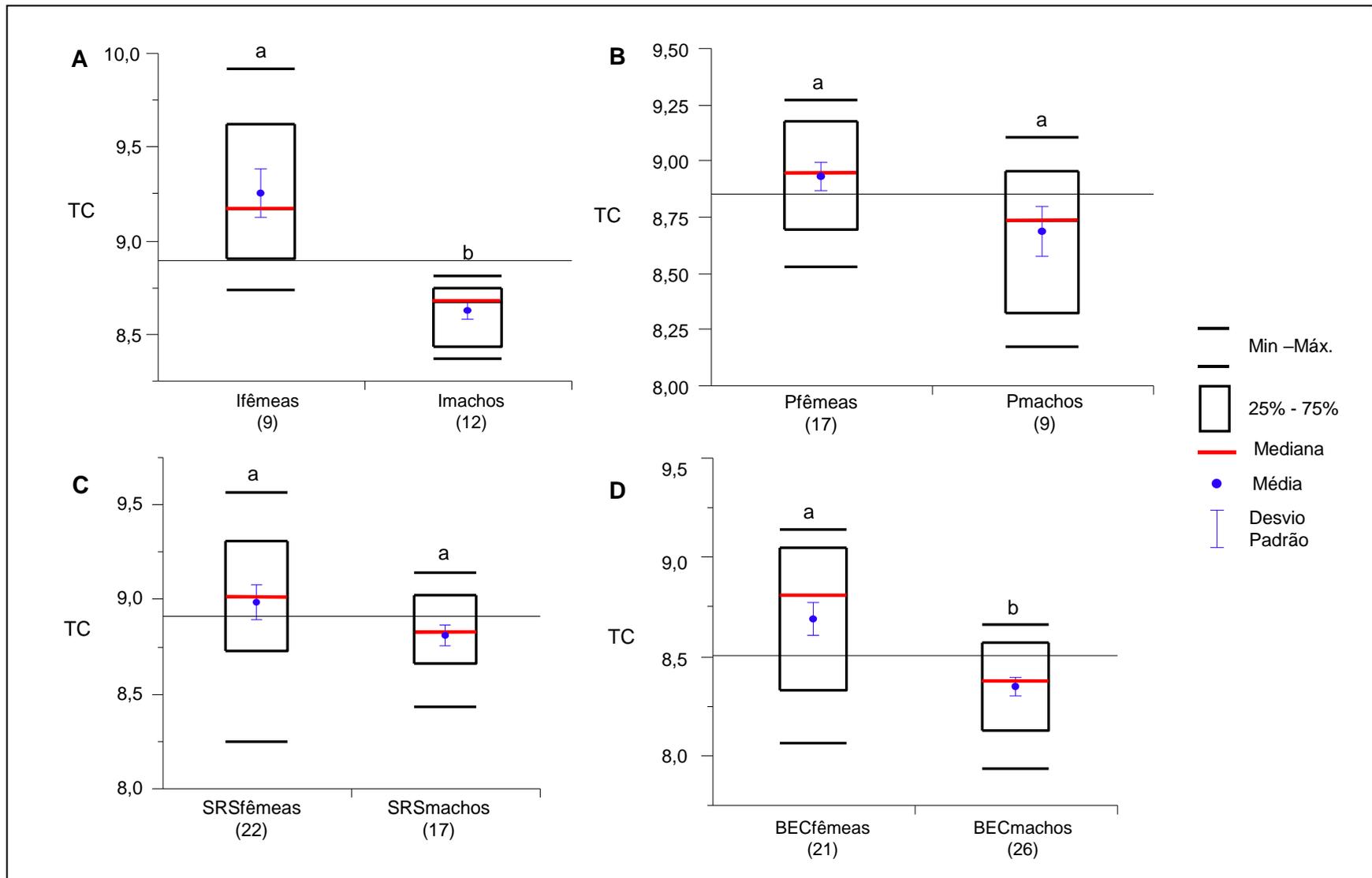


Figura 5.17. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* do ambiente silvestre entre sexos. **A.** Início (I), **B.** Pedregulho (P), **C.** Sítio Riacho do Santo (SRS) **D.** Batalhão de Engenharia de Construção (BEC). O número de asas testadas está entre parênteses, letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste t Student, $p < 0,0001$).

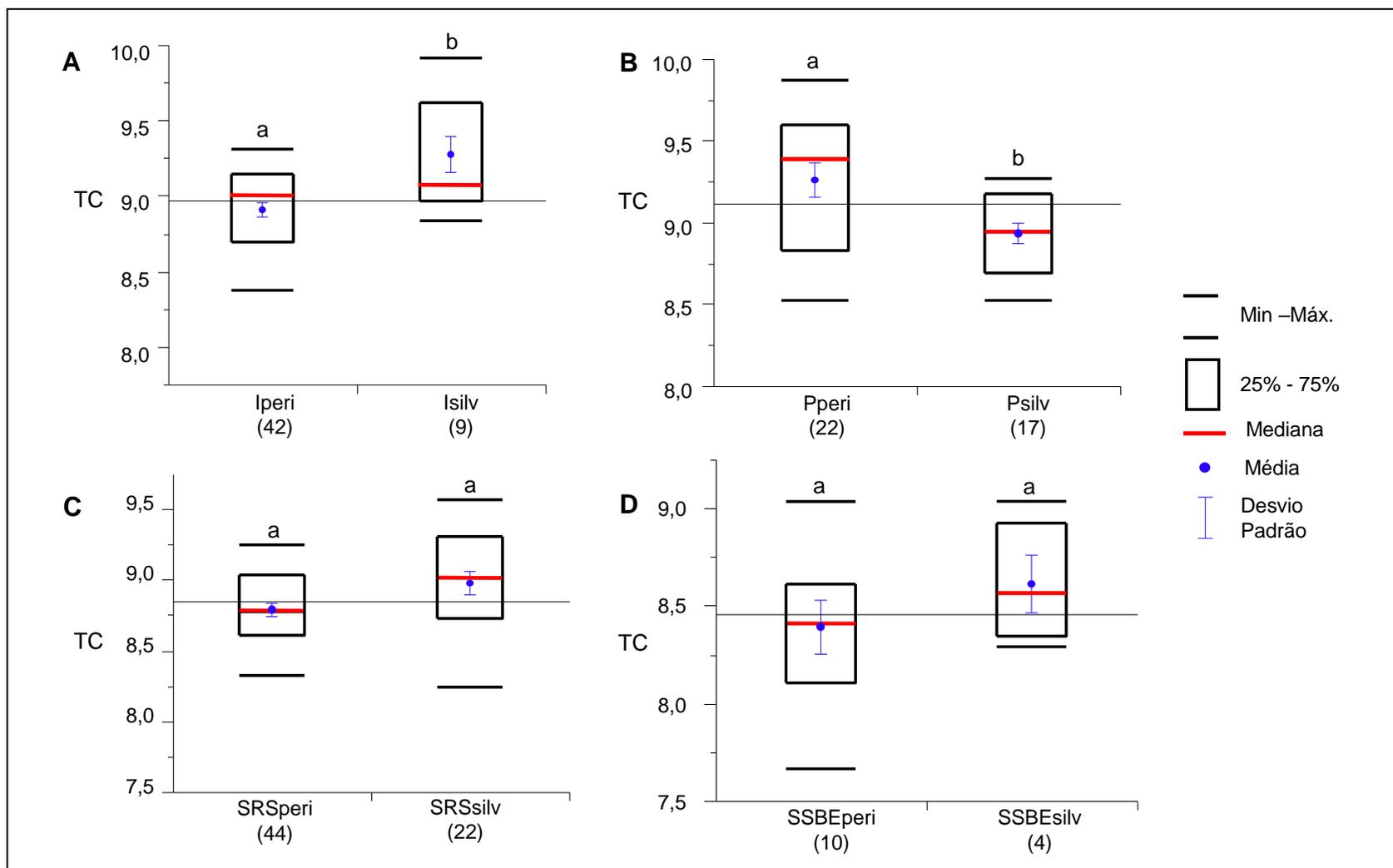


Figura 5.18. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* entre fêmeas dos ambientes peridomiciliar e silvestre. **A.** Inácio (I), **B.** Pedregulho (P), **C.** Sítio Riacho do Santo (SRS), **D.** Sítio São Bernardo de Elias (SSBE). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste t Student, $p < 0,0001$).

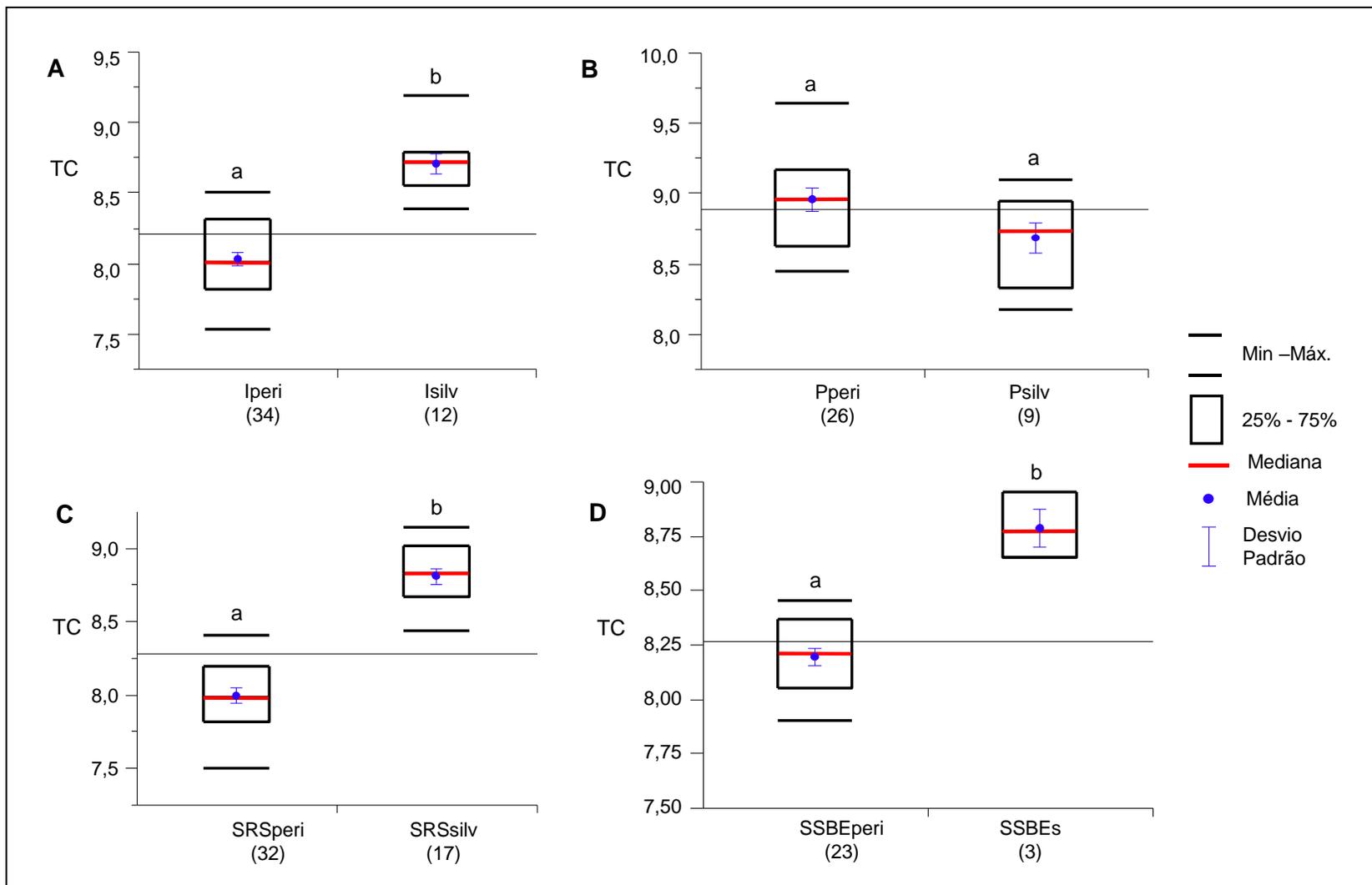


Figura 5.19. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* entre machos dos ambientes peridomiciliar e silvestre. **A.** Inácio (I), **B.** Pedregulho (P), **C.** Sítio Riacho do Santo (SRS), **D.** Sítio São Bernardo de Elias (SSBE). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste t Student, $p < 0,0001$).

Localidades - No que se refere às comparações de populações do mesmo ambiente entre localidades, o TC diferiu significativamente ($ANOVA_{FP}$: $F = 12,8$, $df = 3$, $p < 0,0001$; $ANOVA_{FS}$: $F = 12,8$, $df = 3$, $p < 0,0001$; $ANOVA_{MP}$: $F = 12,8$, $df = 3$, $p < 0,0001$; $ANOVA_{MS}$: $F = 12,8$, $df = 3$, $p < 0,0001$). O teste de comparação par-a-par de Tukey-Kramer mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,0001$) para as fêmeas do peridomicílio de Pedregulho, as quais exibiram maior valor de TC ($TC_{FP} = 9,26 \pm 0,50$) (Figura 5.20A) em relação às fêmeas das demais localidades. Quanto aos machos, indivíduos do peridomicílio de Inácio ($TC_{MP} = 8,73 \pm 0,39$) e de Pedregulho ($TC_{MP} = 8,96 \pm 0,45$) apresentaram maiores valores de TC em relação a SRS ($TC_{MP} = 8,00 \pm 0,32$) e SSBE ($TC_{MP} = 8,19 \pm 0,20$) (Figura 5.20C) (teste de Tukey-Kramer, $p < 0,001$). Curiosamente, o TC dos espécimes machos do ambiente SC do BEC ($TC = 8,35 \pm 0,26$) foi menor que o dos espécimes do ambiente SM das demais localidades (Figura 5.20D) (teste de Tukey-Kramer, $p < 0,001$) assim como observado para as fêmeas ($TC_{FS} = 8,69 \pm 0,40$) (Figura 5.20B).

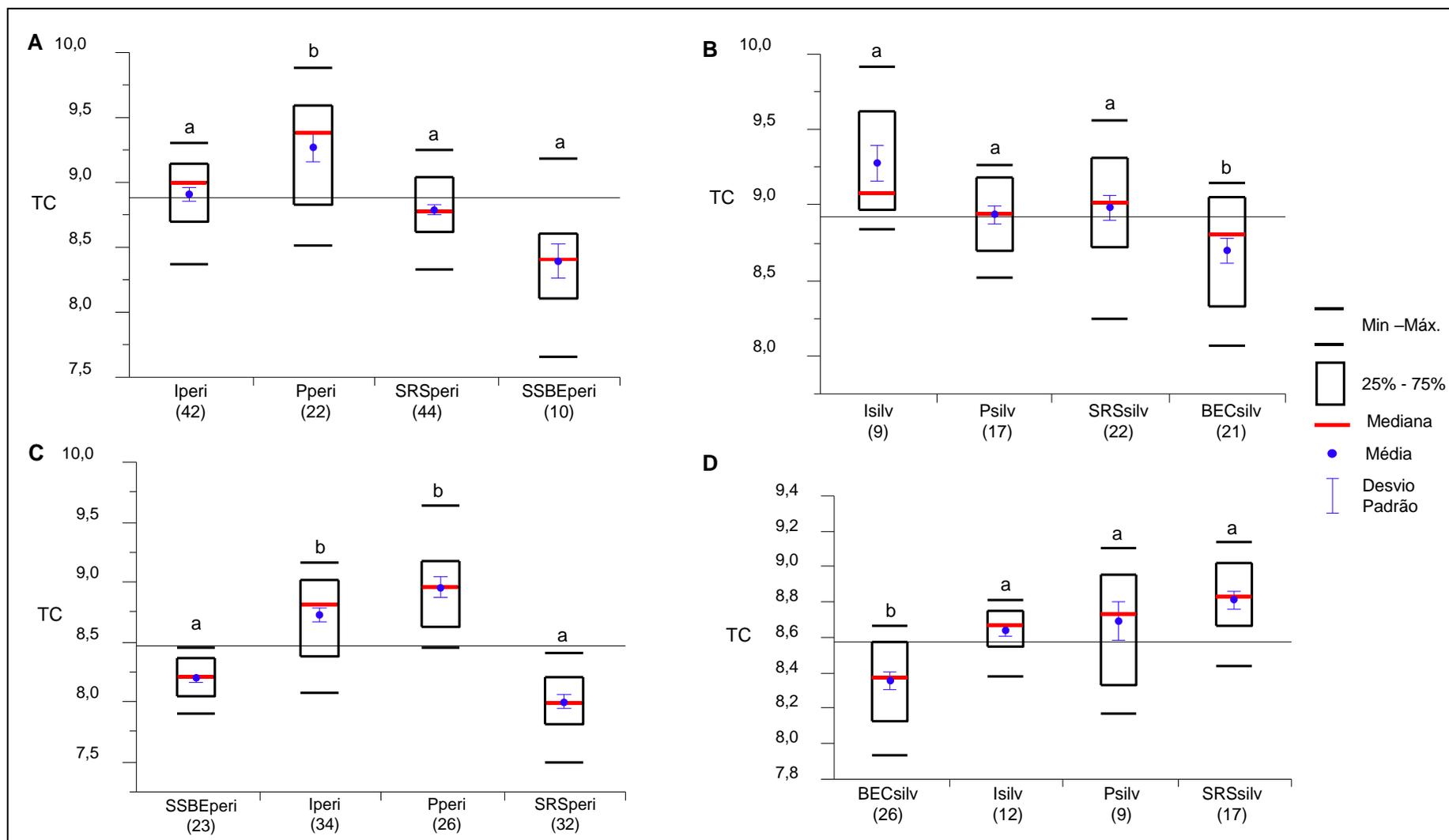


Figura 5.20. Variação do tamanho do centroide (TC) das asas de populações do peridomicílio (peri) e do ambiente silvestre (silv) de *T. b. brasiliensis* entre as localidades Inácio (I), Pedregulho (P), Sítio Riacho do Santo (SRS), Sítio São Bernardo de Elias (SSBE) e Batalhão de Engenharia de Construção (BEC). **A.** fêmeas peridomicílio, **B.** fêmeas ambiente silvestre, **C.** machos do peridomicílio e **D.** machos do ambiente. Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste Tukey-Kramer, $p < 0,0001$).

Infecção natural por *T. cruzi* - Grupos de espécimes de *T. b. brasiliensis* infectados e não infectados com *T. cruzi*, provenientes da mesma localidade e ambiente, foram avaliados. Examinaram-se asas direitas e esquerdas de machos e fêmeas do peridomicílio e do ambiente silvestre. Não foi possível avaliar o ambiente silvestre de todas as localidades, pois o número de amostras requeridas por grupo (infectado e não infectado) foi insuficiente. Em todas as análises, asas esquerdas foram adicionadas como novos indivíduos na tentativa de minimizar o problema do tamanho da amostra e para aumentar o poder estatístico. Os resultados mostraram que os valores de TC variaram entre grupos infectados e não infectados de fêmeas e machos do peridomicílio (Figura 5.21 A e B, respectivamente) e do ambiente silvestre (Figura 5.22 A e B, respectivamente).

As maiores diferenças nos valores médios de TC entre grupos infectados e não infectados foram observadas em fêmeas de SSBE ($TC_{F,Neg} = 9,41972$, $DP = 0,551825$, $TC_{F,Pos} = 9,13033$, $DP = 0,341685$) e em machos de SRS ($TC_{M,Neg} = 8,81958$, $DP = 0,140061$, $TC_{M,Pos} = 8,98831$, $DP = 0,196482$), ambos do peridomicílio (Figura 5.21 A e B). No ambiente SC observou-se maior diferença entre de fêmeas negativas e positivas do BEC ($TC_{F,Neg} = 10,2983$, $DP = 0,270191$, $TC_{F,Pos} = 10,0899$, $DP = 0,496602$). A única população de machos silvestres avaliada foi a do BEC ($TC_{M,Neg} = 9,72575$, $DP = 0,19283$, $TC_{M,Pos} = 9,67297$, $DP = 0,37683$), o qual a sua diferença média de TC se equiparou a machos do peridomicílio de Inácio ($TC_{M,Neg} = 9,31205$, $DP = 0,230277$, $TC_{M,Pos} = 9,27034$, $DP = 0,560643$) (Figura 5.22 A e B). Apesar da observação da variação numérica nos valores de TC, o teste de ANOVA ($F_{F,P} = 6,35$ $df = 7$, $p < 0,0001$; $F_{M,P} = 5,35$, $df = 7$, $p < 0,0001$; $F_{F,S} = 5,48$, $df = 3$, $p = 0,0027$; $F_{M,S} = 0,2958$, $df = 1$, $p < 0,5895$) e o teste de Tukey Kramer ($p < 0,001$) mostraram que as diferenças foram significativas apenas entre populações de localidades distintas e não entre os grupos infectados e não infectados por *T. cruzi* (Figura 5.21 A e B; Figura 5.22 A e B).

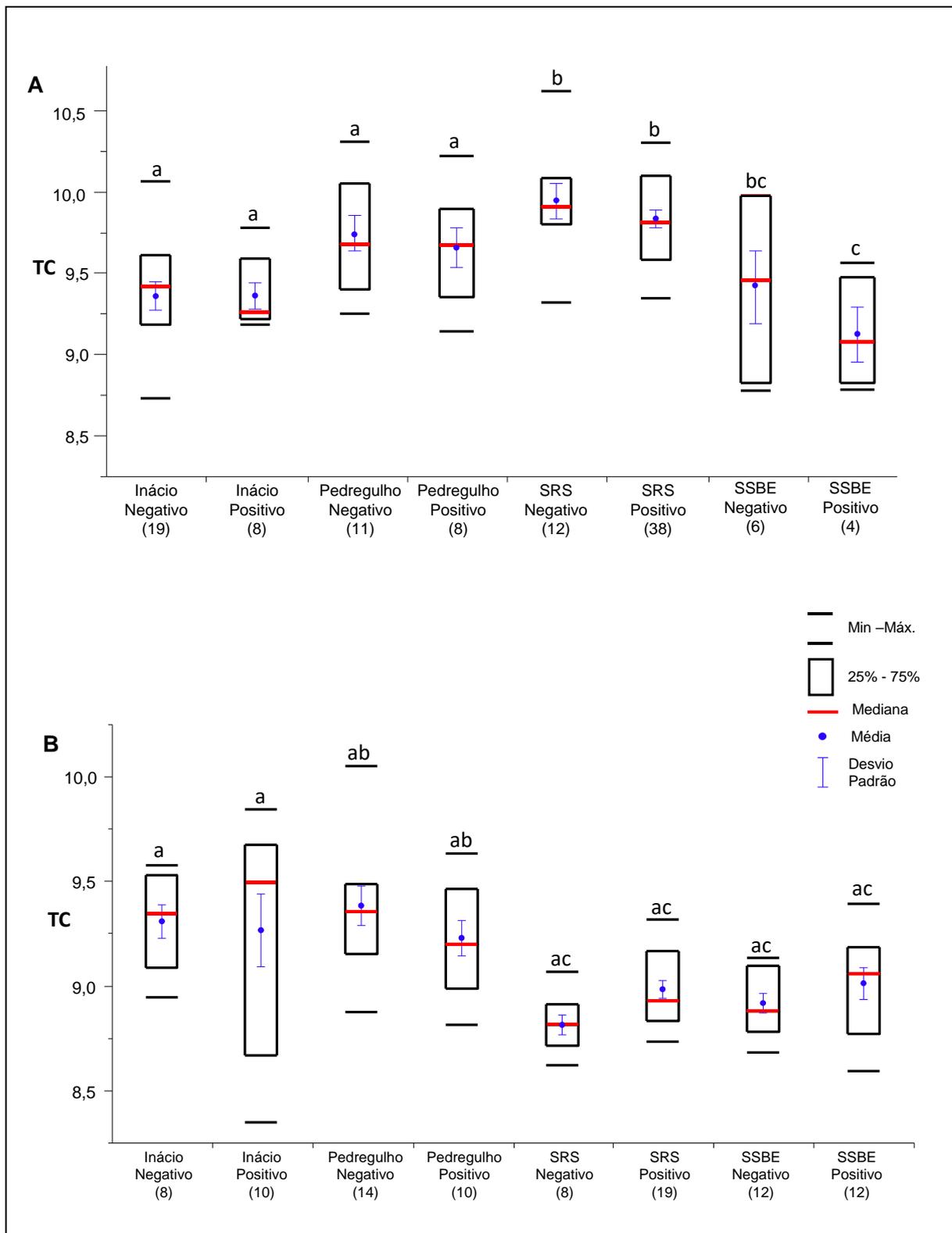


Figura 5.21. Variação do tamanho centroide (TC) das asas de *T. b. brasiliensis* entre grupos infectados e não infectados com *T. cruzi* provenientes das localidades: Inácio, Pedregulho, SRS (Sítio Riacho do Santo) e SSBE (Sítio São Bernardo de Elias). **A.** Fêmeas e **B.** machos do peridomicílio. O número de asas testadas está entre parênteses, letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey-Kramer, $p < 0,001$).

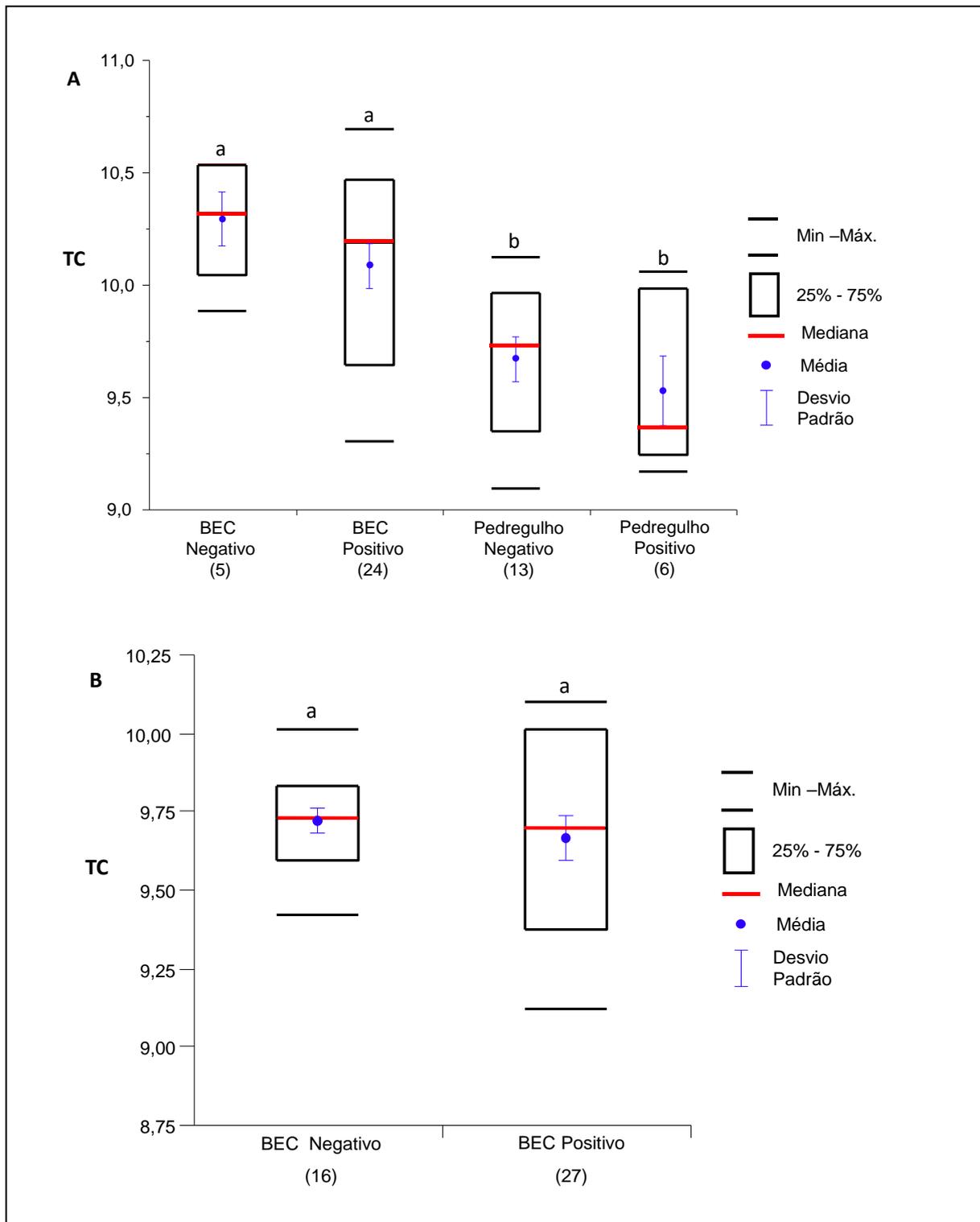


Figura 5.22. Variação do tamanho centroide (TC) das asas de populações de *T. b. brasiliensis* entre grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*, provenientes do ambiente silvestre conservado do BEC (Batalhão de Engenharia de Construção) e do ambiente silvestre modificado de Pedregulho. **A.** Fêmeas e **B.** machos. O número de asas testadas está entre parênteses, letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas (Teste de Tukey-Kramer, $p < 0,001$).

5.5.2. Variação da conformação e alometria

5.5.2.1. Entre sexos, ambientes, localidades e grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*

Sexos – A análise discriminante mostrou que não houve divergência entre machos e fêmeas do peridomicílio da maioria das localidades estudadas, considerando as variáveis de conformação (Figura 5.23B-D). No entanto, observou-se tendência de diferenciação na forma das asas de espécimes da localidade Inácio, onde a projeção dos indivíduos em relação ao fator discriminante 1 (FD1) mostrou sobreposição parcial estatisticamente significativa ($p < 0,05$; 1000 bootstraps), como pode ser visto no histograma da figura 5.23A. Observou-se um leve deslocamento dos machos em direção aos valores negativos e das fêmeas para os valores positivos do plano cartesiano. Os valores do teste de validação cruzada, com base no método de Máxima Verossimilhança (*Maximum likelihood* - MLi), mostraram percentis de reclassificação total de moderado a alto (57-76%), sendo a combinação entre sexos dos espécimes do peridomicílio de Inácio igual a 62% (Tabela 5.10). Quanto a discriminação com base nas distâncias de Mahalanobis (DM), a combinação supracitada foi a que obteve o maior valor (DM=1,4104), sendo a única combinação que apresentou diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste de Lambda de Wilks ($p < 0,03$) (Tabela 5.10).

No que diz respeito aos indivíduos do ambiente silvestre (Figura 5.24A-D), apesar do histograma mostrar a separação completa dos espécimes de Inácio (Figura 5.24A) e da sobreposição parcial dos espécimes do BEC (Figura 5.24B) com base no FD1, as mesmas não foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$; 1000 bootstraps). Entretanto, o teste de validação cruzada MLi mostrou que a combinação de Inácio foi a que obteve o percentual de reclassificação correta mais alto (76%), bem como maior valor de DM (5,0814) em relação aos demais pares, porém a diferença nas DM não apresentaram significância estatística segundo o teste Lambda de Wilks (Tabela 5.11).

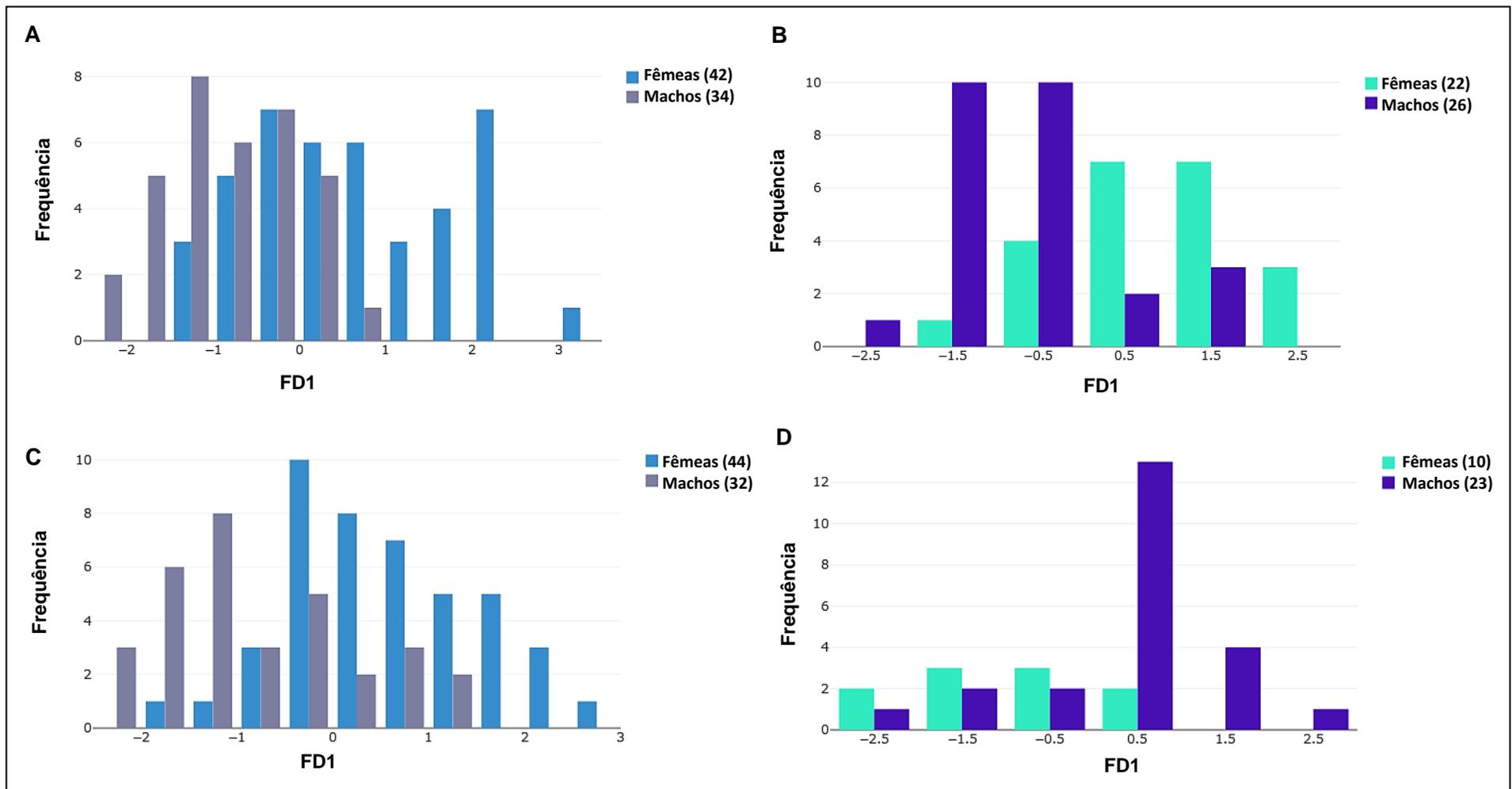


Figura 5.23. Histograma de distribuição dos espécimes de *T. b. brasiliensis*, com base no Fator Discriminante 1 (derivado dos componentes principais) da variação da conformação, resultante da comparação entre as asas de machos e fêmeas do peridomicílio. **A.** Inácio, **B.** Pedregulho, **C.** Sítio Riacho do Santo, **D.** Sítio São Bernardo de Elias. Observar que a sobreposição parcial entre machos e fêmeas de Inácio foi significativa $p < 0,05$ (1000 bootstraps, Zelditch et al 2004).

Tabela 5.10. Resumo da análise discriminante par a par entre machos e fêmeas de populações de *T. b. brasiliensis* do ambiente peridomiciliar das localidades de estudo de

Localidade	Populações (par)	Variável	Validação Cruzada	Distância de Mahalanobis	p-valor
Inácio	Mperi - Fperi	Conformação (4 CPs - 69%)	62% (47/76)	1,4104	<0,03
Pedregulho	Mperi - Fperi	Conformação (8 CPs - 95%)	60% (29/48)	1,3532	>0,12
SRS	Mperi - Fperi	Conformação (3 CPs - 65%)	57%(43/76)	1,4084	>0,23
SSBE	Mperi - Fperi	Conformação (9 CPs - 98%)	76% (25/33)	1,2361	>0,35

Abreviações: Mperi. Machos peridomicílio, Fperi. Fêmeas peridomicílio, CPs. Componentes principais, SRS. Sítio Riacho do Santo, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias. Valor de DM significativo em negrito. As diferenças estimadas pelas distâncias de Mahalanobis foram consideradas significativas ao nível de significância $p < 0,05$ (Teste Lambda de Wilks).

Tabela 5.11. Resumo da análise discriminante par a par entre machos e fêmeas de *T. b. brasiliensis* do ambiente silvestre de algumas localidades de Caicó, RN.

Localidade	Populações (par)	Variável	Validação Cruzada	Distância de Mahalanobis	p-valor
Inácio	Msilv - Fsilv	Conformação (3 CPs - 71%)	76% (16/21)	5,0814	>0,11
Pedregulho	Msilv - Fsilv	Conformação (3 CPs - 68%)	54%(14/26)	1,3315	>0,14
SRS	Msilv - Fsilv	Conformação (8 CPs - 95%)	54% (21/39)	1,1438	>0,21
SSBE	Msilv - Fsilv	Conformação (9 CPs - 98%)	76% (25/33)	1,2361	>0,11
BEC	Msilv - Fsilv	Conformação (8 CPs - 95%)	55% (26/47)	1,2807	>0,12

Abreviações: Msilv. Machos silvestre, Fsilv. Fêmeas silvestre, CPs. Componentes principais, SRS. Sítio Riacho do Santo, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias. As diferenças estimadas pelas distâncias de Mahalanobis foram consideradas significativas ao nível de significância $p < 0,05$ (Teste Lambda de Wilks).

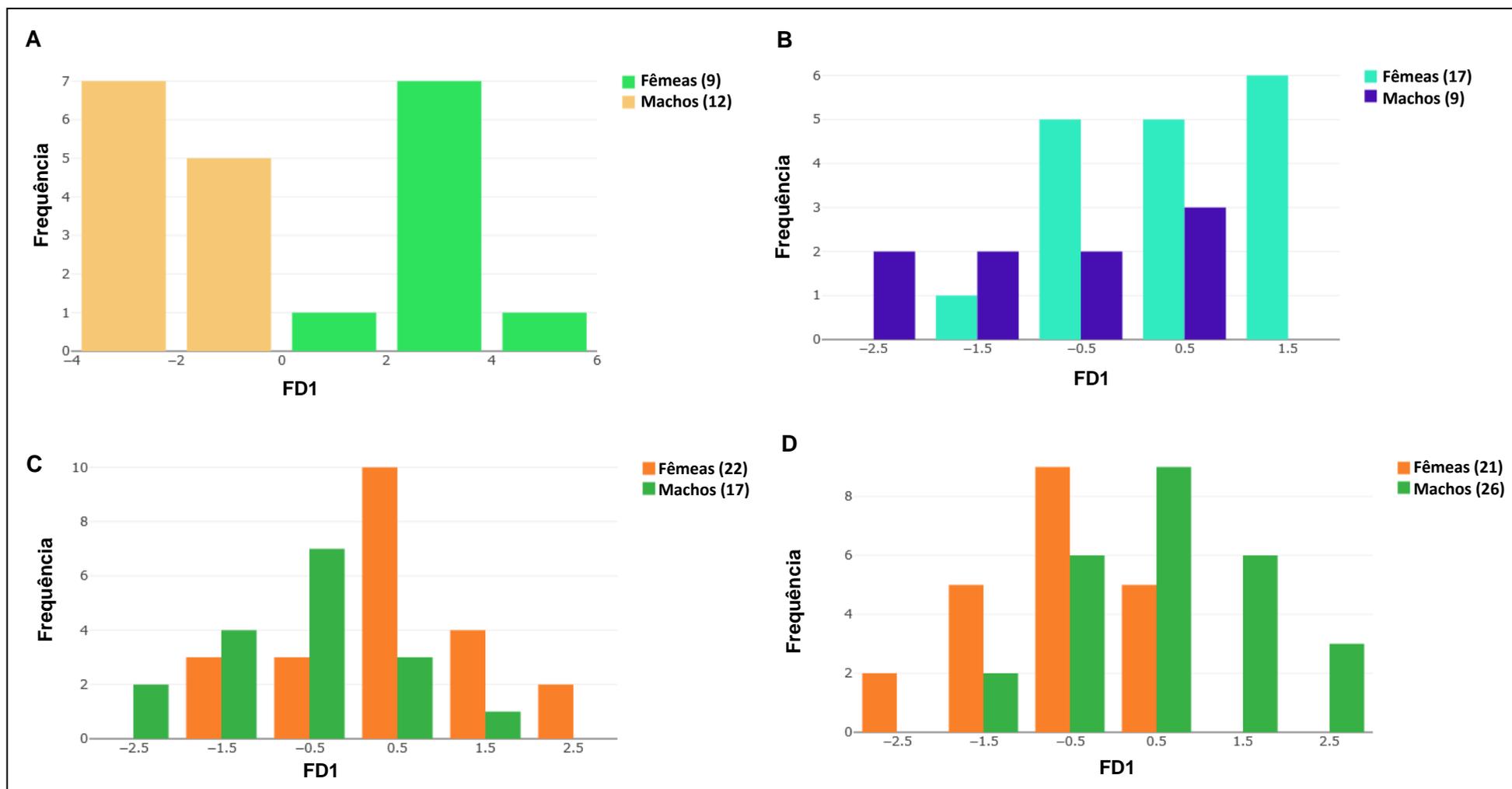


Figura 5.24. Histograma de distribuição dos espécimes de *T. b. brasiliensis*, com base no Fator Discriminante 1 (derivado dos componentes principais) da variação da conformação, resultante da comparação entre as asas de machos e fêmeas do ambiente silvestre (modificado e conservado). **A.** Inácio, **B.** Pedregulho, **C.** Sítio Riacho do Santo e **D.** Batalhão de Engenharia de Construção.

Ambientes - As análises de discriminação entre espécimes do peridomicílio e do ambiente silvestre mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$; 1000 bootstraps) nas populações de Inácio. Pode-se observar no histograma da figura 5.25A um acentuado deslocamento do grupo das fêmeas do peridomicílio em direção aos valores negativos e do grupo das fêmeas do ambiente silvestre em direção aos valores positivos do eixo do FD1, com pouca sobreposição entre eles. Nessa análise, o valor total de reclassificação correta, segundo MLI, foi alto (86%) e o valor da DM foi o segundo mais alto (1,4697) e estatisticamente significativo (teste Lambda de Wilks, $p < 0,01$) (Tabela 5.12). A regressão linear do fator discriminante contra o TC revelou fraca tendência alométrica ($R^2 = 0,022$), sendo o tamanho preditivo de 2,2% da variação de forma da asa. Nas fêmeas de Pedregulho e SRS houve acentuada sobreposição dos grupos e as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$; 1000 bootstraps) (Figura 5.25 B e C). Os percentuais de reclassificação foram moderados e os valores das DM calculados foram 2,2100 e 0,9825, respectivamente, sem significância estatística (Tabela 5.12).

No que se refere aos machos, diferenças estatisticamente significativas, com base no FD1, foram observadas nas populações de Inácio e Pedregulho ($p < 0,05$; 1000 bootstraps). Graficamente, essas diferenças podem ser visualizadas pela sobreposição parcial dos grupos ao longo do eixo FD1 (Figura 5.26 A e B). Corroborando com essa observação, o teste de validação cruzada usando o método MLI mostrou altos valores de atribuições corretas totais, 86% (Inácio) e 71% (Pedregulho). O teste de Lambda de Wilks aplicado às distâncias de Mahalanobis geradas a partir das combinações par a par de machos (peridomicílio-silvestre) das localidades supracitadas ($DM_I = 1,9873$; $DM_P = 1,5759$) mostrou que as distâncias foram significativas tanto para Inácio ($p < 0,02$) quanto para Pedregulho ($p < 0,01$) (Tabela 5.13). A regressão linear não revelou tendência da influência do tamanho na variação da forma da asa dos machos de Inácio ($R^2 = 0,002$) e esta tendência foi muito fraca nos espécimes de Pedregulho ($R^2 = 0,0174$).

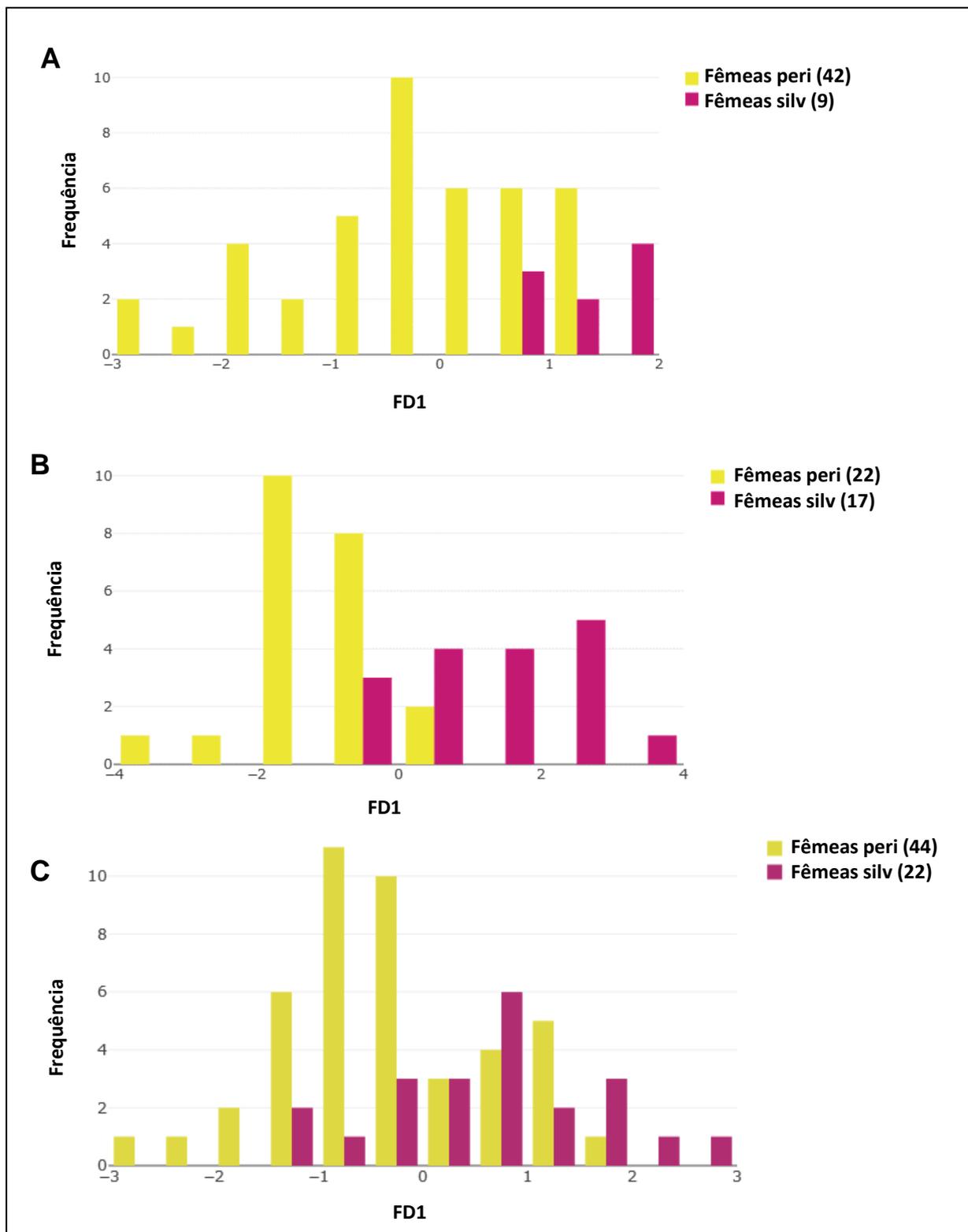


Figura 5.25. Histograma de distribuição de fêmeas de *T. b. brasiliensis*, com base no Fator Discriminante 1 (derivado dos componentes principais) da variação da conformação, resultante da comparação entre as asas de espécimes do peridomicílio e do ambiente silvestre. **A.** Inácio, **B.** Pedregulho, **C.** Sítio Riacho do Santo. Abreviações: Peri. Peridomicílio, silv. silvestre modificado.

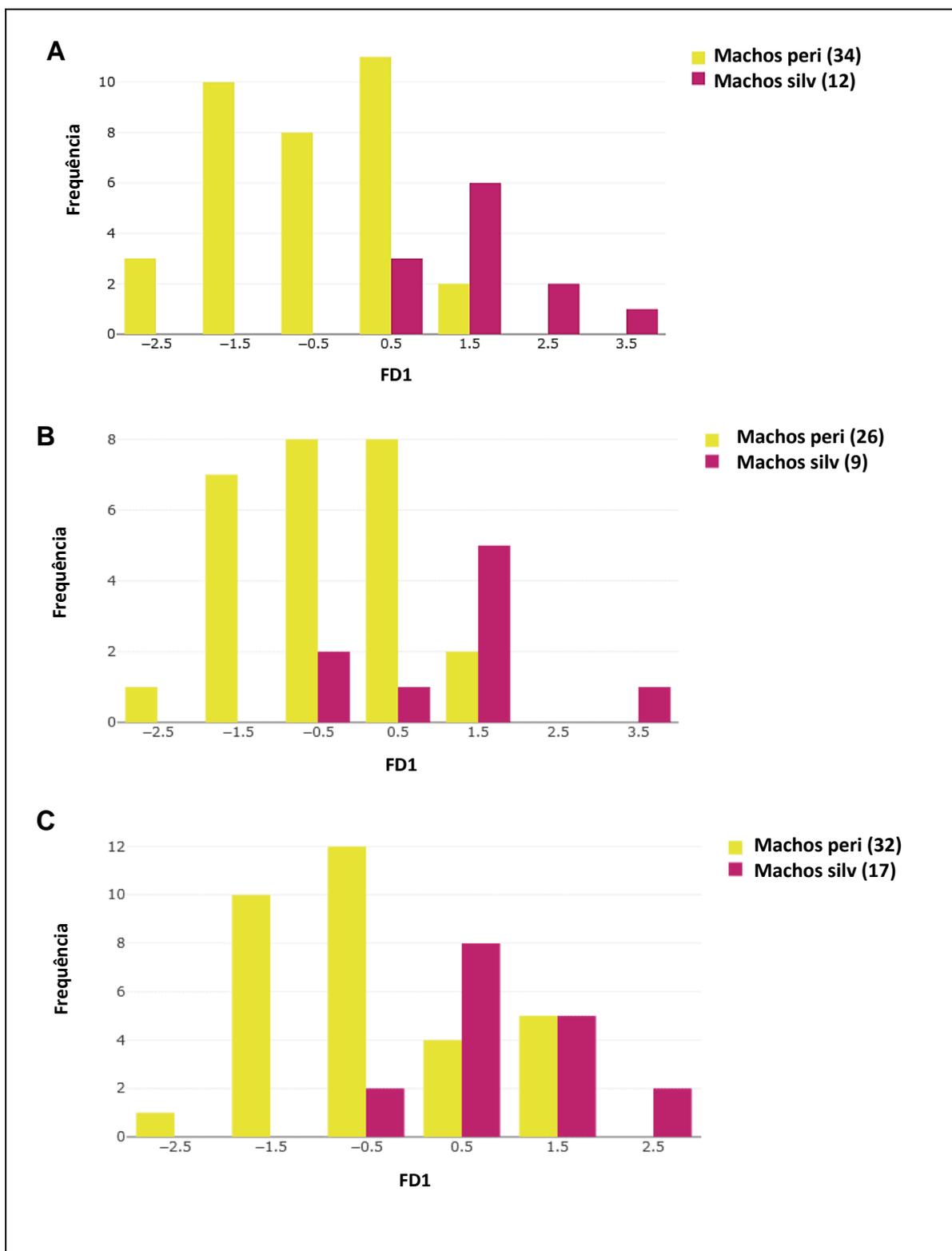


Figura 5.26. Histograma de distribuição de machos de *T. b. brasiliensis*, com base no Fator Discriminante 1 (derivado dos componentes principais) da variação da conformação, resultante da comparação entre as asas de espécimes do peridomicílio e do ambiente silvestre. **A.** Inácio, **B.** Pedregulho, **C.** Sítio Riacho do Santo. Abreviações: Peri. Peridomicílio, silv. silvestre modificado.

Tabela 5.12. Resumo da análise discriminante par a par entre fêmeas de *T. b. brasiliensis* do peridomicílio e silvestres de localidades de Caicó, RN.

Localidade	Populações (par)	Variável	Validação Cruzada	Distância de Mahalanobis	p-valor
Inácio	Fperi - Fsilv	Conformação (6 CPs - 85%)	86% (44/51)	1,4697	<0,01
Pedregulho	Fperi - Fsilv	Conformação (5 CPs - 88%)	62% (24/39)	2,2100	>0,23
SRS	Fperi - Fsilv	Conformação (3 CPs - 88%)	61% (44/66)	0,9825	>0,35

Abreviações: Fperi. Fêmeas peridomicílio, Fsilv. Fêmeas silvestres, CPs. Componentes principais, SRS. Sítio Riacho do Santo. Valor de DM significante em negrito. As diferenças estimadas pelas distâncias de Mahalanobis foram consideradas significativas ao nível de significância $p < 0,05$ (Teste Lambda de Wilks).

Tabela 5.13. Resumo da análise discriminante par a par entre machos de *T. b. brasiliensis* do peridomicílio e silvestres de localidades de Caicó, RN.

Localidade	Populações (par)	Variável	Validação Cruzada	Distância de Mahalanobis	p-valor
Inácio	Mperi-Msilv	Conformação (8 CPs - 94%)	86% (44/51)	1,9873	<0,02
Pedregulho	Mperi-Msilv	Conformação (5 CPs - 88%)	71% (25/35)	1,5759	<0,01
SRS	Mperi-Msilv	Conformação (3 CPs - 88%)	65% (32/49)	1,4234	>0,14

Abreviações: Mperi. Machos peridomicílio, Fsilv. Fêmeas silvestres, CPs. Componentes principais, SRS. Sítio Riacho do Santo. Valor de DM significante em negrito. As diferenças estimadas pelas distâncias de Mahalanobis foram consideradas significativas ao nível de significância $p < 0,05$ (Teste Lambda de Wilks).

Localidade – A figura 5.27 A-D mostra os mapas fatoriais, resultantes da análise discriminante entre localidades, gerados com base na projeção dos espécimes nos eixos correspondentes aos fatores discriminantes 1 e 2 (FD1 e FD2). Houve sobreposição da maioria dos grupos de fêmeas do peridomicílio, não sendo possível visualização de divergências das populações utilizando esses fatores. No entanto, observou-se leve deslocamento do grupo de Pedregulho em direção aos valores negativos do eixo FD1 (Figura 5.27A). A análise de variância entre pares demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre Pedregulho e SSBE ($p < 0,05$; 1000 bootstraps). O teste de validação cruzada empregando o método de reclassificação MLI com base nos em 6 componentes principais (CPs), que descrevem 86% da variação da conformação, indicou porcentagens de atribuições corretas de baixo a moderado (0-64%), sendo que 64% das asas de fêmeas do peridomicílio de Pedregulho foram reclassificadas corretamente (Tabela 5.14). No que se refere as fêmeas silvestres, verificou-se similaridade entre os grupos evidenciadas pela sobreposição dos mesmos no espaço de forma do mapa fatorial (Figura 5.27B). Entretanto, o grupo de Inácio deslocou-se levemente dos demais grupos em direção aos valores positivos do eixo FD1. A divergência deste grupo foi estatisticamente significativa quando comparado ao grupo de Pedregulho ($p < 0,05$; 1000 bootstraps). Entretanto, o percentual de reclassificação para o grupo de Inácio foi baixo 44% (MLi; 7CPs = 91%) (Tabela 5.14).

Quanto aos machos do peridomicílio, observou-se sobreposição parcial entre os grupos (Figura 5.27C). Diferença estatisticamente significativa, no entanto, foi detectada apenas entre o grupo de Pedregulho e Inácio ($p < 0,05$; 1000 bootstraps). Percentual moderado (50%) e baixo (9%) de reclassificação correta foi obtido para as asas de Pedregulho e Inácio, respectivamente. Em relação aos machos do ambiente silvestre, a análise discriminante mostrou sobreposição dos grupos no espaço de forma, não sendo possível a visualização de divergências utilizando os fatores FD1 e FD2 (Figura 5.27D). A análise de variância entre pares mostrou que as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$; 1000 bootstraps) e os valores obtidos no teste de validação cruzada para esses grupos foram baixos (12-31%) (Tabela 5.14). As análises multivariadas revelaram que não há evidências para suportar a estruturação dessas populações.

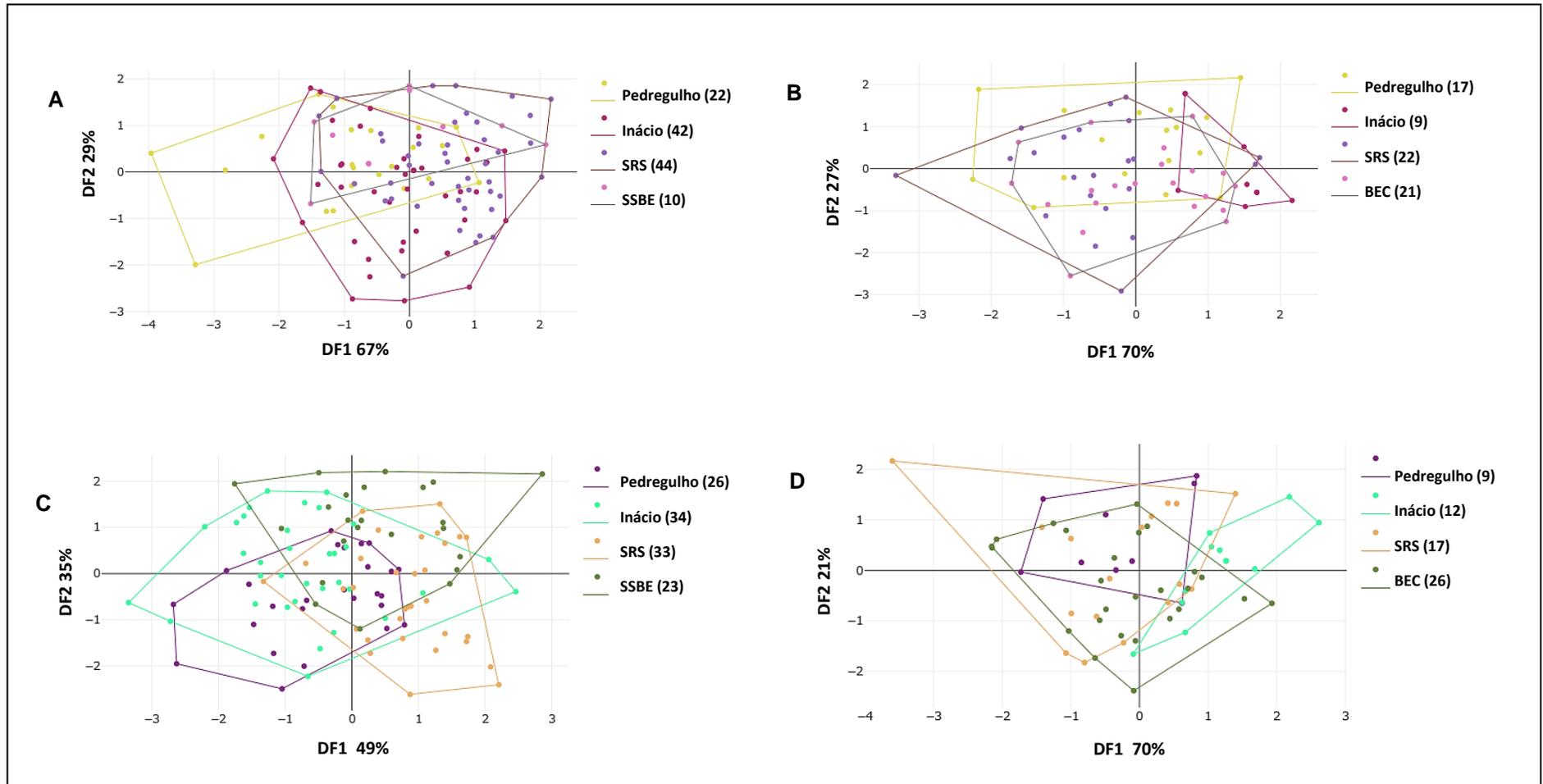


Figura 5.27. Mapas Fatoriais gerados com base nos dois fatores discriminantes da variação da conformação (derivados dos componentes principais das variáveis de conformação) de asas de *T. b. brasiliensis*, resultante da comparação dos grupos entre localidades. **A.** fêmeas peridomicílio, **B.** fêmeas silvestres, **C.** machos peridomicílio e **D.** machos do ambiente silvestre. Os polígonos coloridos representam a localidade de origem das populações e os pontos representam os espécimes. O número de espécimes testados está entre parênteses. Abreviações: SRS. Sítio Riacho do Santo, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção.

Tabela 5.14. Teste de classificação validada empregando o método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood- MLI*), com base nos primeiros componentes principais das variáveis de conformação, para espécimes de *T. b. brasiliensis* entre as localidades de estudo de Caicó, RN.

Populações	Variável	Localidades					Total
		Ped	Inácio	SRS	SSBE	BEC	
Fêmeas peridomicílio	Conformação (6 CPs - 86%)	64% (14/22)	45% (19/42)	36% (16/44)	0% (0/10)	-	42% (49/118)
Fêmeas silvestre	Conformação (7 CPs - 91%)	47% (8/17)	44% (4/9)	50% (11/22)	-	29% (6/21)	42% (29/69)
Machos peridomicílio	Conformação (11 CPs - 98%)	50% (13/26)	9% (3/34)	72% (23/32)	30% (7/23)	-	40% (46/115)
Machos silvestre	Conformação (8 CPs - 94%)	22% (2/9)	33% (4/12)	12% (2/17)	-	31% (8/26)	25% (16/64)

Abreviações: CPs. Componentes Principais, Ped. Pedregulho, SRS. Sítio Riacho do Santo, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias e BEC. Batalhão de Engenharia de Construção.

Infecção natural por *T. cruzi* - Aplicou-se a análise discriminante nos grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*, separados por sexo e proveniente do mesmo ambiente e localidade, para testar sua discriminação com base nos FD1 e FD2. Gráficamente, observou-se sobreposição quase completa para grupos positivos e negativos em todos os ambientes das localidades analisadas. Curiosamente, grupos de fêmeas negativas e positivas do peridomicílio de Pedregulho apresentaram tendência de separação, evidenciada pela pouca sobreposição dos polígonos no espaço de forma do mapa fatorial (Figura 5.28A), no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$, bootstraps). O teste de validação cruzada MLI (6 CPs = 82%) revelou que os percentuais de reclassificação corretos variaram de baixo a alto (0-75%), sendo o percentual de fêmeas positivas de 75% e o de fêmeas negativas 25% para aquela localidade (Tabela 5.15). Com relação as análises dos machos do peridomicílio, observou-se sobreposição total entre grupos positivos e negativos, sem significância estatística das diferenças ($p > 0,05$, bootstraps), exceto entre grupos de localidades diferentes (Inácio e SRS; $p < 0,05$, bootstraps) (Figura 5.28B). Os percentuais de atribuições corretas variaram de baixo a moderado (7-58%) (MLi 7CP = 82%) (Tabela 5.15). As análises das fêmeas silvestres foram realizadas apenas para as localidades Pedregulho e BEC e essas também mostraram sobreposição quase total entre

grupos positivos e negativos, e as diferenças não foram estatisticamente significativa ($p > 0,05$, bootstraps), mas sim entre localidades (Pedregulho e BEC; $p < 0,05$, bootstraps) (Figura 5.28C). Os valores da reclassificação cruzada variaram de 17-63% (MLi 3CPs = 63%). Ao aplicar a análise de agrupamento pelo método de ligação simples (*single linkage*), com base nas DM, observou-se que, tanto nas fêmeas como nos machos do peridomicílio e nas fêmeas do ambiente silvestre, os grupos negativos e positivos tiveram menores valores de DM (foram mais similares na morfologia) entre si do que entre grupos de outras localidades (Figura 5.29A-C). As análises realizadas no presente estudo evidenciaram não haver diferenças entre grupos positivos e negativos de *T. b. brasiliensis* das localidades estudadas de Caicó.

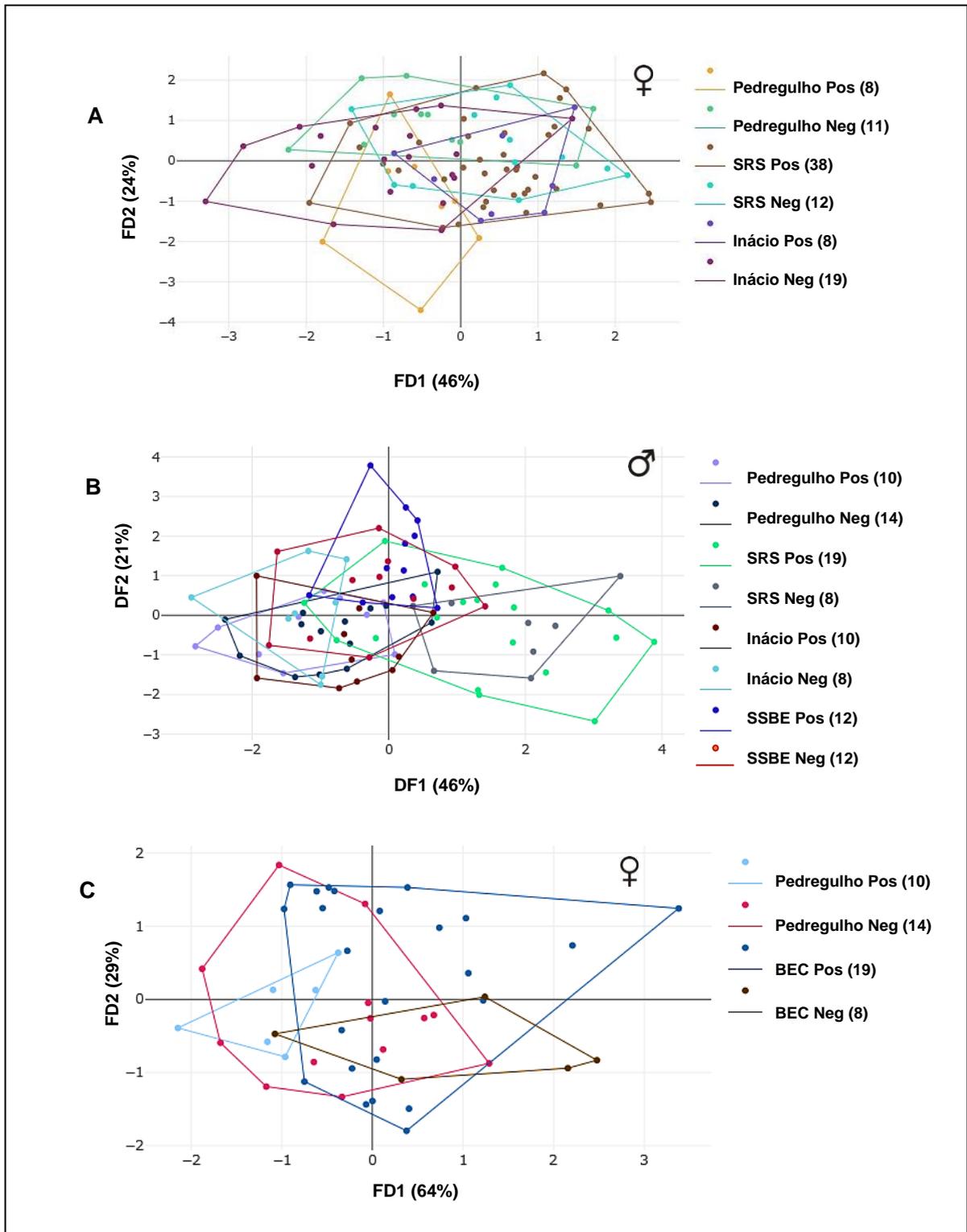


Figura 5.28. Mapas Fatoriais gerados com base nos dois fatores discriminantes da variação da forma (FD1 e FD2) de asas de *T. b. brasiliensis*, mostrando a distribuição dos grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*. **A.** fêmeas e **B.** machos do peridomicílio e **C.** fêmeas do ambiente silvestre. Os polígonos coloridos representam a localidade de origem das populações e os pontos representam os espécimes. O número de espécimes testados está entre parênteses. Abreviações: Pos. positivos, Neg. negativos, SRS. Sítio Riacho do Santo, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção.

Tabela 5.15. Reclassificação validada empregando o método de Máxima Verossimilhança, com base nos primeiros componentes principais da conformação, para espécimes de *T. b. brasiliensis* do peridomicílio e do ambiente silvestre entre grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*, conforme resultados da PCR.

Populações	Variável	Grupos infectados e não infectados por <i>T. cruzi</i>									
		Ped Pos	Ped Neg	SRS Pos	SRS Neg	Inacio Pos	Inácio Neg	SSBE Pos	SSBE Neg	BEC Pos	BEC Neg
Fêmeas peridomicílio	Conformação (6 CPs - 82%)	75% (6/8)	27% (3/11)	29% (11/38)	0% (0/12)	0% (0/8)	5% (0/19)	-	-	-	-
Machos peridomicílio	Conformação (7 CPs - 82%)	20% (2/10)	7% (1/14)	53% (10/19)	25% (2/8)	20% (2/10)	13% (1/8)	42% (5/12)	58% (7/12)	-	-
Fêmeas silvestre	Conformação (3 CPs - 63%)	17% (4/6)	31% (4/13)	-	-	-	-	-	-	63% (15/24)	20% (1/5)
Machos silvestre	Conformação (7 CPs - 86%)	-	-	-	-	-	-	-	-	70% (19/27)	38% (6/16)

Abreviações: CPs. Componentes principais, Ped. Pedregulho, SRS. Sítio Riacho do Santo, SSBE. Sítio São Bernardo de Elias, BEC. Batalhão de Engenharia de Construção, Pos. Positivo, Neg. Negativo.

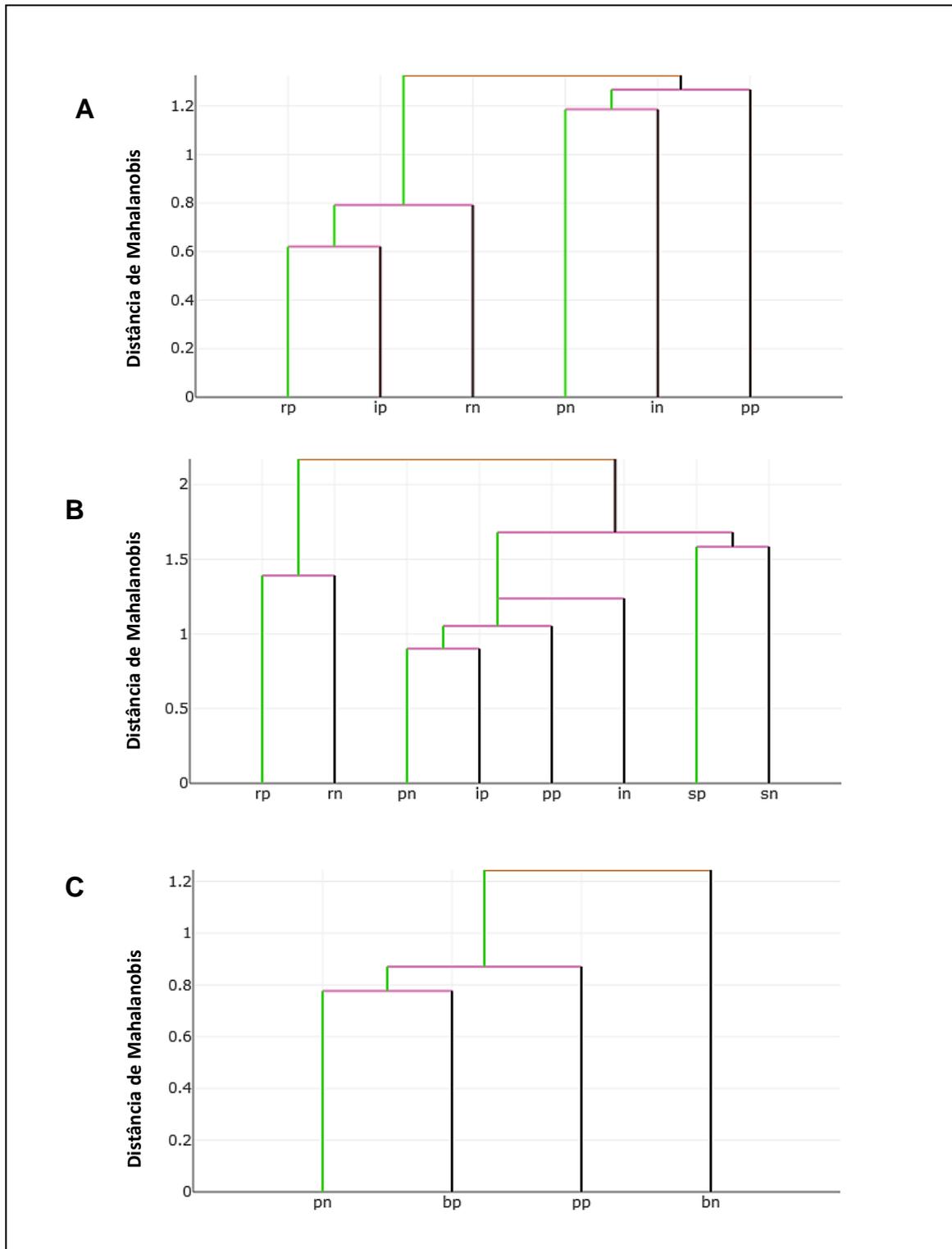


Figura 5.29. Gráfico em árvore de similaridade morfológica gerado pelo método de ligação simples (*single linkage*), com base nos valores das distâncias de Mahalanobis obtidas na análise discriminante, para testar a separação de grupos de *T. b. brasiliensis* quanto a infecção natural por *T. cruzi*. **A.** Fêmeas peridomicílio, **B.** Machos peridomicílio, **C.** Fêmeas silvestres. Abreviações: ip (Inácio positivo), in (Inácio negativo), pp (Pedregulho positivo), pn (Pedregulho negativo), rp (SRS positivo), rn (SRS negativo), bp (BEC positivo), bn (BEC negativo), sp (SSBE positivo), sn (SSBE negativo).

6. DISCUSSÃO

6.1. Captura de triatomíneos e fauna observada

No estado do RN, quando o PCDCCh se iniciou na década de 1970 nas áreas endêmicas, *Triatoma b. brasiliensis* já era a subespécie majoritariamente capturada no ambiente antrópico em 1959 (Lucena 1959). O sucesso do programa em nível nacional é inquestionável e seus resultados positivos foram observados também no RN. O controle vetorial, entretanto, sempre foi realizado de forma descontínua neste estado. Entre as principais dificuldades no combate aos triatomíneos estão a falta de recursos, prioridade para áreas de alto e médio risco de infecção por *T. cruzi*, questões político-administrativas e emergência ou reemergência de arboviroses como Dengue, Zika, Chikungunya e zoonoses como a Leishmaniose visceral canina (FUNASA 1996, Barbosa-Silva, 2017). Os fatores descritos acima associados ao fato de *T. b. brasiliensis* ser um vetor autóctone cujo centro de origem e dispersão é a Caatinga (Forattini 1980) expõem algumas dificuldades na manutenção do controle deste vetor. Tais fatores explicam em parte a recorrência das infestações das UD's, presentes neste bioma, reportadas aqui e em outros estudos (Silveira e Vinhaes 1999, Costa et al 2003a, Sarquis et al 2006, Silva et al 2012, Barbosa-Silva, 2017, Lilio et al 2017, Bezerra et al 2018).

Os resultados das investigações de campo realizadas no presente estudo, referentes ao número absoluto de triatomíneos, mostraram que *T. b. brasiliensis* (95,2% - 1092/1147) foi o vetor mais capturado seguido de *T. pseudomaculata* (4,6% - 53/1147), concordando com resultados obtidos para outros municípios do RN (Barbosa-Silva et al 2016), porém mostrando diferenças nas proporções dessas dois triatomíneos, ao se comparar com os dados secundários da SESAP-RN (2005-2015) em nível estadual (Barbosa-Silva, 2017). Em várias áreas semiáridas do nordeste, *Triatoma b. brasiliensis* tem sido mais abundante que *T. pseudomaculata*, como em: Jaguaruana-CE (*T. b. brasiliensis* n=2.204, *T. pseudomaculata* n=340) (Sarquis et al 2006), áreas da Caatinga no Piauí (*T. b. brasiliensis* 65%, *T. pseudomaculata* 28%) (Gurgel-Gonçalves et al 2010) e Russas-CE (*T. b. brasiliensis* 77,1%, *T. pseudomaculata* 19,8%) (Coutinho et al 2014). No entanto, *T. pseudomaculata* pode, em alguns casos, superar *T. b. brasiliensis* em número em algumas partes do CE como a região do Cariri (Freitas et al 2007, Gonçalves et al 2009, Sousa 2016) e em PE (Silva et al 2012). Nesta expedição de campo, capturamos um exemplar de *T. petrocchia* adulto no interior de uma casa desabitada, o que indica um

comportamento invasor. Esta observação está de acordo com as observações realizadas em outros estudos em que se registrou a ocorrência não só episódios de invasão (Costa et al 2003a, Silva et al 2012, Barbosa-Silva 2017), mas também de indícios de colonização (Lilioso 2015, Barbosa-Silva 2017).

No presente estudo, a pesquisa entomológica evidenciou alta capacidade de colonização das populações *T. b. brasiliensis* em algumas habitações humanas vistoriadas nas área estudadas, fato este constatado não só por ser a única espécie a qual foram encontradas formas imaturas, 37,5% (6/15), no interior das casas, mas especialmente pela predominância de ninfas capturadas no peridomicílio 75,3% (581/772) em relação aos adultos (24,7% - 191/772), indicando colonização eficaz conforme também observado por Lilioso et al (2017) em outro município do RN (Currais Novos) e por Sousa (2016) na região do Cariri (CE). Apesar do percentual de ninfas de *T. pseudomaculata* ser superior (88,7% - 47/53) ao de *T. b. brasiliensis* (75,3% - 581/772) no peridomicílio, observou-se que as colônias deste último vetor foram mais numerosas neste ambiente, com a captura de até 176 espécimes em um único curral de boi de uma só vez.

Apesar da análise dos dados da SESAP-RN (2005-2015) mostrarem que *T. pseudomaculata* pode ser tão prolífico quanto *T. b. brasiliensis* no peridomicílio das UDs de várias áreas do RN, com números de ninfas capturadas no peridomicílio tecnicamente equivalentes (6.394 e 6.048, respectivamente) (Barbosa-Silva 2017), nossa pesquisa mostrou que em nível local, a densidade e dispersão desses vetores podem variar. *Triatoma b. brasiliensis* foi a espécie presente nas UDs pesquisadas das 18 localidades listadas, enquanto *T. pseudomaculata* foi encontrado apenas em três delas. Verificou-se também que *T. b. brasiliensis* foi o vetor distribuído em todos os ambientes pesquisados: intradomicílio, peridomicílio e silvestre (57%-174/305 de ninfas), ocupando uma maior diversidade de ecótopos (9 ecótopos), enquanto *T. pseudomaculata* foi capturado apenas no peridomicílio em 2 ecótopos (cerca de madeira e telhado do galinheiro). Embora esses dados indiquem diferenças do potencial vetorial dessas espécies, ressaltamos a importância da manutenção dos investimentos no controle vetorial e a constante vigilância destes vetores nestes locais.

O peridomicílio das UDs é propício para triatomíneos, pois dispõe de inúmeros abrigos para hospedeiros, animais domésticos e sinantrópicos, os quais podem ser mais favoráveis ao seu desenvolvimento do que os do ambiente silvestre (Cecere et

al 2004). Mesmo entre habitats do peridomicílio há variações microclimáticas e diferenças na oferta de alimento que os tornam mais atrativos do que outros para o estabelecimento de colônias (Schofield 2000, Vasquez-Prokopec et al 2002). Nossas investigações entomológicas mostraram a presença de *T. b. brasiliensis* em uma diversidade de estruturas artificiais e naturais do peridomicílio, em sua maioria associados a vertebrados, pelo menos, em um período do dia, conforme nossas observações noturnas *in loco*. Essas observações estão de acordo com Lazzari (1992), que afirma que as atividades noturnas de alimentação desses insetos são reconhecidas como estratégias para evitar a sua detecção pelo hospedeiro. Diferentemente do observado por Lillioso (2015) e Sarquis et al (2012), que reportaram maior espécimes capturados em galinheiros e pilhas de madeira, respectivamente, nossos resultados mostraram que, no peridomicílio das UD's estudadas, a maioria dos espécimes foi coletada nos serrotes (cercas de pedras) que compunham os currais de boi (n=600). Aqui chamamos atenção para o fato dos serrotes serem estruturas peridomiciliares permanentes usualmente conectadas às cercas de pedras que delimitam as propriedades no ambiente silvestre, favorecendo o fluxo de espécies (triatomíneos e roedores) entre os ecótopos silvestres e domiciliares.

Desde o início da colonização, a sobrevivência das famílias nas áreas semiáridas do RN necessitou de constante adaptação aos períodos de secas severas do sertão, assim, não é raro observar no sertão do Seridó a criação semiextensiva de cabras, carneiros e bovinos (Figura 5.5 A-C). No período de seca, de junho a dezembro (Figura 4.2), principalmente, os pecuaristas confinam os animais (especialmente com filhotes) e complementam a sua alimentação com ração misturada com água ou o cacto conhecido como palma (*Opuntia cochenillifera*) (Figura 5.5C), devido à escassez de água e vegetação nativa para pastagem. Essa prática pode facilitar a interação triatomíneo-hospedeiro tal como observamos com os bovinos, os quais podem estar servindo de fonte alimentar para manter numerosas colônias de *T. b. brasiliensis* no peridomicílio, conforme sugerido por Walter et al (2005). Como mencionado acima, na localidade Inácio, por exemplo, em uma única pesquisa de 30 minutos foi possível capturar 176 espécimes em um curral de boi.

Outro aspecto que merece destaque é o aumento de relatos do roedor *K. rupestris* (mocó) nas proximidades das habitações humanas. Em outro município

(Currais Novos) situado na microrregião Seridó Oriental (Figura 4.1), esse cavídeo não só tem sido observado visitando ocasionalmente o peridomicílio na presença de humanos, como também está sendo criado pela população local (Lilioso 2015). *Kerodon rupestris* é um roedor herbívoro endêmico do bioma Caatinga, alimenta-se de brotos e cascas de árvores, ocupando conglomerados rochosos para descanso, reprodução e proteção contra predação (Animal Diversity Web, 2017). Tradicionalmente, sua carne é muito apreciada pela população sertaneja, o que levou esse roedor ser alvo de caça intensa (Alves et al 2009). Durante nossas inspeções nas UD's, vários moradores relataram visitas deste roedor no peridomicílio e, em um caso particular, constatamos um ambiente propício para instalação desse cavídeo. Um afloramento rochoso situado no peridomicílio foi cercado por estacas de madeira, no seu interior foi construído um abrigo, usando também estacas de madeira e uma cobertura de palha para a criação confinada de suínos (Figura 4.4D). Nestas circunstâncias, se ocorrer o compartilhamento do mesmo ecótopo pelo mocó, apontado como potencial reservatório de *T. cruzi* (Roque e Jansen 2014, Almeida et al 2016) e suínos, animal doméstico sugerido como importante para o ciclo de transmissão de *T. cruzi* no peridomicílio de outras áreas (Valente et al 1998), poderia favorecer o ciclo de transmissão de *T. cruzi* entre os mocós, suínos e *T. b. brasiliensis* neste local. Portanto, investigações são necessárias para esclarecer o papel dos porcos domésticos como reservatórios ou sentinelas na área estudada (Roque e Jansen 2008, Roque et al 2008).

Vale a pena mencionar que, além dos fatores socioeconômicos e culturais citados, o fator ambiental provavelmente está influenciando na dinâmica de transmissão de *T. cruzi* na área de estudo. O município de Caicó está localizado na região do Seridó (microrregião do Seridó Ocidental), a qual está sendo afetada por um processo intenso de desertificação (Figura 4.1 e Figura 6.1) (MMA, 2007). Este fenômeno, observado no Brasil desde a década de 1970 por Vasconcelos Sobrinho, é causado, principalmente, por atividades antrópicas que levam ao desmatamento da Caatinga para dar lugar a agricultura e a pecuária, retirada de madeira para produção de lenha e carvão, mineração e extração de argila de solos aluviais. O processo de desertificação resulta em áreas com solos degradados com altos níveis de salinização, levando à infertilidade do solo, à erosão acentuada e à perda da biodiversidade (fauna e flora) (Leal et al 2005, MMA 2007).

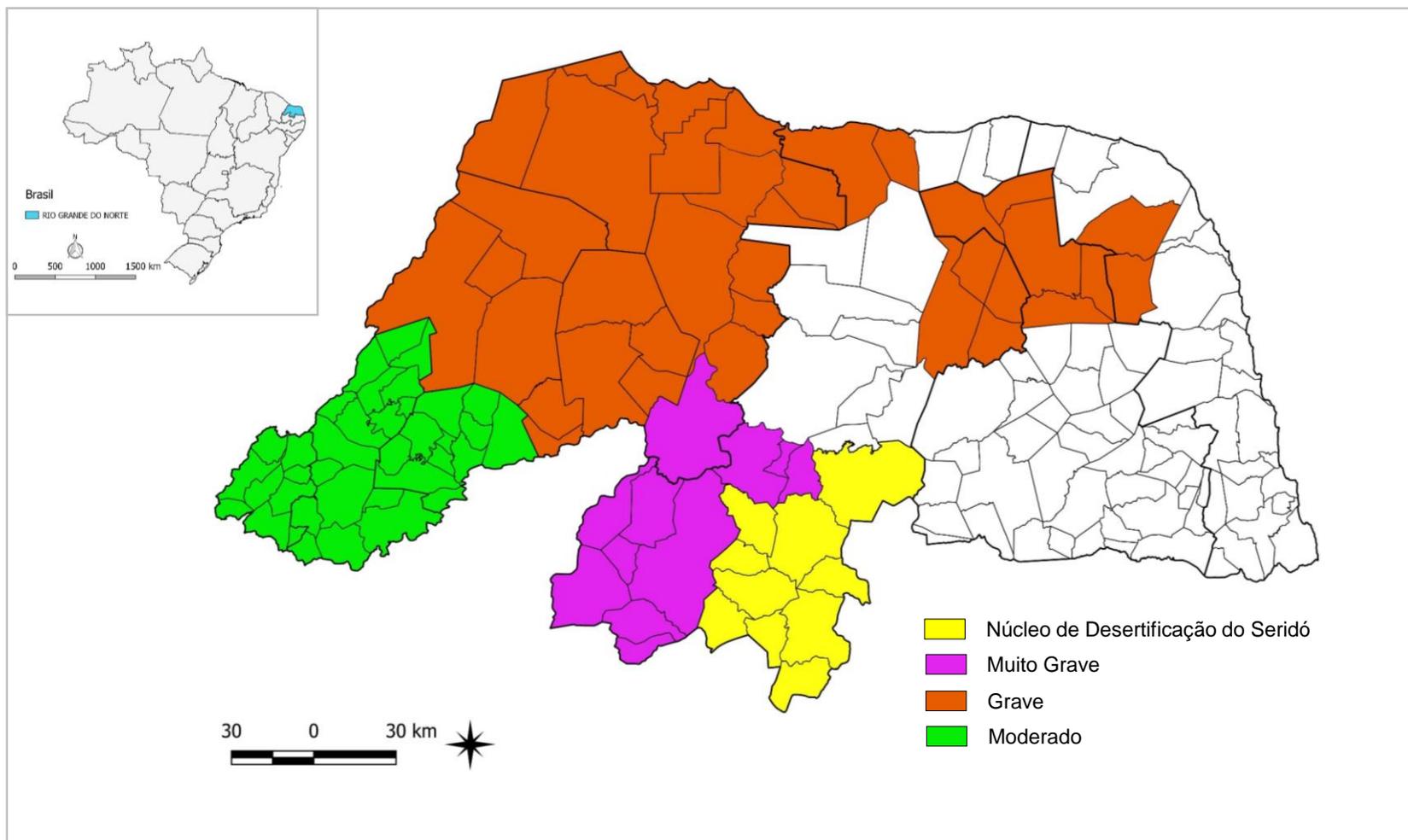


Figura 6.1. Caracterização das áreas de ocorrência de desertificação no estado do Rio Grande do Norte. Núcleo de Desertificação do Seridó: desertificação de áreas degradadas pela extração de argila e pelo uso da terra para o cultivo de algodão que, posteriormente, foi abandonada (MMA 2007). Fonte do mapa: adaptado de Carvalho, Gariglio e Barcellos, 2000. Geoprocessamento: a autora

Em 2008, Marengo afirmou que, no contexto das mudanças climáticas, estima-se que nos próximos anos a frequência e intensidade das secas iriam aumentar nas áreas semiáridas e a disponibilidade de recursos hídricos diminuiria, as quais afetariam a nutrição, o saneamento e a saúde da população local. Em 2015, foi registrada no RN a pior seca dos últimos 100 anos, dos 167 municípios 153 ficaram em estado de emergência por falta de chuvas, inclusive Caicó cujas barragens atingiram baixos níveis (Barbosa et al 2015).

Diante deste cenário, o fator ambiental não só pode influenciar o comportamento humano (migrações, implementação de técnicas de agropecuária que mitiguem os efeitos da seca como a criação semiextensiva de bovinos, entre outros) e do vetor (dispersão para ecótopos que proporcionem maior conforto térmico, acesso a alimentação, etc), mas também da fauna de vertebrados silvestre que pode estar em um processo incipiente de sinantropia, tais como *K. rupestris*, que vem aproximando-se cada vez mais das UD's em busca de água, alimento e habitats para reprodução. Esta situação ficou evidente quando registramos uma população deste cavídeo, em um afloramento rochoso a ~ 20-50m de uma casa na localidade Inácio, a qual não se assustou com a nossa presença, permitindo-se fotografar (Figura 5.6 A e B). Assim, em um cenário de perda da diversidade de espécies de mamíferos, as espécies que resistem a degradação de habitats podem tornar-se amplificadoras da transmissão de *T. cruzi* (Schmidt e Ostfeld 2001). Esta possível mudança de comportamento de *K. rupestris* pode implicar no aumento da taxa de infecção natural por *T. cruzi* de populações de *T. b. brasiliensis*, como as reportadas no presente estudo e por outros autores (Lilioso et al 2017), não só de ecótopos silvestres preservados (Almeida et al 2016), mas também do peridomicílio das UD's da nossa área de estudo onde *T. b. brasiliensis* se reproduz abundantemente. Esta conjectura poderia explicar, em parte, a maior incidência deste parasito nos municípios da região do Seridó do RN, no período de 2005-2015, conforme verificamos ao fazer uma avaliação espacial e temporal de triatomíneos (Figura 6.2) e do parasito *T. cruzi* (Figura 6.3) com base nos índices de infestação e de infecção natural revelados pelos dados da vigilância entomológica da SESAP-RN. Adicionalmente, além das altas taxas de infestação de *T. b. brasiliensis* nas UD's da região do Seridó, em um cenário de mudanças climáticas, o vetor mais provável para colonizar novas áreas, entre os membros do complexo de espécies *T. brasiliensis*, é a subespécie *T. b. brasiliensis*.

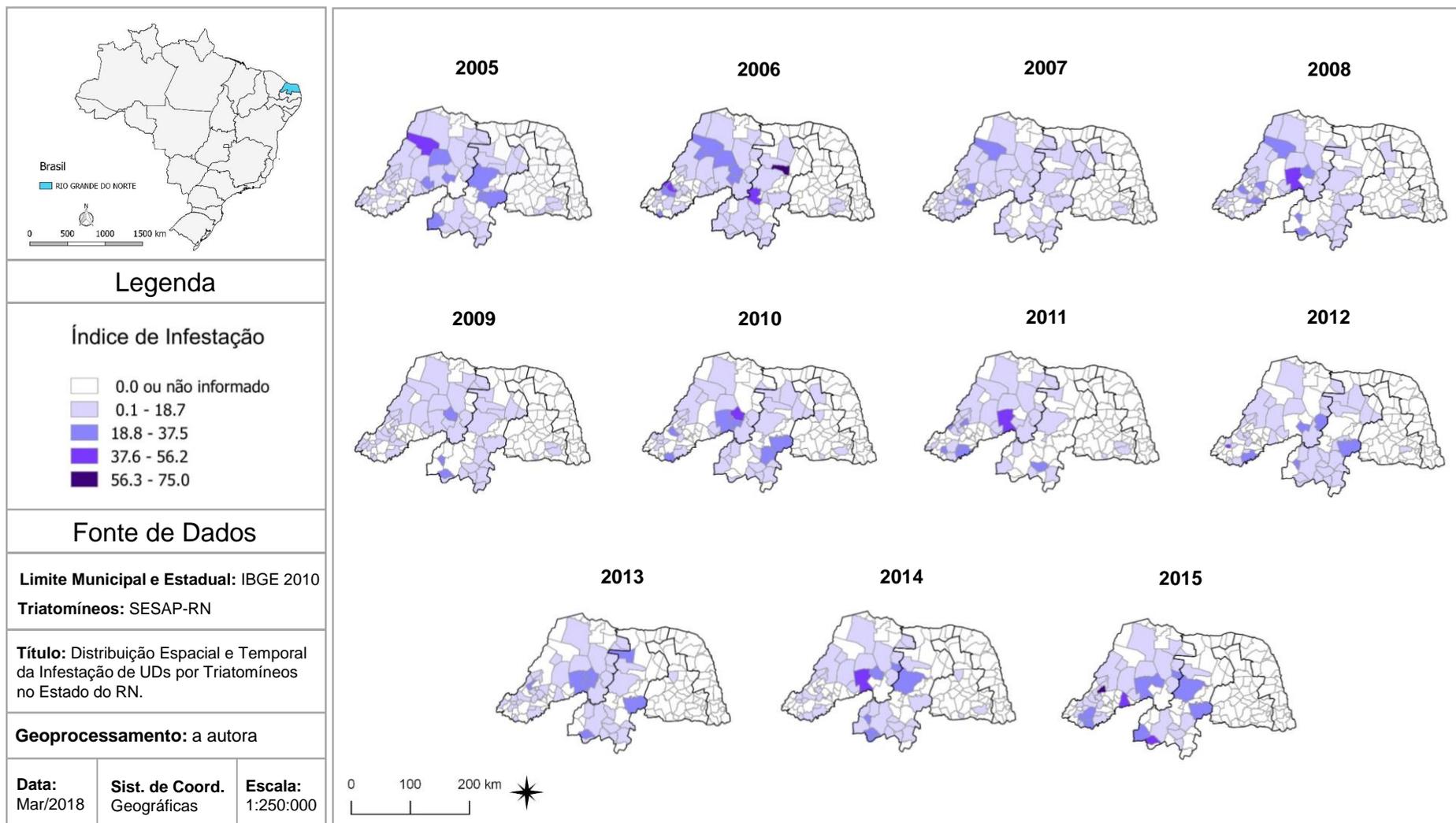


Figura 6.2. Distribuição espacial e temporal de triatomíneos (*T. b. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. petrocchia*, *P. lutzi* e *R. nasutus*) no estado do Rio Grande do Norte com base nos dados fornecidos pela SESAP-RN no período de 2005-2015.

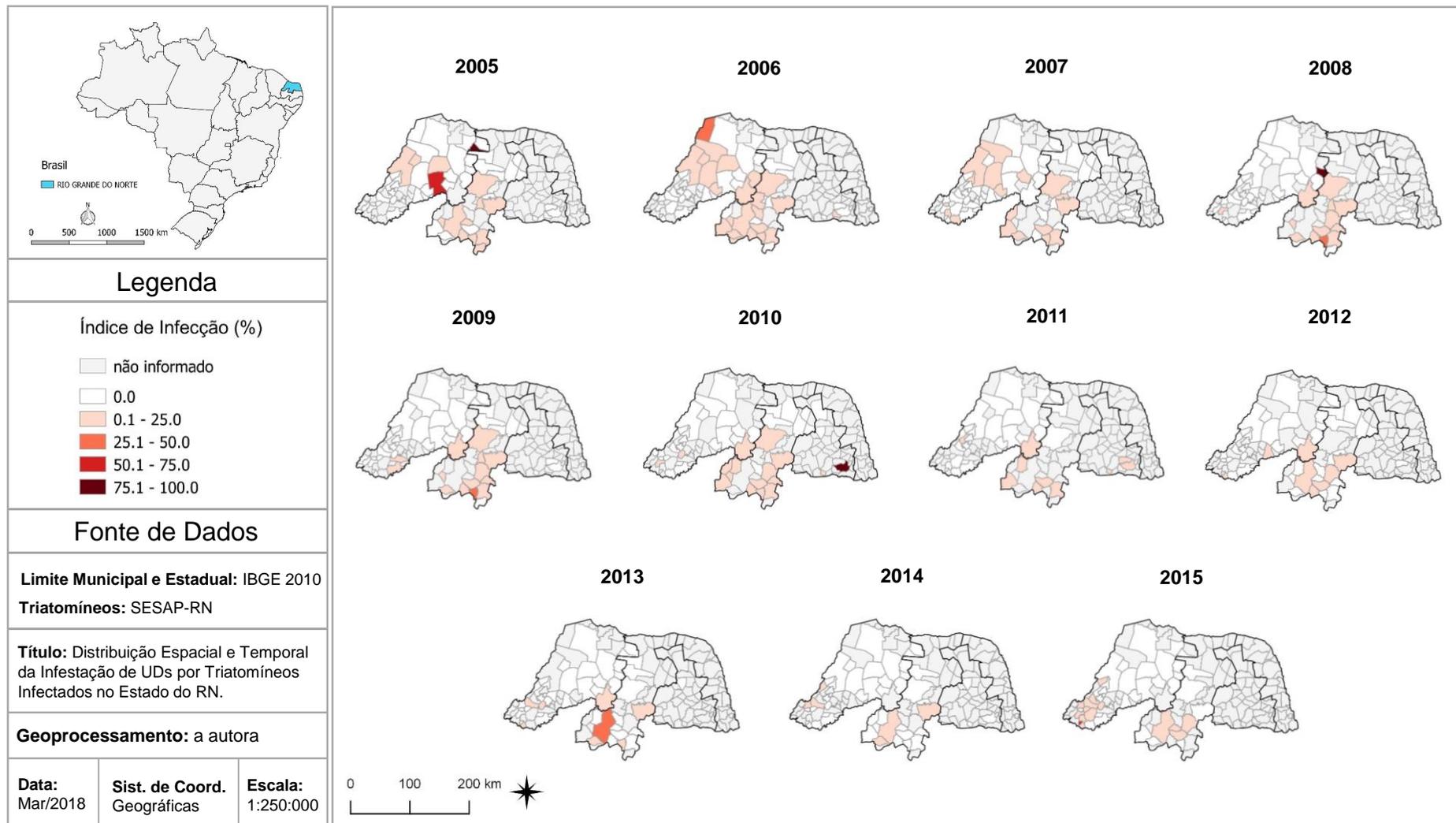


Figura 6.3. Distribuição espacial e temporal de triatomíneos (*T. b. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. petrocchia*, *P. lutzi* e *R. nasutus*) infectados por *T. cruzi* no estado do Rio Grande do Norte com base nos dados fornecidos pela SESAP-RN no período de 2005-2015.

Projeções da modelagem de nicho ecológico para o período 2020-2050 sugerem que este triatomíneo poderia encontrar condições adequadas na parte central do cerrado, em Tocantins e Goiás, noroeste de Minas Gerais e oeste da Bahia (Costa et al 2014).

6.2. Infecção Natural por *T. cruzi*, fonte alimentar identificada e caracterização molecular de *T. cruzi*

Neste trabalho, a detecção de *T. cruzi* foi realizada, em sua maioria, utilizando amostras de extratos do conteúdo intestinal de *T. b. brasiliensis* (dissecção do tubo digestório médio e posterior), a fim de evitar a perda da sensibilidade da MO, realizando a análise dos flagelados presentes em diferentes compartimentos do tubo digestório do vetor conforme sugerido por Dorn et al (1999). Entretanto, 57 ninfas de 4^o e 5^o estádios tiveram suas fezes e urina coletadas espontaneamente após a primeira alimentação (Figura 4.7D), as quais foram usadas para a análise da fonte alimentar e da infecção natural. Nossos resultados mostraram que os índices de IN total variaram entre as três técnicas usadas, MO (36% - 103/286), cultura em meio específico para *T. cruzi* (51% - 52/102) e PCR convencional multiplex (58,9% - 165/280). A cultura teve maior sensibilidade comparada a MO, quando avaliamos os mesmos espécimes (n=100), reforçando o valor confirmatório sugerido para este método.

A avaliação dos mesmos espécimes (n=184) com as duas técnicas (MO e PCR), revelou maior taxa de positividade das amostras para a PCR convencional multiplex 58,7% (108/184) enquanto obtivemos para a MO uma taxa de 43,5% (80/184). Além da maior sensibilidade, a PCR também teve maior especificidade em relação a MO e menor tempo na análise das amostras. Estes resultados estão de acordo com estudos que têm demonstrado a maior sensibilidade e especificidade da PCR em relação a MO (Cominetti et al 2013, Barbosa-Silva et al 2016, Minuzzi-Souza et al 2018). Adicionalmente, a evolução rápida do conhecimento tecnológico tem permitido o aprimoramento das ferramentas moleculares, levando pesquisadores a sugerir novas metodologias para estimar taxas de infecção natural por *T. cruzi* em diferentes espécies de vetores de distintos biomas em pesquisas ecoepidemiológicas (Moreira et al 2017). No presente estudo, realizamos o exame direto à fresco, porém não fizemos a coloração de lâminas com *Giemsa* para

identificação específica do protozoário (Junqueira et al 2011). Alternativamente, análises moleculares adicionais estão em andamento para avaliar a possibilidade de infecção por *T. rangeli*, considerando a ocorrência das seguintes situações: i) uma dada proporção deste parasito pode ser encontrada no conteúdo intestinal do triatomíneo (D'Alessandro 1976) e ii) o fato de *T. rangeli* ter sido identificado em espécimes de *T. b. brasiliensis* (3/67) no município Severiano Melo, na mesorregião Oeste do RN (Barbosa-Silva 2013) e em outras espécies de triatomíneo no RN e também em outros estados do nordeste (Barbosa-Silva 2017, Lucena & Vergueti 1973, Barret & Oliveira 1977).

As nossas análises sobre a IN por *T. cruzi* em populações de *T. b. brasiliensis*, utilizando diferentes abordagens, mostraram que a PCR convencional multiplex foi a técnica mais sensível e específica em relação às outras duas técnicas empregadas. No entanto, em pesquisas ecoepidemiológicas, o uso da MO e/ou cultura em conjunto com a PCR são úteis para a confirmação da transmissão pela detecção do protozoário nas fezes do triatomíneo. A dinâmica de eliminação de formas metacíclicas de *T. cruzi* é um importante parâmetro a ser verificado para avaliar a capacidade vetorial das diferentes espécies de triatomíneo e, neste caso, a MO e cultura podem contribuir para o monitoramento de *T. cruzi*. Apesar de não ser o objetivo do presente estudo, examinamos uma alíquota de fezes e urina coletadas espontaneamente logo após a primeira alimentação de 57 ninfas (N4-N5), o exame direto a fresco mostrou que nove espécimes (9/57) estavam eliminando formas metacíclicas de *T. cruzi*, sugerindo que *T. b. brasiliensis* desta área é capaz de transmitir o parasito. Ademais, apesar da MO ser uma técnica com baixa sensibilidade, reprodutibilidade, não ser eficiente para análise de formas imaturas (N1 – N3) e de insetos mortos e também ser um método laborioso; no contexto das atividades de vigilância entomológica em áreas endêmicas; a MO aparece como uma alternativa viável por ser um método de baixo custo comparado a ferramenta molecular, sobretudo, em períodos de crises político-econômicas e/ou na ocorrência de epidemias (Dengue, Zika e Chikungunya), que resultam no agravamento das dificuldades financeiras. Em relação a avaliação de formas imaturas, deve-se considerar o fato de os primeiros estádios ninfais frequentemente apresentam menores taxas de IN comparado aos últimos estádios ninfais, devido a sua menor capacidade de dispersão que diminui as chances de se alimentarem em hospedeiros infectados por *T. cruzi*.

No que diz respeito a fonte alimentar, as nove espécies identificadas confirmaram o ecletismo alimentar de *T. b. brasiliensis* e evidenciam a sua capacidade de circulação e colonização nos diferentes ambientes da área de estudo. As análises mostraram que *K. rupestris* representa a principal fonte de alimentação de *T. b. brasiliensis* em afloramentos rochosos do ambiente silvestre, pois seu DNA foi detectado no conteúdo intestinal de 50% (8/16) dos espécimes analisados. Este resultado está de acordo com o estudo realizado por Almeida et al (2016) que encontraram ~56% (19/34) de *T. b. brasiliensis* de ecótopos silvestres alimentados com este roedor. Além de compor a fauna de recursos alimentares de *T. b. brasiliensis* em ecótopos silvestres, *K. rupestris* também constitui uma importante fonte de sangue para populações de ecótopos artificiais, uma vez que foi identificado em 1 espécime do intradomicílio (casa desabitada) e em 22,2% (4/18) dos espécimes do curral de boi. Destes 5 espécimes de ecótopos artificiais que se alimentaram de *K. rupestris*, 4 eram ninfas de 5º estágio, reforçando a possibilidade da presença deste cavídeo no peridomicílio, uma vez que as ninfas possuem limitada capacidade de dispersão. Essas evidências são consistentes: i) com as observações de campo, ii) com os relatos dos moradores da nossa área de estudo e iii) com dados da literatura sobre aproximação desse cavídeo das habitações humanas (Lilioso 2015).

O presente estudo também mostrou que, no geral, entre os espécimes que tiveram a sua fonte alimentar identificada e que estavam infectados por *T. cruzi*, 35,7% (10/28) (Figura 5.9) estavam se alimentando em *K. rupestris*. A avaliação por ecótopo, também foi congruente, mostrando um elevado percentual no afloramento rochoso (46%) e no curral de boi (27%) (Figura 5.11), indicando que esse roedor pode estar atuando como uma ponte entre os ciclos de transmissão silvestre e peridomiciliar de *T. cruzi*. Apesar desses indícios, não descartamos a possibilidade da circulação de *T. b. brasiliensis*, sobretudo os adultos, através dos ecótopos artificiais e silvestres, pois identificamos sangue de humano no conteúdo intestinal de espécimes de afloramentos rochosos. Além de *K. rupestris*, *G. spixii* (preá) também foi identificada como fonte alimentar, porém em menor frequência, em afloramentos rochosos (19% - 3/16) e no curral de boi (5,6% - 1/18). *Galea spixii* apresenta comportamento sinantrópico mais acentuado que *K. rupestris*, o qual pode também atuar como elo entre os ciclos silvestre e peridomiciliar de *T. cruzi*, como sugerido por outros autores (Bezerra et al 2014, Valença-Barbosa et al 2015,

Almeida et al 2016). Assim, as evidências aqui apresentadas indicam que ambos, roedores e *T. b. brasiliensis*, podem estar fazendo uma ligação entre os ciclos de transmissão silvestre e peridomiciliar de *T. cruzi* na área de estudo. Neste cenário, *T. b. brasiliensis* poderia adquirir a infecção em roedores e transmitir para animais domésticos, tais como cães, os quais se demonstraram evidências de exposição ao parasito em outros municípios do RN (Vicente e Câmara, 2019).

Nossa pesquisa mostrou que o índice de IN por *T. cruzi* variou entre as 5 localidades onde as populações de *T. b. brasiliensis* foram amostradas. As três técnicas apontaram altos índices em Inácio, BEC e SRS: MO (29,4%, 54,1%, 58,5%, respectivamente), cultura (58,0%, 80%, 70,9%, respectivamente) e PCR (61,0%, 70,2%, 72,5%, respectivamente). É importante notar que, as análises da fonte alimentar mostraram que espécimes dessas três localidades se alimentaram de *K. rupestris*: Inácio (2/10), BEC (3/7) e SRS (8/13). Ao contrário das localidades supracitadas, as populações de Pedregulho e SSBE apresentaram menores índices de acordo com a MO (12,5% e 20%, respectivamente), cultura (15% e 11%, respectivamente) e PCR (36% e 34,4%, respectivamente). As menores taxas possivelmente refletem, em parte, a associação dos espécimes a galinhas (Pedregulho) e bovinos e galinhas (SSBE). Estes resultados evidenciam que dentro do mesmo município há diferenças na circulação de *T. cruzi*, as quais podem estar condicionadas à distribuição das espécies de vertebrados amplificadoras deste protozoário. Assim, os níveis de infecção pelo parasito podem variar em diferentes escalas espaciais e temporais. Distintos padrões de IN por *T. cruzi* foram observados entre municípios de um mesmo estado (Barbosa-Silva et al 2016) e entre municípios de diferentes estados (Lilioso et al 2017). Nossos resultados de MO concordam, em parte, com os resultados de Costa et al (1998), que ao realizarem o exame à fresco de fezes de *T. b. brasiliensis* silvestres em localidades de Caicó encontraram 15% de infecção natural, exame realizado há mais de 20 anos. Lilioso (2015) e Almeida et al (2016) empregaram a mesma metodologia e encontraram altos índices de IN em populações capturadas no BEC (SC) variando de 66,7-92,3% e 83-95%, respectivamente, concordando com o alto índice encontrado no presente estudo, sugerindo aumento nas taxas de IN nas áreas estudadas.

As taxas de IN também variaram de acordo com os ecótopos peridomiciliares e silvestres. As análises mostraram que as populações peridomiciliares de Pedregulho e SSBE mostraram maiores índices de IN por *T. cruzi* em relação as suas

coespecíficas silvestres. Esses resultados divergem do que é usualmente observado em outros estudos, nos quais as populações silvestres exibem maiores índices de IN em relação as do peridomicílio (Barbosa-Silva et al 2016). A maior taxa de IN natural peridomiciliar, provavelmente, pode estar relacionada a repastos sanguíneos em animais hospedeiros de *T. cruzi*, tais como roedores (*M. musculus*) em Pedregulho e cabras (*Capra hircus*) em SSBE, animais observados no peridomicílio destas localidades e identificados como fonte alimentar de *T. b. brasiliensis* no presente estudo (Tabela 5.8). Embora ainda esteja sendo elucidado o papel desses animais no ciclo de transmissão peridomiciliar de *T. cruzi*, estudos têm mostrado a parasitemia (Fernandes et al 1994) e a exposição à infecção de caprinos (Bezerra et al 2014) e de camundongos (Yefi-Quinteros et al 2018).

É importante ressaltar que, em SSBE, observamos duas situações que ilustram o risco real de transmissão do parasito para a população humana: i) pela via vetorial clássica, pois verificamos que 2 espécimes adultos capturados no serrote (cerca de pedras) próximo da casa havia se alimentado com sangue humano, e um deles estava infectado com *T. cruzi*, sugerindo a circulação de vetores infectados entre o peridomicílio e o intradomicílio e ii) contaminação das mucosas dos olhos, nariz e boca por formas metacíclicas, pois próximo a esse serrote encontramos uma pedra com resíduo de sangue de triatomíneo (Figura 4.4E), a qual estava sendo usada um dia antes da nossa visita para matar espécimes de *T. b. brasiliensis*. Esses fatos demonstram que mesmo verificando a baixa densidade intradomiciliar de *T. b. brasiliensis* e menores taxas de infecção natural, o risco de transmissão não pode ser negligenciado. Esta situação é preocupante, sobretudo no atual cenário de aumento da incidência de casos e surtos de doença de Chagas pela via de transmissão oral não só na região amazônica, mas em todas as regiões do Brasil. Em um município da mesorregião Oeste do estado do RN, um surto de doença de Chagas ocasionado pela ingestão de caldo-de-cana foi registrado pela primeira vez em 2015, com confirmação de 18 casos. A investigação epidemiológica concluiu que *T. b. brasiliensis* infectado foi a provável fonte de contaminação do suco (Vargas et al 2018). Estes fatos mostram a necessidade de campanhas constantes de prevenção da doença de Chagas que podem ser úteis tanto no combate à naturalização da doença pela população residente em áreas endêmicas (por ser uma doença de baixa letalidade) como também na difusão de conhecimento sobre o

agente etiológico, os vetores, os locais onde são encontrados os vetores, as vias de transmissão do parasito e as formas de prevenção.

Elevadas taxas de IN foram detectadas nos dois ambientes, na localidade SRS, concordando com os resultados reportados para o município de Currais Novos (Lilioso et al 2017). Embora esses espécimes tenham sido capturados no curral de boi, as análises do conteúdo do trato digestório evidenciaram que repastos sanguíneos foram realizados em sua maioria em mocó (*K. rupestris*) (4/7), mas também em camundongo (*M. musculus*) (1/7) e preá (*Galea spixii*) (1/7) (Tabela 5.8). Essas evidências sugerem intercâmbio dos vetores entre os ecótopos silvestres e peridomiciliares e/ou presença desses roedores no peridomicílio, em vista dos seus diferentes níveis de sinantropia mencionados. A alta taxa de IN reportada aqui reforça a suposição de que *K. rupestris* poder ser potencial reservatório de *T. cruzi* (Roque e Jansen 2014) não só em áreas preservadas como sugerido por Almeida et al (2016), mas também em áreas degradadas. A densidade de pequenos mamíferos está associada a disponibilidade de água, assim, períodos prolongados de seca, como os que vem ocorrendo ao longo dos anos, especialmente em 2015, podem provavelmente estar forçando a migração dos roedores para as proximidades das habitações humanas em busca de ambientes estáveis, o que explicaria as altas taxas de infecção por *T. cruzi* no peridomicílio.

Em Inácio, a população peridomiciliar apresentou menor positividade para *T. cruzi* (MO= 16,7%, cultura=20%, PCR=50%) em comparação a população silvestre (MO=60%, cultura =93,7%, PCR=100%). A menor positividade desta população coletada em um curral de boi pode ser explicada pela alimentação em bovinos, conforme evidenciada nas análises da fonte alimentar (5/7) (Tabela 5.8). Entretanto, estudos são necessários para esclarecer o papel dos bovinos no ciclo de transmissão de *T. cruzi*, pois sabe-se que outros tripanossomatídeos, *T. vivax* e *T. evansi*, infectam e podem causar doenças nesses animais (Krinsky 1976, Batista et al 2007). Neste caso, a infecção dos espécimes pode estar relacionada a sua alimentação em outros hospedeiros, tais como *M. musculus* (1/7) e/ou ao *K. rupestris*, uma vez que esse roedor foi registrado em afloramento rochoso a 50m do curral, onde foi coletada a população no ambiente SM que apresentou as altas taxas de IN supracitadas. Nesta localidade identificamos 2 espécimes alimentados em humanos, um macho do ambiente SM (infectado por *T. cruzi*) e uma fêmea do

peridomicílio, sugerindo a circulação dos vetores entre os ambientes silvestres, peridomiciliar e intradomiciliar.

No que se refere à caracterização genética dos isolados de *T. cruzi*, a frequência destas subpopulações nos diferentes ambientes, as peculiaridades das suas interações com hospedeiros e a sua distribuição geográfica no estado do RN ainda estão sendo compreendidas. Estudos prévios realizando análise genética com três marcadores (24Sα rDNA, COII e SL-IR) reportaram a ocorrência das linhagens genéticas TcI, TcII e TcIII, tanto na mesorregião Oeste (MeO) quanto na mesorregião Central (MeC) do estado (Câmara et al 2010, 2013, Martins et al 2015, Barbosa-Silva et al 2016). Nossos resultados, correspondentes a amostragens realizadas em diferentes localidades de Caicó (MeC) (Figura 4.1 e Figura 4.6), mostraram a circulação das DTUs TcI e TcII em Inácio, BEC e SRS. Em Pedregulho, identificamos apenas a DTU TcI (2 amostras) e em SSBE identificamos TcII (1 amostra), possivelmente devido ao número reduzido de amostras analisadas para essas últimas localidades. É importante ressaltar que esses resultados se referem a parasitos isolados em meio de cultura, ou seja, foram submetidos a pressões seletivas, o que poderia explicar a baixa variabilidade entre as DTUs (Deane et al 1984). Por outro lado, apesar de não descartamos a possibilidade da ocorrência de outras DTUs na área de estudo, baixa diversidade de linhagens de *T. cruzi* pode ser esperada em áreas degradadas, ou seja, com perda da diversidade de mamíferos, tais como está ocorrendo em áreas de intensa desertificação (Leal et al 2005, MMA 2007). Estudos realizados por Câmara et al (2010) com amostras de 3 municípios sugeriram que a alta frequência da DTU TcII infectando humanos (91,7%) e *T. b. brasiliensis* (50%) comparada a baixa frequência da DTU TcI (4%) reforçou a ideia de que TcII predomina no ciclo de transmissão domiciliar. Martins et al (2015) realizaram amostragens em um maior número de municípios da MeO e MeC revelaram proporções semelhantes de TcI (46,1%) e TcII (53,8%) em amostras humanas. No presente estudo, os resultados revelaram que TcI foi mais frequente do que TcII no peridomicílio (TcI = 70% - 7/10, TcII = 30% - 3/10) e no ambiente silvestre modificado (TcI = 66,6% - 12/18, TcII = 33,3 % - 6/18) (Figura 5.2). Os achados de populações de *T. b. brasiliensis*, de diferentes ambientes, infectadas com TcI e TcII fornecem evidências adicionais de que este vetor pode estar atuando como elo de ligação entre os ciclos enzoótico e peridomiciliar de *T. cruzi*, como observado em outras áreas do RN, nos quais a sobreposição dos ciclos domiciliar e

silvestre de TcII foi feita por *T. b. brasiliensis* (Câmara et al 2013). Em estudo realizado por Bezerra et al (2018) foram observados no CE a associação das DTUs TcI e TcII com *T. b. brasiliensis* em ecótopos antrópicos e silvestres em diferentes períodos (2009-2015), levando os autores a destacar a sobreposição dos ciclos intradomiciliar, peridomiciliar e silvestre em função das características ubiquistas deste vetor. Alternativamente, na nossa área de estudo, populações de roedores cavídeos, supostamente competentes como fontes de infecção, poderiam também estar atuando em conjunto com *T. b. brasiliensis* como elo entre os ciclos peridomiciliar e silvestre. *Triatoma b. brasiliensis* tem hábito alimentar eclético, como evidenciado no presente estudo, sendo frequentemente associado a mamíferos, especialmente roedor e humano. Em áreas da Caatinga, as DTU TcI e TcII tem sido identificadas em hospedeiros silvestres, tais como *Didelphis albiventris* (TcI e TcII), *Rattus rattus* (TcI) (Lima et al 2012) e *Trichomys laurentius* (TcI) (Bezerra et al 2014) e em mamíferos domésticos como cães (TcI) no CE (Bezerra et al 2014). Portanto, considerando-se o acentuado cenário de degradação ambiental na região do Seridó, onde se localiza a nossa área de estudo, sugerimos estudos de levantamento da diversidade de mamíferos e os seus *status* como hospedeiro/reservatório, bem como a identificação dos genótipos de *T. cruzi* nesses animais. De posse deste conhecimento, poderemos confirmar se *K. rupestris* e *G. spixii* estão atuando como reservatório de *T. cruzi* nesta área.

6.3. Análise das alterações morfológicas das asas de populações de *T. b. brasiliensis* das localidades de estudo em Caicó, RN.

6.3.1. Variação do Tamanho

6.3.1.1. Entre sexos, ambientes, localidades e grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*

Os triatomíneos são insetos capazes de desenvolver mudanças morfológicas como resposta a fatores bióticos/abióticos de novos habitats (Dujardin et al 1999a, 2009). A exemplo de várias espécies vetoras de *T. cruzi*, variações morfológicas como: diminuição do tamanho corporal, do dimorfismo sexual (DS) e das sensilas das antenas foram sugeridas como consequência do processo de domiciliação (Dujardin et al 1999b, Carbajal et al 2002). Em estudos morfométricos, admite-se que o caráter tamanho é mais influenciado por condições ambientais do habitat em que o triatomíneo está inserido do que por determinantes genéticos, enquanto o

caráter conformação possui forte determinismo genético (Dujardin 2011). A variabilidade no tamanho e na conformação da cápsula cefálica e das asas associadas ao ecótopo, à densidade populacional e ao hospedeiro é usualmente reportada para Triatominae (Dujardin et al 1997b, Schachter-Broide et al 2004, Batista et al 2012, Nattero et al 2013, Hernandez et al 2018). No presente estudo, as análises do TC e das variáveis de conformação de populações de *T. b. brasiliensis* provenientes de diferentes áreas de Caicó, RN, mostraram heterogeneidade no tamanho e na conformação da asa de acordo com os sexos, ecótopos e localidades.

Evidências de DS de tamanho das asas foram detectadas em populações dos ambientes silvestres modificados e conservados (Inácio e BEC) e do peridomicílio (Pedregulho e de SRS), nas quais as asas de fêmeas exibiram maiores valores de TC em relação aos machos. Estudos sobre o DS vêm sendo realizados durante décadas à luz de conceitos evolutivos (Darwin 1874) e ecológicos, nos quais a classe Insecta se revelou um modelo interessante (Grimaldi & Engel 2005). No grupo dos triatomíneos, as diferenças ligadas ao sexo, como o maior tamanho corporal médio de fêmeas em relação aos machos, já foram abordadas por Lent e Wygodzinsky (1979). Pesquisas conduzidas com populações de *T. b. brasiliensis* do Ceará e do Piauí demonstraram também marcado DS no tamanho das cápsulas cefálicas, sendo a das fêmeas maiores que a dos machos (Borges et al 2000, 2005). As divergências no tamanho alar entre fêmeas e machos observadas no presente estudo estão de acordo com as observações de Batista et al (2012), que mostraram pela primeira vez o DS de tamanho e forma das asas de populações de *T. b. brasiliensis* de um estado vizinho, o Ceará. No geral, a disparidade de tamanho entre os sexos, com fêmeas maiores do que machos, em Triatominae está associada a maior demanda de energia para a produção de ovos. Estudos reprodutivos demonstraram que a postura de ovos de *T. b. brasiliensis* depende da sua boa condição nutricional (Perondini et al 1975) e, conseqüentemente, do seu melhor desempenho em ingerir sangue. De fato, a maior capacidade de alimentação de fêmeas desta subespécie foi evidenciada, indiretamente, em condições de laboratório através do número superior de repastos sanguíneos realizados (Folly-Ramos et al 2016). Uma hipótese alternativa diz respeito a dispersão, estudos com *T. infestans* mostraram que as fêmeas exibem um comportamento de dispersão mais acentuado em relação aos machos (Gurevitz et al 2006) e que os músculos de

vão frequentemente são ausentes nos machos (Gurevitz et al 2007), o que poderia implicar em uma maior predisposição das fêmeas à seleção.

Entre as três localidades de Caicó em que se mediu o DS de tamanho das asas de populações do peridomicílio e do ambiente silvestre, em uma delas (Inácio) observou-se a redução do DS de tamanho alar na transição do ambiente silvestre para o ambiente artificial (peridomicílio). Dujardin et al (1999b) formularam a hipótese de que a diminuição do DS de espécies em transição do ambiente silvestre para o domicílio poderia ser esperada, uma vez que o aumento da densidade populacional em ambientes mais estáveis favoreceria a competição por alimento. Esta condição implicaria na menor ingestão de sangue, tendo como consequência a diminuição do tamanho dos indivíduos. Assim, a redução do tamanho geral, principalmente de fêmeas que tem maiores necessidades alimentares, se refletiria na redução do DS. Esta hipótese poderia explicar a redução do tamanho das asas e do DS de tamanho alar observado nos espécimes de Inácio.

Nossas análises mostraram que, na localidade Inácio, indivíduos silvestres foram maiores que os do peridomicílio (Figura 5.15A) e, durante as investigações entomológicas, observou-se que os espécimes capturados neste último ambiente compunham uma colônia numerosa estabelecida em um curral de boi. Na ocasião desta única coleta noturna, foi possível capturar 176 espécimes de uma só vez e observamos que triatomíneos estavam alimentados, porém não ingurgitados. Nestas circunstâncias, o efeito da densidade populacional pode ter influenciado no estado nutricional dessa população e conseqüentemente no seu menor tamanho. Adicionalmente, estudos têm sugerido que a quantidade e a qualidade da espécie hospedeira (espessura da pele, viscosidade do sangue, mecanismos de hemostase) usada como fonte alimentar pelos triatomíneos poderia influenciar os seus caracteres morfométricos (Guarneri et al 2000, Schachter-Broide et al 2004, Hernandez et al 2011, Nattero et al 2013, Hernandez et al 2018). Em nosso estudo, além do efeito da densidade populacional, é possível que a fonte alimentar (bovinos) desta população possa estar influenciando nas suas variações métricas. Há grandes chances dos bovinos serem a fonte alimentar primária destes espécimes, pois eram os animais mais próximos da colônia e durante nossas investigações no ambiente peridomiciliar desta localidade não observamos galinhas, somente um galinheiro desativado em mal estado de conservação (~100m de distância). Corroborando com as nossas observações, pesquisas realizadas no conteúdo intestinal de 7 espécimes

desta população mostraram que a fonte alimentar predominante foi o *Bos taurus* (5/7), o que poderia contribuir para a menor taxa de sangue ingerido pelos triatomíneos em função da maior dificuldade de localização do vaso sanguíneo devido a maior espessura da sua pele e, possivelmente, maior irritabilidade deste animal à picada do barbeiro, favorecendo repastos incompletos.

O efeito da fonte alimentar na variação do tamanho alar da população silvestre de Inácio poderia ser aventado, em função da oferta de alimento. O DS de tamanho alar observado na população capturada em um afloramento rochoso, provavelmente estaria relacionado presença de *K. rupestris*. *Triatoma b. brasiliensis* é uma subespécie eclética em termos de exploração de recursos tróficos, reproduzindo-se e desenvolvendo-se bem ao alimentar-se de aves e mamíferos em ecótopos naturais. Em condições de laboratório, este vetor mostrou melhores taxas de reprodução e desenvolvimento quando alimentado em mamífero (camundongo) do que em aves (pombo) (Guarneri et al 2000). *Kerodon rupestris* é um dos hospedeiros habituais de *T. b. brasiliensis* em afloramentos rochosos da Caatinga, o qual usa este ecótopo para reprodução, descanso e proteção contra predação (Animal Diversity Web, 2017). A sua associação com esta subespécie é reportada desde o início do século XX (Neiva 1914) até a atualidade (Sarquis et al 2010, Bezerra et al 2014, Almeida et al 2016). Na nossa área de estudo, tradicionalmente, a carne deste roedor foi muito apreciada pela população local, no entanto, nos últimos anos a sua caça foi proibida, o que resultou no aumento da população em algumas áreas (Medeiros AS [SVS], comunicação pessoal). Por se tratar de um alimento que faz parte da cultura de populações sertanejas, a possibilidade da transmissão oral de *T. cruzi* ou pela manipulação e/ou ingestão da carne de *K. rupestris* deve ser considerada e medidas de prevenção da infecção adotadas. Embora não tivéssemos o objetivo de estudar a fauna de vertebrados, durante nossas pesquisas entomológicas, verificamos evidências da presença e abundância desse cavídeo no conglomerado rochoso, onde foi coletada a população silvestre *T. b. brasiliensis* em Inácio. Estas evidências foram obtidas através da visualização direta (Figura 5.6A e B), da constatação de grande quantidade de urina e fezes frescas desse roedor nos sulcos das rochas (Figura 5.6D), bem como da identificação do seu DNA no conteúdo intestinal de espécimes (2/3) capturados neste ecótopo (1/3 espécime detectou-se DNA humano). Estas evidências sugerem que a população de *K. rupestris* pode não ser a única, mas a principal fonte

alimentar desta população silvestre de *T. b. brasiliensis*, o que implicaria na eficiência no consumo de sangue das fêmeas e conseqüentemente, o DS de tamanho alar observado, provavelmente, devido ao seu melhor estado nutricional, por conseguir ingerir sangue até a saciedade.

De modo similar, observou-se a ocorrência de DS de tamanho da asa na população silvestre do BEC, onde ela coabitava com *K. rupestris* no afloramento rochoso pesquisado. Nesta localidade, não avistamos o animal diretamente, mas, assim como em Inácio, observamos grande quantidade de fezes e urina fresca na superfície das rochas durante as coletas. Neste local, a fauna e flora nativas são preservadas, pois a área é circundada por muros altos, mas, eventualmente, animais domésticos como gatos são retirados pelos soldados, que acessam a área para realizar o seu treinamento. As observações de campo estão de acordo com as nossas análises laboratoriais do conteúdo intestinal para detectar a fonte alimentar. As análises de alguns indivíduos detectaram DNA de *K. rupestris* (2/6), *Homo sapiens* (2/6), *Galea spixii*, (1/6) *Felis catus* (1/6), indicando acesso a fonte alimentar e sugerindo bom estado nutricional da fêmea. É importante notar que, nas comparações das populações silvestres entre localidades, a população do BEC (fêmeas e machos) (Figuras 5.15B e 5.15D) exibiu menor TC das asas em relação às populações das demais localidades (Inácio, Pedregulho, SRS), o que poderia ser interpretado como um possível isolamento por distância e/ou barreira física desta população em relação as populações das outras localidades.

As análises do TC da asa de populações de outras localidades permitiram a observação do inverso do processo abordado por Dujardin et al (1999b). Nas localidades de Pedregulho e SRS, diferenças estatísticas significativas no TC das asas entre machos e fêmeas foram observadas em populações do peridomicílio e não do ambiente silvestre. Em Pedregulho, não houve diferença de tamanho das asas entre ecótopos, mas verificamos DS de tamanho na população do peridomicílio. Esta população, composta por vários indivíduos ingurgitados (Figura 4.4F), foi coletada durante nossas pesquisas (1 diurna e 1 noturna) em uma cerca de pedra de um curral de boi. Na visita diurna verificamos a presença de bovinos (bezerros) no interior do curral, sugerindo que esses animais poderiam servir de fonte primária de alimentação para essa colônia. Entretanto, na coleta noturna observamos galinhas dormindo nesta cerca e, nesta oportunidade, coletamos a maioria dos espécimes ingurgitados em várias pedras sobre as quais as aves

dormiam. Este fato é sugestivo de regularidade da oferta dessa fonte alimentar para o repasto sanguíneo noturno diário desta colônia. Apesar de *T. b. brasiliensis* mostrar menor comprimento do corpo e capacidade reprodutiva de fêmeas quando alimentado em aves (pombo) em condições de laboratório (Guarneri et al 2000), possivelmente, na cerca de pedra usada como poleiro no peridomicílio de Pedregulho, as galinhas serviriam de fonte alimentar para manter a colônia *T. b. brasiliensis*. A maior proximidade, o melhor acesso aos vasos sanguíneos, devido à fina espessura da pele, e a baixa irritabilidade deste hospedeiro no momento da alimentação podem ter permitido que as fêmeas alcançassem a repleção, conforme observado para *T. infestans* (Hernandez et al 2018). Nossas observações de campo em conjunto com evidências obtidas em laboratório, detecção do DNA de *G. gallus* (1/3) e de *M. musculus* (2/3), indicam o bom estado nutricional das fêmeas do peridomicílio de Pedregulho (pelo uso de aves e mamíferos como fonte alimentar), o que explicaria o maior tamanho corporal e, por conseguinte, a existência de DS de tamanho da asa nesta população. A população capturada no ambiente silvestre não apresentou diferenças significativas entre machos e fêmeas. No afloramento rochoso pesquisado observaram-se sinais indicativos de uma menor densidade população de *K. rupestris* (poucas fezes secas) o que, aparentemente, se traduziu em menor oferta de alimento para essa colônia.

Em SRS, o marcado DS de tamanho das asas da população (valor de TC de fêmeas maior do que de machos), capturada em uma cerca de pedras de um curral de boi, pode estar associado ao consumo de sangue de diferentes espécies de mamíferos. As análises do conteúdo intestinal demonstraram a presença de sangue de *K. rupestris* (4/7), *M. musculus* (1/7), *G. spixii* (1/7) e *H. sapiens* (1/7). A predominância do mocó como recurso alimentar para esses espécimes e as convergências de tamanho das asas das fêmeas do peridomicílio e ambiente silvestre (Figura 5.15C) podem ser indícios de intercâmbio entre as populações de *T. b. brasiliensis* dos dois ambientes. No ambiente silvestre de SRS, *K. rupestris* (4/6) também foi a fonte alimentar predominante nos espécimes avaliados (1/6 *H. sapiens*, 1/6 *P. maculata*). Na população do ecótopo silvestre (SM) pesquisado (afloramento rochoso) não foram observadas diferenças ligadas ao sexo (Figura 5.14C). A maior variação do tamanho observado nas fêmeas deste ambiente sugere limitação da oferta de alimento, gerando competição entre os indivíduos. Nestas circunstâncias, os indivíduos que conseguissem se alimentar realizariam

repastos incompletos, resultando no menor tamanho e na ausência de DS de tamanho da asa. Em razão da escassez de alimento, os indivíduos desta colônia se dispersariam para locais com maior abundância de vertebrados como na área peridomiciliar das habitações humanas.

Estudos sobre a interação tripanosomas-triatomíneos demonstraram que os parasitos podem afetar diversos aspectos da vida do inseto vetor, os quais podem ter implicações para a transmissão do próprio parasito e/ou conferir diferentes níveis de patogenicidade ao hospedeiro. Tais danos infligidos pelo parasito podem variar de ausente a graves e podem ser exacerbados quando atuam sinergicamente com estressores bióticos/abióticos nos ecótopos naturais, tais como a temperatura (Schaub 1992). *Trypanosoma rangeli* é conhecido por ser altamente patogênico ao vetor, sobretudo em infecções com alta carga parasitária, levando a altas taxas de mortalidade, ao atraso no desenvolvimento, dificuldades na alimentação e modificações na morfologia (Grewal, 1957, Añez 1984, Tobie 1964). Diferente de *T. rangeli*, o efeito de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado é mais sutil, podendo ser aparente ou não. A ausência de interferência de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado, tais como na taxa de mortalidade (Schaub 1988) e danos no tecido intestinal (Kollien et al 1998) corroboram com a ideia de que *T. cruzi* é um parasito não patogênico para os triatomíneos. No entanto, vários trabalhos têm evidenciado o seu efeito no inseto vetor, inclusive com redução tênue do *fitness*, com menores taxas de fecundidade e fertilidade (Lima et al 1992, Fellet et al 2014), atraso no tempo de desenvolvimento, redução do peso corporal e do tamanho das gônadas (Botto-Mahan et al 2008, Oliveira et al 2010). Além disso, foram relatadas influências do parasito em parâmetros que não estão diretamente relacionados ao *fitness* como alterações no tamanho da asa (Nouvellet et al 2011) e potencial manipulação do comportamento de dispersão dos vetores (Ramírez-Sierra et al 2010). No presente estudo as análises morfométricas mostraram que, na maioria das populações (9/11) avaliadas, os grupos infectados com *T. cruzi* exibiram menores valores médios de TC, porém essa diferença não foi significativa, indicando que *T. cruzi* pode ter uma influência sutil no que tange a essa variável (Figuras 5.15A-B e 5.16A-B). Sabe-se que as diferentes linhagens de *T. cruzi* apresentam diversidade biológica, bioquímica, molecular e genética que implicam em diferentes níveis de adaptação às diferentes espécies vetoras (Zingales et al 2009). A ausência de alterações significativas no TC das asas sugere adaptação das linhagens de *T. cruzi* às

populações de *T. b. brasiliensis*, possivelmente devido a sua longa coexistência na área de estudo. Análises empregando RAPD para estimar relações filogenéticas de isolados de *T. cruzi* do RN mostraram que perfis homogêneos de amostras de humanos e de triatomíneos poderiam estar associado com a seleção do parasito há milhares de anos (Câmara et al 2013), concordando com a ideia de que a primeira transmissão de *T. cruzi* para humanos por *T. b. brasiliensis* na região nordeste teria ocorrido milhares de anos antes (15.000 a 12.000 BP) do período aceito para o povoamento da América do Sul (Araújo et al 2009).

Adicionalmente, o efeito subpatogênico de *T. cruzi* pode não ter se refletido no TC possivelmente devido a adaptação das populações de *T. b. brasiliensis* a refúgios que ofereçam condições microambientais favoráveis para lidar com a infecção, visto que este triatomíneo, como anteriormente reportado por Lucena (1970), é afeito a ambientes quentes e secos, típicos das áreas semiáridas seridoenses. Em condições de laboratório, a avaliação dos efeitos de *T. cruzi* em parâmetros do *fitness* de *P. megistus* (Lima et al 1992) e de *T. b. brasiliensis* (Oliveira et al 2010) mantidos em torno de 30°C mostraram que na primeira houve diminuição significativa da reprodução enquanto na segunda não. Esses achados evidenciam que, possivelmente, a temperatura pode ter atuado como fator abiótico estressor sinérgico (Schaub 1992), amplificando o efeito de *T. cruzi* em *P. megistus* que normalmente prefere temperaturas mais baixas, ao contrário de *T. b. brasiliensis* que prefere temperaturas mais altas.

6.3.2. Variação da forma e alometria

6.3.2.1. Entre sexos, ambientes, localidades e grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*

Estudos utilizando a morfometria geométrica pressupõem que a variação da conformação reflete indiretamente a variação genética, uma vez que a conformação é considerada um caráter poligênico (Dujardin 2011). Em estudos populacionais, as análises multivariadas das variáveis de conformação podem revelar padrões de estruturação de populações em microescala espacial, os quais podem estar associados não só a ecótopos e hospedeiros, mas também podem ser causados por algum grau de isolamento físico (Schachter-Broide et al 2004). O presente estudo mostrou que as populações de *T. b. brasiliensis* de Caicó exibiram divergências na conformação alar entre sexos e ecótopos, porém não mostraram diferenças

consistentes entre localidades. Considerando todas as populações avaliadas, apenas a população do peridomicílio de Inácio apresentou DS de conformação. A análise discriminante e as distâncias de Mahalanobis mostraram que Inácio também foi a localidade em que tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram diferentes padrões de conformação ligados ao ecótopo (silvestre e peridomiciliar), enquanto em Pedregulho observou-se divergência apenas para os machos e as outras localidades não mostraram diferenças significativas entre ecótopos. Essa falta de diferenciação pode ser atribuída a possibilidade de troca de triatomíneos entre habitats do ambiente silvestre e peridomiciliar dessas localidades, nos quais o fluxo de indivíduos poderia ser mais intenso. As diferenças na conformação das asas das populações de *T. b. brasiliensis* encontradas aqui se aproximam dos resultados obtidos por Batista et al (2012) ao estudar *T. b. brasiliensis* e por Schachter-Broide et al (2004) ao estudar *T. infestans*, os quais também evidenciaram diferenças significativas de conformação alar ligadas ao sexos e ao ecótopo.

Nossos resultados não mostraram alterações significativas na conformação alar de *T. b. brasiliensis* que apontassem para eventos adaptativos relacionados à interação com o protozoário *T. cruzi*. Entretanto, no que diz respeito a diferenciação das populações de Inácio e Pedregulho, é possível que elas estejam sofrendo pressões seletivas e que estas incidem de maneira diferente em machos e fêmeas, especialmente no peridomicílio de Inácio onde foi detectado dimorfismo sexual de conformação. O fator biótico ou abiótico que poderia estar correlacionado a esta diferença na conformação provavelmente são as condições microclimáticas do ecótopo em associação com o tipo de fonte alimentar. A heterogeneidade de tamanho, do tipo de material e a da organização das estruturas ecotípicas podem conferir diferentes efeitos de amortecimento da temperatura e variação da umidade relativa micro local (Vasquez-Prokopec et al 2002), principalmente em áreas semiáridas com grave processo de desertificação onde os efeitos das mudanças climáticas são mais intensos, tais como na nossa área de estudo na região do Seridó (MMA 2007, Marengo 2008). Esta conjectura pode ser extrapolada para outros fatores abióticos como o grau de insolação e de intensidade luminosa dos habitats. Apesar de não termos medido essas variáveis no afloramento rochoso e no curral de boi, não descartamos a possibilidade da sua influência nas populações. Adicionalmente, as espécies hospedeiras residentes nos ecótopos possivelmente poderiam contribuir para a variação da conformação alar observada no presente

estudo, uma vez que as diferentes espessuras da pele, viscosidade do sangue e as diferenças nos mecanismos homeostáticos dos hospedeiros (plaquetas de mamíferos e trombócitos de aves) podem afetar o repasto sanguíneo dos insetos e contribuir para o estresse nutricional (Lehane 2005, Lewis 1996). As análises da fonte alimentar e observações de campo do presente estudo evidenciaram que um alto percentual dos indivíduos das populações pode ter se desenvolvido em cada habitat alimentando-se, principalmente, de bovinos (peridomicílio de Inácio) e galinhas (peridomicílio de Pedregulho). Já no ambiente silvestre modificado evidenciamos *K. rupestris* (Inácio) e *G. spixii* (Pedregulho). Estes fatores, inerentes ao ecótopo e à espécie hospedeira, já foram sugeridos e demonstrados como responsáveis por afetar o desenvolvimento do ciclo biológico, o tamanho do corpo, o tamanho a cápsula cefálica, do tamanho e da conformação das asas, bem como a assimetria flutuante da conformação alar de triatomíneos (Guarneri et al 2000, Vasquez-Prokopec et al 2002, Nattero et al 2015, Hernandez et al 2018).

Estudos empregando ferramentas moleculares e morfometria geométrica podem auxiliar no entendimento das questões evolutivas e adaptativas no grupo dos triatomíneos. Um exemplo de plasticidade fenotípica foi sugerido, ao associar morfometria geométrica e análises de isoenzimas, para o padrão “*dark morph*” (variante escura) de *T. infestans* do ambiente silvestre, pois contrastava com o padrão já conhecido e muito adaptado ao ambiente domiciliar (Noireau et al 1997). Posteriormente, Gumiel et al (2003) utilizaram a morfometria geométrica para estudar a variação geográfica e interespecífica do complexo *T. infestans*, incluindo o padrão “*dark morph*” e a espécie *Triatoma melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo, 1987. Os resultados mostraram consistente diferenciação geográfica, porém nenhuma evidência foi encontrada para considerar o padrão “*dark morph*” ou *T. melanosoma* como espécie distinta, o que levou os autores a sugerirem sinonímia de *T. melanosoma* com *T. infestans*.

Variabilidade fenotípica de *T. b. brasiliensis* foi reportada no estado de Pernambuco, onde foram descritos diferentes padrões cromáticos desta subespécie, os quais foram devidamente analisados com o auxílio de técnicas moleculares e da morfometria geométrica (Gumiel 2011, Costa et al 2016). As análises mostraram distintos padrões cromáticos que ocorrem aleatoriamente em vários ecótopos e que foram agrupados como *T. b. brasiliensis* em um dendrograma obtido com base em dados moleculares (Monteiro et al 2004, Costa et al 2016). A existência destes

diferentes fenótipos foi associada a cruzamentos naturais ocorrendo entre *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma* e *T. juazeirensis* o que vem gerando uma variabilidade fenotípica em áreas hibridação (Costa et al 2016).

Noireau et al (1998) estudaram oito populações de duas espécies morfologicamente semelhantes, *T. sordida* e *Triatoma guasayana* Wygodzinsky e Abalos, 1949, empregando a *MLEE* de 20 locus. Os resultados mostraram a separação das duas espécies e a suposta ocorrência de poucos híbridos na natureza levaram os autores a sugerir divergência evolutiva recente dentro de *T. sordida*. Estudos recentes visando encontrar marcadores fenotípicos para a diferenciação de populações e das espécies do subcomplexo Sordida, utilizando a morfometria linear e a morfometria geométrica, confirmaram a existência de padrões muito próximos de *T. sordida* e indicaram a conformação alar como marcador fenotípico razoavelmente bom para delimitar as quatro espécies. As análises da conformação alar foram capazes de diferir a espécie críptica proposta, *T. sordida* da Argentina, de *T. sordida* do Brasil e da Bolívia, sugerindo que as supostas espécies podem não ser crípticas (Nattero et al 2017).

Eventos de plasticidade fenotípica, como os mencionados acima, geram novos fenótipos, os quais em um novo ambiente podem ser adaptativos. Devido a essa condição, a plasticidade fenotípica pode auxiliar a especiação, disponibilizando um fenótipo diferente sobre o qual a seleção natural pode agir (Dujardin 2011). No presente estudo, os exemplares analisados não apresentaram variações cromáticas que se distanciassem do padrão característico de *T. b. brasiliensis* já descritos por Lent & Wygodzinsky (1979) Costa et al (2013) e Dale et al (2018). Apesar de estudos sobre plasticidade fenotípica serem relatados em vários cenários no grupo dos triatomíneos, a investigação da plasticidade fenotípica de populações de *T. b. brasiliensis* empregando a morfometria geométrica ainda não havia sido conduzida para entender a dinâmica adaptativa deste vetor no município de Caicó, região Seridó do RN, área que está passando por um intenso processo de desertificação e marcados períodos de seca, os quais estão sendo agravados pelas mudanças climáticas (MMA 2007, Marengo 2008).

Em um contexto geral, a análise da conformação alar mostrou algumas questões que merecem ser investigadas com mais detalhes, com atenção especial para as localidades de Inácio e de Pedregulho. Registros dos índices de infestação domiciliar e dos índices de infecção natural destas áreas, obtidos pelas Secretarias

de Vigilância em Saúde, deverão também ser analisados para verificar se estas diferenciações na conformação alar poderiam estar correlacionadas a diferenças na capacidade vetorial de *T. b. brasiliensis*, nestas localidades. No presente estudo, a análise discriminante mostrou que não houve diferenças significativas na conformação alar ligada a infecção por *T. cruzi* já que a os gráficos de similaridade morfológica, resultante da análise de agrupamento com base nas distâncias de Mahalanobis, mostraram que grupos negativos e positivos foram mais semelhantes.

Em uma análise geral, os dados do presente estudo sugerem que *T. b. brasiliensis* das localidades estudadas de Caicó encontra-se em ambientes que aparentemente não estão exercendo pressões adaptativas intensas e/ou o intenso fluxo de indivíduos entre alguns ecótopos pode estar ocorrendo a ponto de não haver forte estruturação de populações. Vale mencionar que Almeida et al (2016) evidenciaram fluxo gênico entre populações de sítios geográficos e ecótopos mais distantes, ~ 600m. Entretanto, não descartamos a possibilidade de algum grau de diferenciação genética das populações entre ecótopos de Inácio e de Pedregulho, inferida indiretamente a partir das diferenças de conformação das asas. A ausência de alometria (influência do tamanho na conformação) indica que estas variações não estão associadas afores externos, pois o tamanho é um caráter mais lábil que a conformação, e sim a fatores genéticos (Dujardin et al 2014). Enfatizamos que, de acordo com estudos moleculares, *T. b. brasiliensis*, é o membro do complexo que apresenta maior variabilidade genética (Monteiro et al 2004) o que também poderia ser um aspecto positivo para que mudanças fenotípicas pudessem ocorrer frente a pressões seletivas. No estado de PE, avaliações em nível estadual mostraram uma alta variabilidade fenotípica de *T. b. brasiliensis* e *T. b. macromelasoma*, em decorrência de eventos de hibridação. Eventos estes que geraram inúmeros fenótipos, tanto na conformação alar quanto nos padrões cromáticos (Costa et al 2016 e Gumiel 2011). Portanto, sugerimos a continuidade das investigações na área de estudo com a abordagem de outros parâmetros morfológicos, tais como análises da assimetria flutuante do tamanho e da conformação da asa, bem como a medição das variáveis macro e micro climáticos a fim de identificar fatores abióticos que possam gerar respostas adaptativas e/ou ecológicas que impliquem na capacidade vetorial de *T. b. brasiliensis*.

7. CONCLUSÕES

- Os resultados referentes a número de triatomíneos capturados nos ambientes silvestres, peridomiciliar e intradomiciliar mostraram que *T. b. brasiliensis* foi o vetor mais abundante e disperso em relação às espécies *T. pseudomaculata* e *T. petrocchiaie* nas localidades estudadas de Caicó, RN.
- A colonização de *Triatoma b. brasiliensis* é consistente e foi evidenciada no ambiente silvestre, no intradomicílio e, especialmente, no peridomicílio das UD's das áreas estudadas, atestando a persistência da infestação deste vetor em ecótopos artificiais.
- *Triatoma b. brasiliensis* foi a espécie que ocupou mais ecótopos (9 ecótopos), nos quais o curral de boi, construído com muros de pedras, foi o mais infestado do peridomicílio, destacando-se como refúgio para esta subespécie, pois parece reunir condições microclimáticas adequadas para o seu desenvolvimento no contexto de mudanças climáticas em áreas de intensa desertificação.
- Os altos índices de infecção natural de *T. b. brasiliensis* nos ambientes antrópicos e silvestres, bem como evidências do contato das pessoas com o vetor demonstram que as atividades de vigilância entomológicas ininterruptas associadas a campanhas de sensibilização da população residente em área endêmica são imprescindíveis nas localidades estudadas.
- As localidades em que *T. b. brasiliensis* apresentou as mais altas taxas de infecção natural por *T. cruzi*, segundo as três técnicas usadas, foram Sítio Inácio, Batalhão de Engenharia de Construção de Caicó e Sítio Riacho do Santo, locais com presença mais frequente de *K. rupestris*.
- Os resultados mostraram que 9 espécies (aves e mamíferos) compõem os recursos tróficos *T. b. brasiliensis* na área estudada, indicando que é uma subespécie de hábito alimentar eclético, confirmando dados da literatura.

- *Kerodon rupestris* foi a principal fonte alimentar detectada em espécimes infectados de ecótopos silvestres modificado/conservado e peridomiciliar, sugerindo que este roedor pode ser a provável fonte de infecção de *T. b. brasiliensis* não apenas nos ambientes silvestres, mas também de colônias estabelecidas no peridomicílio.
- A identificação de sangue humano no conteúdo intestinal de *T. b. brasiliensis* demonstra certo grau de antropofilia desta subespécie, o que indica o potencial risco de transmissão de *T. cruzi* para as pessoas residentes na área de estudo.
- A caracterização genética dos isolados de *T. cruzi* demonstrou a circulação das DTUs TcI e TcII no peridomicílio e no ambiente silvestre modificado/conservado, com predominância de TcI em ambos os ambientes, sugerindo sobreposição dos ciclos silvestre e peridomiciliar de *T. cruzi* mediados por *T. b. brasiliensis* e/ou *K. rupestris* nas áreas estudadas.
- A morfometria geométrica revelou variabilidade no tamanho e na conformação das asas entre as populações de *T. b. brasiliensis* da área estudada, mostrando-se eficiente para estudos populacionais.
- Dimorfismo sexual de tamanho (Inácio, Pedregulho, SRS e BEC) e de conformação (Inácio) foram evidenciados, sugerindo que machos e fêmeas se encontram sob diferentes pressões que podem estar relacionadas a disponibilidade/tipo da fonte alimentar, uma vez que as fêmeas demandam mais energia para reprodução e dispersão.
- Houve divergência no tamanho das asas (fêmeas e machos - Inácio, fêmeas - Pedregulho, machos - SRS e machos - SSBE) entre os ambientes peridomiciliar e silvestre modificado, indicando possível influência de fatores abióticos inerentes ao micro local do ecótopo (temperatura, umidade relativa, insolação, luminosidade, etc) e de fatores bióticos como o tipo/disponibilidade da fonte alimentar.

- As homogeneidades do TC (maioria das populações) e da conformação alar entre localidades refletem a similaridade das condições macro ambientais, uma vez que as localidades estudadas se situam em altitudes similares com o mesmo padrão climático do bioma Caatinga, dentro do mesmo município.
- As diferenças detectadas no TC das asas entre localidades possivelmente estão relacionadas a condições microclimáticas ecotípicas em conjunto com a disponibilidade de fonte alimentar (peridomicílio) e também devido a um possível isolamento por barreira física (muros altos) da população do ambiente silvestre conservado do BEC.
- Não houve diferença no TC e na conformação das asas entre grupos infectados e não infectados por *T. cruzi*, indicando que *T. cruzi* não induz mudanças nesses parâmetros morfométricos das asas de *T. b. brasiliensis*.

8. PERSPECTIVAS

- Dar continuidade aos estudos morfométricos com enfoque na assimetria alar que poderá avaliar, de forma indireta, se a infecção por *T. cruzi* pode ser considerada um fator de estresse para o desenvolvimento de *T. b. brasiliensis* e ainda medir outras variáveis que possam estar influenciando o desenvolvimento do vetor e, conseqüentemente, a sua morfologia nos diferentes ecótopos e/ou localidades.
- Levantar espécies de mamíferos e realizar estudos para esclarecer o seu *status* como hospedeiro/reservatório, bem como a identificação dos genótipos de *T. cruzi* nesses animais.
- Realizar pesquisa de *T. cruzi* nos bovinos para esclarecer o papel desse mamífero como dispersor, sentinela ou barreira da transmissão desse protozoário para população humana residente na área de estudo.
- Elaborar uma cartilha voltada para os técnicos das Secretarias de Vigilância em Saúde, resumindo de forma clara e objetiva, os resultados mais relevantes para as atividades de controle e monitoramento dos vetores da doença de Chagas.
- Desenvolver material educativo, que possa ser facilmente acessado pela população de Caicó, mostrando a importância e incentivando cuidados básicos para prevenção, bem como para impedir a domiciliação dos vetores em áreas de altas infestações peridomiciliares.
- Sensibilizar a população quanto a importância de afastar o *K. rupestris* dos ecótopos artificiais. Em casos de consumo da carne deste roedor, atentar para os cuidados durante o preparo para evitar contaminação por meio de lesões da pele ou mucosas. Não consumir carne malpassada, garantir a cocção da carne acima de 45°C para evitar a transmissão de *T. cruzi*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(7):2034-39.

Agarwala BK. Phenotypic plasticity in aphids (Homoptera: Aphididae): components of variations and causative factors. *Curr Sci* 2007;93:308–313.

Alencar JE. História natural da doença de Chagas no Estado do Ceará. Fortaleza: Imprensa Universitária; 1987;341p.

Almeida CE, Faucher L, Lavina M, Costa J, Harry M. Molecular Individual-Based approach on *Triatoma brasiliensis* : inferences on triatomine foci, *Trypanosoma cruzi* natural infection prevalence, parasite diversity and feeding sources. *PLOS Negl Trop Dis* 2016;10(2):e0004447.

Almeida CE, Folly-Ramos E, Peterson AT, Lima-Neiva V, Gumiel M, Duarte R, et al. Could *Triatoma sherlocki* be vectoring Chagas disease in small mining communities in Bahia, Brazil? *Med Vet Entomol* 2009;23:410-417.

Almeida CE, Oliveira HL, Correia N, Dornak LL, Gumiel M, Lima-Neiva V, et al. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. *Acta Trop* 2012;122:71-79.

Alvarado-Otegui JA, Ceballos LA, Orozco MM, Enriquez MM, Cardinal MV, Cura C, et al. The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. *Acta Trop* 2012;124:79-86.

Alves FM, Lima JS, Rocha FL, Herrera HM, Mourão GM, and Jansen AM. Complexity and multi-factoriality of *Trypanosoma cruzi* sylvatic cycle in coatis, *Nasua* (Procyonidae), and triatomine bugs in the Brazilian Pantanal. *Parasites & Vectors*, 2016;9(1),378.

Alves RRN, Mendonça ALET, Confessor MVA, Vieira WLS, Lopez LCS. Hunting strategies used in the semi-arid region of northeastern Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed* 2009;5:1-50.

Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanozoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* 1974;3:65-121.

Andrade SG. Caracterização morfológicas e histo-patológica de diferentes cepas do *Trypanozoma cruzi*. *Gaz Med Bahia* 1970;3:65-121.

Añez N, East JS. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 II. Its effect on feeding behavior of triatomine bugs. Acta Trop 1984;47:93-95.

Animal Diversity Web - University of Michigan - Museum of zoology - [homepage na internet]. *Kerodon rupestris* rock cavy [acesso em 30 de set 2017]. Disponível: http://animaldiversity.org/accounts/Kerodon_rupestris/#2799b73cf40f6268d5d785e8ff0b7b08.

Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:429-32.

Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world. Eur J Intern Med 2017;43:6-15.

Aragão MB. Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação a antropofilia e a ornitofilia? Rev Saúde Pública 1983;17:51-55.

Aragão MB. Sobre o comportamento de alguns insetos hematófagos. Arq Biol Tecnol 1975;18:3-23.

Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF. Paleoparasitology of Chagas disease - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104(sup. I):9-16.

Argibay HD, Orozco MM, Cardinal MV, Rinas MA, Arnaiz M, Mena Segura C, et al. First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in Northeastern Argentina. Parasitol 2016;143(11):1358-68.

Ashford RW. What it takes to be a reservoir host. Belg J Zool 1997;127:85-90.

Barbosa A, Carvalho F, Teixeira K. Seca histórica muda paisagens no RN e faz sertanejo querer ir embora. [acesso em 20 mai 2019] set. 2015. Disponível em: <http://g1.globo.com/rn/rio-grande-do-norte/noticia/2015/09/seca-historica-muda-paisagens-no-rn-e-faz-sertanejo-querer-ir-embora.html>.

Barbosa-Silva AN, Câmara ACJ, Martins K, Nunes DF, Oliveira PIC, Azevedo PRM, et al. Characteristics of Triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2016;49:57-67.

Barbosa-Silva AN. Avaliação do potencial de transmissão vetorial do *Trypanosoma cruzi* no estado do Rio Grande do Norte: aspectos epidemiológicos e taxonômicos de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), Tese [Doutorado do

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia]. Universidade Federal de Minas Gerais/Instituto de Ciências Biológicas;2017.

Barbosa-Silva AN. Distribuição da fauna triatomínica e infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi* em diferentes municípios do semiárido do Rio Grande do Norte, Dissertação [Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas] – Universidade do Rio Grande do Norte/Centro de Ciências da Saúde;2013.

Barnabé C, Mobarec HI, Jurado MR, Cortez JA, Brenière SF. Reconsideration of the seven discrete typing units within the species, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. *Infect Genet Evol* 2016;39:176-86.

Barret TV, Oliveira TSA. A *Trypanosoma*, indistinguishable from *Trypanosoma rangeli*, in the hemolymphs of *Rhodnius domesticus* from Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977;71(5):445-446.

Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS et al. Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e711.

Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MM, Madruga CR, Simões SD, Maia TF. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid region: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet Parasitol* 2007;143(2):174-181.

Batista VSP, Fernandes AF, Cordeiro-Estrela P, Sarquis O, Lima MM. Ecotope effect in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) suggests phenotypic plasticity rather than adaptation. *Medical and Vet Entomol* 2012;27(3):247-254.

Baylac M, Frieß M. Fourier descriptors, Procrustes superimposition, and data dimensionality: an example of cranial shape analysis in modern human populations. *Modern Morphometrics in Physical Anthropology*, 2005;6:145-165.

Baylac M, Villemant C, Simbolotti G. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biol J Linn Soc* 2003;80(1): 89-98.

Bezerra CM, Barbosa SE, Souza RCM, Barezani CP, Gürtler RE, Ramos JrAN, et al. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: food sources and diversity of *Trypanosoma cruzi* in wild and artificial environments of the semiarid region of Ceará, northeastern Brazil. *Parasit & Vectors* 2018;11:642-656.

Bezerra CM, Cavalcanti LP de G, Souza R de CM de, Barbosa SE, Xavier SC das C, Jansen AM, et al. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of

Trypanosoma cruzi in the Caatinga area colonized by *Triatoma brasiliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014;109(7):887–98.

Bock WJ. Preadaptation and multiple evolutionary pathways. Evol 1959;13:194-211.

Bookstein FL. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, Cambridge, 1991;456p.

Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceará State, northeastern Brazil. Acta Trop 2005;93:119–126.

Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L. Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) populations. J Med Entomol 2000; 37:872–877.

Botto-Mahan C, Ossa CG, Medel R. Direct and indirect pathways of fitness impact in a protozoan-infected kissing bug. Physiol Entomol 2008;33:25–30.

Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. PLoS Negl Trop Dis 2016;10(8):e0004792.

Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. Int J Parasitol 2000;30(1):35-44.

Brito RN, Gorla DE, Diotaiuti L, Gomes ACF, Souza RCM, Abad-Franch F. Drivers of house invasion by sylvatic Chagas disease vectors in the Amazon-Cerrado transition: A multi-year, state-wide assessment of municipality-aggregated surveillance data. PLoS Negl Trop Dis 2017;11(11):e0006035.

Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. Int J Parasitol 2007;37:1319–27.

Câmara ACJ, Lages-Silva E, Sampaio GHF, D'Ávila DA, Chiari E, Galvão LMC. Homogeneity of *Trypanosoma cruzi* I, II, and III populations and the overlap of wild and domestic transmission cycles by *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil. Parasitol Res 2013; 112:1543-1550.

Câmara ACJ, Varela-Freire AA, Valadares HMS, Macedo AM, D'Ávila DA, Machado CR, et al. Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop* 2010;115:205-211.

Camargo EP. Growth and differentiation in *T. cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1964;6:93-100.

Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC 1984. Inquérito sorológico de prevalência da infecção chagásica no Brasil. 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984;26:192-204.

Cabajal de la Fuente AL, Catalá S. Relationship between Antennal Sensilla Pattern and Habitat in Six Species of Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2002;vol.97(8):1121-1125.

Carcavallo RU, Segura CM, Canale DM. Ciclo de Vida de *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol y Vectores* 1994;1:43-49.

Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, et al. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol* 2008;38(13):1533-43.

Carvalho AE, Gariglio MA, Barcellos NDE. Caracterização das áreas de ocorrência de desertificação no Rio Grande do Norte. Rio Grande do Norte -Natal; 2000. [acesso em abr 2019]. Disponível em:

[https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:bX-
https://www.mma.gov.br/estruturas/sedr_desertif/ arquivos/panorama_riograndedonorte.doc+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:bX-https://www.mma.gov.br/estruturas/sedr_desertif/arquivos/panorama_riograndedonorte.doc+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br)

Cecere MC, Vasquez-Prokopec GM, Gürtler RE, Kitron U. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:803-810.

Chagas C. Nova tripanossomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 1909;1:159-218. In Cavalheiro RJ, Azevedo N, Araujo-Jorge TC, Lannes-Vieira J, Soeiro MNC, Klein L (Orgs). *Clássicos em Doença de Chagas: histórias e perspectivas no centenário da descoberta*. Ed. FIOCRUZ, 2009, p. 53-130.

Cominetti MC, Almeida RFC, Gonçalves GMA, Andreotti R. Monitoring *Trypanosoma cruzi* in triatomines using PCR in Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 2013;46:277-280.

Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2014;47(6):747-55.

Correia NC. Estudos sobre a competência e a capacidade vetorial de *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma juazeirensis* e seus híbridos experimentais, sob condições de laboratório. Rio de Janeiro. Dissertação [Medicina Tropical] – Instituto Oswaldo Cruz; 2015.

Costa J, Almeida CE, Dotson EM, Lins A, Vinhaes M, Silveira AC, et al. 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 2003a;98(4):443-449.

Costa J, Almeida CE, Dujardin JP, Beard CB. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2003b;98(5):637–639.

Costa J, Argolo AM, Felix M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa 2006;1385:47–58.

Costa J, Barges MD, Lima-Neiva V, Lawrence GG, Gumiel MX, Oliveira G, et al. Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of *Triatoma brasiliensis* species complex. Infect, Genet and Evol (Print) 2016; 37:77-87.

Costa J, Barth OM, Marchon-Silva V, Almeida CE, Freitas-Sibajev MG, Panzera F. Morphological studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) - Genital structures and eggs of different chromatic forms. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997a;92:493-498.

Costa J, Correia NC, Lima-Neiva V, Gonçalves TCM, Felix M. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2013;108:785-789.

Costa J, de Almeida JR, Britto C, Duarte R, Marchon-Silva V, Pacheco R. Ecotopes, natural infection and trophic resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1998;93(1):7–13.

Costa J, Dornak LL, Almeida CE, Peterson AT. Distributional potential of the *Triatoma brasiliensis* species complex at present and under scenarios of future climate conditions. *Parasit & Vectors* 2014;7:238.

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

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

Costa J, Marchon-Silva V. Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 1998;5:23-34.

Costa J, Townsend P, Beard CB. Ecological 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* 2002;67:516-520.

Costa JM, Jurberg J, Almeida JR. Estudos Bionômicos de *Dipetalogaster maximus* (Ulher, 1984) (Hemiptera – Triatominae). II – Influência da dieta sobre o ciclo biológico e resistência ao jejum. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987;82:111-118.

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010;465:S6–S7.

Coura JR. Tripanosomose, doença de Chagas. *Cienc Cult* 2003;55(1):30-33.

Coutinho CFS, Santos-Souza R, Teixeira NFD, Georg I, Gomes TF, Boia MN, et al. An entomoepidemiological investigation of Chagas disease in the State of Ceará, Northeast Region of Brazil. *Cad de Saúde Pública* 2014;30(4) 785-793.

D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920, in: Lumsden, W.H.R. e Evans, D.A. (eds.), *Biology of Kinetoplastida*. Academic Press, London 1976;1:328-403.

Dale C, Almeida CE, Mendonça VJ, Oliveira J, da Rosa JA, Galvão C, et al. An updated and illustrated dichotomous key for the Chagas disease vectors of *Triatoma brasiliensis* species complex and their epidemiologic importance *ZooKeys* 2018; 805:33–43.

Dario MA. Caracterização molecular de isolados de *Trypanosoma cruzi* provenientes de triatomíneos silvestres coletados no estado do Espírito Santo. Vitória. Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas] – Universidade Federal do Espírito Santo; 2013.

D'Ávila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, Castro AM, Machado CR, et al. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. J Clin Microbiol 2009;47:1718–25.

Darwin C. The Descent of man and selection in relation to sex. 2th ed. London: John Murray, Albermarle Street; 1874.

Deane MP, Mangia RH, Pereira NM, Momen H, Gonçalves AM, Morel CM. *Trypanosoma cruzi*: strain selection by different schedules of mouse passage of an initially mixed infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984;79:495–497.

Dias E, Pellegrino J. Alguns ensaios com o “Gamexanne” no combate aos transmissores da doença de Chagas. Brasil Médico 1948;62:185-190.

Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Netto EM, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. Rev da Soc Bras Med Trop 2008;41(3):296-300.

Dias FBS, Quartier M, Romaña CA, Diotaiuti L, Harry M. *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon. Infect Genet Evol 2010;10:1278–1281.

Dias E, Zeledón R. Infestação domiciliar em grau extremo por *T. infestans*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1955;53:473-486.

Dias JCP, Borges R. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. Ciência e Cultura 1979;31:105-124.

Dias JCP, Schofield CJ. The Evolution of Chagas Disease (American trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94(Suppl.1):103-121.

Dias JCP, Ramos AN Jr, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015 Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. Epidemiol Serv Saúde, Brasília 25 (esp) 2016;7-86.

Dias JCP. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: Silveira AC. O controle da Doença de Chagas nos países do Cone Sul da América: uma iniciativa internacional.

Organização Pan-Americana da Saúde. Minas Gerais: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro; 2002. p. 316.

Dias JCP. Os primórdios do controle da doença de Chagas. (Em homenagem a Emmanuel Dias, pioneiro do controle, no centenário de seu nascimento). Rev Soc Bras Med Trop 2011;44 (Suppl 2):12-8.

Díaz-Albiter HM, Ferreira TN, Costa SG, Rivas GB, Gumiel M, Cavalcante DR et al. Everybody loves sugar: first report of plant feeding in triatomines. Parasit Vectors 2016;(9):114.

Dorn PL, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. Am J Trop Med Hyg 1999; 60(5):740-5.

Dujardin JP, Beard CB, Ryckman R. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. Infect Genet Evol 2007;7(2):161-167.

Dujardin JP, Bermúdez H, Schofield CJ. The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. Acta Trop 1997a;66:145–153.

Dujardin JP, Bermúdez H, Casini C, Schofield CJ, Tibayrenc M. Metric differences between sylvatic and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia. J Med Entomol 1997b;34: 544-551.

Dujardin JP, Costa J, Bustamante D, Jaramillo N, Catalá S. Deciphering morphology in Triatominae: the evolutionary signals. Acta Trop 2009;110:101-111.

Dujardin JP, Dujardin S, Kaba D, Santillán-Guayasamín S, Villacís AG, Piyaselakul S, Sumruayphol S, Samung Y, Morales-Vargas R. The maximum likelihood identification method applied to insect morphometric data, Zoological Systematics 2017;42(1):46-58.

Dujardin JP, Kaba D, Solano P, Dupraz M, McCoy KD, Jaramillo ON. Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies? Infect Genet Evol 2014; 28:704–714.

Dujardin JP, Lam TX, Khoa PT, Schofield CJ. The rising importance of *Triatoma rubrofasciata*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2015;110(3):319-323.

Dujardin JP, Panzera F, Schofield CJ. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999a;94, 223–228.

Dujardin JP, Steindel M, Chavez T, Ponce C, Moreno J, Schofield CJ. Changes in sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999b;94:565-556.

Dujardin JP. Modern Morphometrics of medically important insects In: Genet Evol Infect Dis. Elsevier, 2011:473–501.

Dujardin S, Dujardin JP. Geometric morphometrics in the cloud. Infection, Genetics and Evolution. [publicação online]; 2019 [acesso em 11 fev 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30794886>.

Durán P, Siñani E, Depickère S. On triatomines, cockroaches and haemolymphagy under laboratory conditions: new discoveries Mem Inst Oswaldo Cruz 2016;111(10):605-613.

Falconer DS. Introduction to quantitative genetics [livro na internet]. New York: Ronald Press Co; 1960 [acesso em 13 ago 2018]. Disponível em: <https://archive.org/details/introductiontoq00falc>.

Felipe JLA, Rocha APB, Carvalho EA. Atlas Rio Grande do Norte: espaço geohistórico e cultural. João Pessoa: Grafset. 2011.

Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Carrasco D, Guarneri AA. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. 2014; PLoS One 9:e105255.

Fernandes AJ, Vitor RWA, Dias JCP. Avaliação parasitológica e sorológica de caprinos inoculados experimentalmente pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo 1994;36(1):11-17.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, et al. The complexity of sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. Parasitol 1999;118:161-166.

Folly-Ramos E, Dornak LL, Orsolon G, Goncalves TC, Lilio M, et al. Vector capacity of members of *Triatoma brasiliensis* species complex: the need to extend Chagas disease surveillance to *Triatoma melanica*. J. Vector Ecol 2016;41:48–54.

Foratini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação dos triatomíneos no Brasil. Rev Saúde Pública 1980;14:265-299.

Fordyce J. The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity. *J Exp Biol* 2006;209:2377-2383.

Forsman A. Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity*, 2014;115:276-284.

Freitas ALC, Freitas SPC, Gonçalves TCM, Neto AS. Vigilância entomológica dos vetores da doença de chagas no município de Farias Brito, estado do Ceará – Brasil. *Cad Saúde Coletiva*, 2007;15(2):231-240.

Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2006;2:226–35.

Freitas JLP, Ferreira DA, Garcia GHN. Resultado do combate intenso dos triatomíneos domiciliares em uma área restrita do Estado de São Paulo (distrito de Cassia de Coqueiros, município de Cajuru). In: *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro, Brasil. 1959;2:544-556.*

Fundação Nacional de Saúde. Coordenação Regional do Rio Grande do Norte. Projeto de Controle de Doenças Endêmicas no Nordeste. Rio Grande do Norte, FUNASA; 1996.

Futuyma DJ. *Biologia Evolutiva*. São Paulo: FUNPEC – RP; 1995. p.646.

Ghalambor C, McKay J, Carroll S, Reznick D. Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct Ecol* 2007;21:394–407.

Ghalambor CK, Hoke KL, Ruell EW, Fischer EK, Reznick DN, Hughes KA. Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature* 2015;525:372–375.

Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J. 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* 2003;202:1-36.

Galvão C, Gurgel-Gonçalves R. Vetores conhecidos no Brasil. In: Galvão, C. *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia;2015. p. 88-169.

Galvão C, Paula AS. Sistemática e evolução dos vetores. In: Galvão, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia;2015. p. 26-32.

Gangur AN, Smout M, Liddell MJ, Seymour JE, Wilson D, Northfield TD, 832 2017. Changes in predator exposure, but not in diet, induce phenotypic plasticity in 833 scorpion venom. The Royal Society, Proc R Soc B 2017;284:20171364.

Gariglio MA, Sampaio EVde Sá B, Cestaro LA, Kageyama PY, organizadores. Ministério do Meio Ambiente. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010 [acesso em 3 de mar 2018].

Disponível em:

http://www.mma.gov.br/estruturas/sfb/arquivos/web_uso_sustentvel_e_conservao_dos_recursos_florestais_da_caatinga_95.pdf.

Garzon EA, Barnabé C, Cordova X, Bowen C, Paredes W, Gomez E, et al. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002;96(4):378-82.

Góes C. Chega a 40 o número de pessoas em tratamento por causa de surto da doença de Chagas [homepage na internet]. [acesso em 24 jul 2019]. Disponível em:

<https://g1.globo.com/pe/pernambuco/noticia/2019/06/28/chega-a-40-numero-de-pessoas-em-tratamento-por-cao-de-surto-de-doenca-de-chagas.ghtml>.

Gonçalves TCM. Aspectos ecológicos de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae) com caracterização das amostras de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas desse triatomíneo no município de Santa Maria Madalena, RJ. Tese [Doutorado em Biologia Parasitária] - Instituto Oswaldo Cruz; 2000.

Gonçalves TCM, Freitas ALC, Freitas SPC. Surveillance of Chagas disease vectors in municipalities of the state of Ceará, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, December 2009;104(8):1159-1164.

Gorur G, Lomonaco C, Mackenzie A. Phenotypic plasticity in host-plant specialization in *Aphis fabae*. Ecol Entomol 2005;30:657–664.

Grewal, MS. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host Exp Parasitol 1957;6:123-130.

Grimaldi D, Engel MS. Evolution of the insects, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; p. 772.

Guarneri AA, Pereira MH, Diotaiuti L. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae) J Med Entomol 2000; 37:373–379 [PubMed: 15535580].

Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Cárdenas A-Arroyo F, Aufderheide A. Chagas disease and human migration. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95(4):553-555.

Gumiel M, Catalá S, Noireau F, Rojas de Arias A, García A, Dujardin JP. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martínez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae) Syst Entom 2003;28:173-179.

Gumiel MX. Estudo da variabilidade morfológica e do perfil isoenzimático em triatomíneos do complexo de espécies *Triatoma brasiliensis* do Estado de Pernambuco, Brasil. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] - Instituto Oswaldo Cruz; 2011.

Gurevitz JM, Ceballos LA, Kitron U, Gürtler RE. Flight initiation of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) under natural climatic conditions. J Med Entomol 2006; 43:143–150.

Gurevitz, JM, Kitron U, Gürtler R.E. () Flight muscle dimorphism and heterogeneity in flight initiation of field collected *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). J Med Entomol 2007; 44:186–191.

Gurgel-Gonçalves R, Galvão C, Costa J, Townsend P. Geographic distribution of Chagas disease vectors in Brazil based on ecological niche modeling. J Trop Med 2012;1-15.

Gurgel-Gonçalves R, Pereira FCA, Cavalcante RR. Distribuição geográfica, infestação domiciliar e infecção natural de triatomíneos (Hemiptera:Reduviidae) no estado do Piauí, Brasil, 2008. Pan-Amaz Saúde 2010;1:57-64.

Gurgel-Gonçalves R, Pereira FCA, Lima IP, Cavalcante RR. Distribuição geográfica, infestação domiciliar e infecção natural de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) no Estado do Piauí, Brasil, 2008. Rev Pan-Amaz Saúde 2010;1:57-64.

Gürtler RE, Cardinal MV. Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 2015;151:32-50.

Gürtler R, Cecere M, Lauricella M, Cardinal M, Kitron U, Cohen J. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitol* 2007;134:69-82.

Hall T. Bioedit biological sequence alignment editor. Version 7.0.4. Ibis Therapeutics, Carlsbad, 2005.

Heitzmann-Fontenelle T. Bionomia comparativa de triatomíneos. V- *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Butantan* 1983/84;47/48:165-174.

Hernández ML, Abraham LB, Dujardin JP, Gorla DE, Catalá SS. Phenotypic variability and population structure of peridomestic *Triatoma infestans* in rural areas of the arid Chaco (Western Argentina): spatial influence of macro- and microhabitats. *Vector Borne Zoonotic* 2011; 11:503–513.

Hernández ML, Dujardin JP, Gorla DE, & Catalá SS. Potential sources of *Triatoma infestans* reinfesting peridomiciles identified by morphological characterization in Los Llanos, La Rioja, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013;108:91-97.

Hernández ML, Amelotti I, Catalá S, Gorla DE. Does nutrition influence sexual dimorphism in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) of natural habitats? *Rev Soc Entomol Arg* 2018;77(1):1-8.

Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics. *J Parasitol* 1964;11:200-207.

Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972.

Hypša V, Tietz DF, Zrzavy J, Rego ROM, Galvão C, Jurberg J. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 2002;23:447-457.

Huang YL, Huang DN, Wu WH, Yang F, Zhang XM, Wang M, et al. Identification and characterization of the causative triatomine bugs of anaphylactic shock in Zhanjiang. *China Infect Dis Poverty*. 2018;7:127.

Ibanez-Cervantes G, Martinez-Ibarra A, Noguera-Torres B, Lopez-Orduna E, Alonso AL, Perea C, et al.. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. *Parasitol Int* 2013;62(1):36-43.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. História & Fotos 2018 [acesso em jul 2018]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/caico/historico>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage na internet]. Panorama demográfico 2018 [acesso em jul 2018]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/caico/panorama>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010 [homepage na internet]. [acesso em 23 de mar 2018]. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/9662-censo-demografico-2010.html?=&t=series-historicas>.

Instituto de desenvolvimento sustentável e meio-ambiente [homepage na internet]. Anuário Estatístico do Rio Grande do Norte 2015 [acesso em 15 de novembro de 2017]. Disponível em: <http://www.idema.rn.gov.br>.

Instituto Nacional de Meteorologia [homepage na internet]. [acesso em 17 de nov 2017]. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>.

Instituto Nacional de Meteorologia [homepage na internet]. Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa [acesso em novembro 2017]. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>.

Jansen AM, Santos de Pinho AP, Lisboa CV, Cupolillo E, Mangia RH, Fernandes O. The sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi*: a still unsolved puzzle. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94(Suppl 1):203-4.

Jansen AM, Xavier SC, Roque AL. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. Acta Trop 2015;151:1-15.

Juarez E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. Rev Saude Pub 1970;4:147-166.

Junqueira ACV. Diagnóstico Parasitológico do *Trypanosoma cruzi*, módulo II In: Coura JR, Junqueira ACV, Gonçalves TCM, Moreira CJC (orgs). Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública. 2ª edição; 2011, p. 71-152.

Jurberg J, Rodrigues JMS, Moreira FFF, Dale C, Cordeiro IRS, Lamas JR, Galvão C, Rocha DS. Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil (Vetores da doença de Chagas. Instituto Oswaldo Cruz, 2014;p. 52.

Kenyon SG e Hunter MS. Manipulation of oviposition choice of the parasitoid wasp, *Encarsia pergandiella*, by the endosymbiotic bacterium *Cardinium*. J Evol Biol 2007;20:707–716.

Kierszenbaum F, Gottlieb CA, Budzko DB. Antibody-independent, natural resistance of birds to *Trypanosoma cruzi* infection. J. Parasitol 1981; 67(5):656-60.

Kocher TD et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86(16):6196-6200.

Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. Parasitol Today 2000;16:381-7.

Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. J. Eukaryot Microbiol 1998; 45:59–63.

Krinsky WL. Animal disease agents transmitted by horses flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). J Med Entomol 1976;13(3):225-275.

Kropf SP, Massarani L. Carlos Chagas, a ciência a combater doenças topicais. Rio de Janeiro: Museu da Vida/Casa de Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ; 2009. p.16.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol, 2016;33(7):1870-4.

Lazzari CR. Circadian organization of locomotion activity in the hematophagous bug *Triatoma infestans*. J Insect Physiol 1992;38:895-903.

Leal IR, Da Silva JM, Tabarelli M, Lacher TE. Changing the course of biodiversity conservation in the Caatinga of northeastern of Brazil. Conservation Biology 2005;19:701-706.

Lehane MJ. The Biology of Blood-sucking in Insects Cambridge University Press, Cambridge; 2005.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease, *Bull. Am Mus Nat Hist* 1979;163:127-520.

Lent H. Evolução dos conhecimentos sobre os vetores da doença de Chagas, 90 anos após a sua descoberta. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:89-92.

León CM, Hernández C, Montilla M, Ramírez JD. Retrospective distribution of *Trypanosoma cruzi* I genotypes in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015; 110(3):387-93.

Levis NA, Schooler ML, Johnson JR, Collyer ML. Non-adaptive phenotypic plasticity: the effects of terrestrial and aquatic herbicides on larval salamander morphology and swim speed, Biol J Linn Soc 2016;118(3):569–581.

Lewis JH. Comparative Haemostasis in Vertebrates Plenum Press, New York; 1996.

Lilioso M, Folly-Ramos E, Rocha FL, Rabinovich J, Capdevielle-Dulac C, Harry M, et al. High *Triatoma brasiliensis* densities and *Trypanosoma cruzi* prevalence in domestic and peri-domestic habitats in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: the source for Chagas disease outbreaks? Am J Trop Med Hyg. 2017;96(6):1456-1459

Lilioso M. Ecoepidemiologia de *Triatoma brasiliensis* nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte: indicadores entomológicos e estruturas ecotípica e composicional etária. Dissertação [Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ecologia e Monitoramento Ambiental] – Universidade Federal da Paraíba/ Centro de Ciências Aplicadas e Educação; 2015.

Lima ACB. Estudos de peptídeos antimicrobianos das espécies do complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). Rio de Janeiro. Dissertação [Biodiversidade e Saúde] – Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Lima L, Espinosa-Alvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varon JA, Carranza JC, Pinto CM, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 2015;151:166-77.

Lima MM, Pereira JB, Santos JAA, Pinto ZT, Braga MV. Development and reproduction of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi*, under laboratory conditions Ann Entomol Soc Am 1992; 85:458-461.

Lima MM, Sarquis O, de Oliveira TG, Gomes TF, Coutinho C, Daflon-Teixeira NF, et al. Investigation of Chagas disease in four periurban areas in northeastern Brazil: epidemiologic survey in man, vectors, non-human hosts and reservoirs. Trans R Soc Trop Med Hyg 2012;106:143-149.

Lima-Neiva V, Araujo CAC, Gumiel MX, Duarte R, Costa J, Jansen AM, et al. Molecular Characterization of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) isolates from *Triatoma sherlocki*, *Triatoma melanica* e *Triatoma juazeirensis*, naturally infected from Bahia state, Brazil. In: Simpósio Internacional Centenário da descoberta Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 2009.

Lima-Neiva V, Gonçalves TCM, Bastos LS, Gumiel M, Correia NC, Silva CC, et al. Biology of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae) Under Laboratory Conditions: Biological Cycle and Resistance to Starvation. J Med Entomol 2017;54(4):831-836.

Lima-Neiva V, Gumiel M, Lima MM, Gonçalves TCM, Provance DW, Almeida CE, et al. Deposition, incubation period and hatching of eggs from *Triatoma juazeirensis* Costa & Felix and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. EntomoBrasilis 2012;5:130-136.

Lima-Neiva V. Aspectos biológicos e potencial vetorial de *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) em condições de laboratório. Rio de Janeiro. Dissertação [Medicina Tropical] – Instituto Oswaldo Cruz; 2014.

Liu Q, Guo YH, Zhang Y, Zhou ZB, Zhang LL, Zhu D, Zhou XN. First records of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Reduviidae) in Foshan, Guangdong Province, Southern China. Infect Dis Poverty. 2017;6:129

Llewellyn MS, Lewis MD, Acosta N, Yeo M, Carrasco HJ, Segovia M, et al. *Trypanosoma cruzi* Ilc: phylogenetic and phylogeographic insights from sequence and microsatellite analysis and potential impact on emergent Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis 2009b;3:e510.

Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, et al. Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. PLoS Pathog 2009a;5(5):e1000410.

Lorenzo MG, Guarneri AA, Pires HH, Diotauti L, Lazzari CR. Microclimatic properties of the *Triatoma brasiliensis* habitat. Cad Saúde Pública 2000;16:69-74.

Lorosa ES, Andrade RE, Faria MS, Valente MVMP, Jurberg J. Preferência alimentar de ninfas de 1º estágio de algumas espécies de triatomíneos do “complexo oliveirai” (Hemiptera, Reduviidae) em condições de laboratório. Revista brasileira de Zoociências 2008;10(2):163-170.

Lorosa ES, Jurberg J, Souza ALA, Vinhaes MC, Nunes IM. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol y Vectores* 2000;7(3):287-296.

Lucena DT, Verguetti JG. Infecção natural de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) por *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) no interior do estado de Alagoas. *Inst Med Trop* 1973;15:171-178.

Lucena DT. Doença de Chagas no Nordeste. *Rev Bras Malariol D Trop* 1959;v.11, n.4, p. 675-696.

Lucena DT. Estudos sobre a doença de Chagas no Brasil. *Rev Bras Malariol D Trop* 1970; v. 22, p. 3-173.

Lyytinen A, PM Brakefield, LLindström and J Mappes. Does predation maintain eyespot plasticity in *Bicyclus anynana*? *Proc R Soc Lond B* 2004;271: 279–283.

Malmqvist B, Strasevicius D, Hellgren O, Adler PH, Bensch S. Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Proc R Soc Lond B*, 2003;271:152–155.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitol* 2009;136:641-55.

Marengo JA. Water and climate change. *Estudos Avançados* 2008;22:63.

Martins K, Andrade CM, Barbosa-Silva AN, Nascimento GB, Chiari E, Galvão LMC, et al. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int J Infect Dis* 2015;39:68-75.

Martins-Melo FR, Ramos Júnior AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop* 2014;130:167-74.

Mendonça VJ, Alevi KC, Medeiros LM, Nascimento JD, Azeredo-Oliveira MT, Rosa JA. Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa et al., 2002 (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol* 2014;26:123-131.

Mendonça VJ, Alevi KCC, Pinotti H, Gurgel-Gonçalves R, Pita S, Guerra, et al. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa* 2016;4107:239–254.

Mendonça VJ, Silva MTA, Martins J, Bacci Júnior M, Costa J, Cicarelli RMB, et al. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am J Trop Med Hyg* 2009;81:858-854.

Menu F, Ginoux M, Rajon E, Lazzari C R, and Rabinovich JE. Adaptive developmental delay in Chagas disease vectors: an evolutionary ecology approach. *PLoS Negl. Trop. Dis* 2010;4:e691.

Miles MA, Lanham SM, de Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1980;74(2):221-37.

Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978;272:819-21.

Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977;71(3):217-25.

Ministério do Meio Ambiente. Atlas das áreas susceptíveis à desertificação do Brasil/MMA, Secretaria de Recursos Hídricos, Universidade Federal da Paraíba; Marcos Oliveira Santana, org. Brasília. 2007 [homepage na internet] [acesso em 13 de abr 2015]. Disponível em:
http://www.mma.gov.br/estruturas/sedr_desertif/_arquivos/129_08122008042625.pdf

Minuzzi-Souza TTC, Nitz N, Cuba CAC, Hagström L, Hecht MM, Santana C, et al. Surveillance of vector-borne pathogens under imperfect detection: lessons from Chagas disease risk (mis)measurement. *Sci Rep.* 2018;8:151.

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

Monteiro WM, Magalhaes LKC, de Sá ARN, Gomes ML, Toledo MJO, Borges L, et al. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS One* 2012;7(7):e41284.

Monteiro LR, S.F. Reis SF. Princípios de morfometria geométrica. Holos Editora, Ribeirão Preto. 1999;189p.

Moreira OC, Verly T, Finamore-Araujo P, Gomes SAO, Lopes CM, de Sousa DM et al. Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. Parasit Vectors 2017;10,404.

Morel CM, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci USA 1980;7:6810-6814.

Nattero J, Dujardin JP, del Pilar FM, Gürtler RE. Host-feeding sources and habitats jointly affect wing developmental stability depending on sex in the major Chagas disease vector *Triatoma infestans*. Infect Genet Evol 2015;36:539–546.

Nattero J, Malerba R, Rodríguez CS, Crocco LB. Phenotypic plasticity in response to food source in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). Infect Genet Evol 2013;19:38–44.

Nattero J, Piccinali RV, Macedo LC, Hernández ML, Abrahan L, Lobbia PA, et al. Morphometric variability among the species of the Sordida subcomplex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): evidence for differentiation across the distribution range of *Triatoma sordida*. Parasit & Vectors 2017; 10:412.

Neiva A. Contribuição para o estudo dos Reduvidas harnatófagos. Mem Inst Oswaldo Cruz 1914;6(1):35-39.

Nicolle GL. Culture du parasite du Boutond’Orient. Comptes rendus de l’Académie des Sciences 1908; 1:1-30.

Nóbrega AA, Garcia HM, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J and Araujo WN. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. Emerg Infect Dis 2009;15(4):653-5.

Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. Vet Res 2009;40(2):26.

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

Noireau F, Gutierrez T, Zegarra M, Flores R, Brenière F, Cardozo L, Dujardin J-P. Cryptic speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. *Trop Med and Int Health* 1998;3(5):364–372.

Nouvellet P, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E, Gourbiere S. Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatan peninsula, Mexico. *Inf Genet Evol* 2011;11:1243–1249.

Novy FG, McNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 1904;1:1–30.

Oliveira J, Alevi KCC. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. *Rev da Soc Bras de Med Trop* 2017;50(3):434-435.

Oliveira J, Marcet PL, Takiya DM, Mendonça VJ, Belintani T, Bargues MD, et al. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the *Brasiliensis* subcomplex. *Acta Trop* 2017;170:140-8.

Oliveira TG, Carvalho-Costa FA, Gomes TF, Sarquis O, Sposina R, Lima MM. Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with *Trypanosoma cruzi* under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2010; Vol. 105(8):1057-1060.

Ostermayer AL, Passos ADC, Silveira AC, Ferreira AW, Macedo V, Prata AR. The national survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001-2008). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(Suppl 2):108-121.

Paula AS, Diotaiuti L, Galvão C. Systematics and biogeography of Rhodniini (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. *J Biogeography* 2007;34:699-712.

Paula AS, Diotaiuti L, Schofield CJ. Testing the sister-group relationship of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol Phyl Evol* 2005;35:712-718.

Passos ADC, Silveira AC, “Summary of results from the national surveys,” *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44(supl.2):47–50.

Pener MP, Simpson SJ. Locust phase polyphenism: an update. *Adv. Insect Physiol* 2009;36:1–272.

Perondini ALP, Costa MJ, Brasileiro VLF. Biologia de *Triatoma brasiliensis* II Observações sobre a autogenia Rev Saúde Publ 1975; 9:363-70.

Pigliucci M. Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? Trends Ecol Evol 2005;20:481–486.

Pigliucci M, Murren CJ, Schlichting CD. Phenotypic plasticity and Evolution by genetic assimilation. J Exp Biol 2006;209:2362–2367.

Pinazo MJ, Miranda B, Rodríguez-Villar C, Altclas J, Brunet Serra M, García-Otero EC, et al. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. Transplant Rev (Orlando) 2011;25(3):91-101.

Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Lascano MS, Grijalva MJ. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. J Parasitol 2006;92:1251–1255.

Poinar Jr GA. Primitive triatomine bug *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. Crataceous Research 2019;93:90-97.

Poulin R, Thomas F. Phenotypic variability induced by parasites: extent and evolutionary implications. Parasitol Today 1999;15: 28–32.

Ramírez JD, Tapia G, Muñoz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, et al. Trypanosome species in neotropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. Infect Genet Evol 2014;22:250-6.

Ramírez JD, Turriago B, Tapia-Calle G, Guhl F. Understanding the role of dogs (*Canis lupus familiaris*) in the transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Colombia. Vet Parasitol 2013;196:216-9.

Ramirez-Sierra MJ, Herrera-Aguilar M, Gourbière S, Dumonteil E. Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of infestation in rural villages and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*. Trop Med Int Health 2010;15:77–86.

Ramos-Ligonio A, Torres-Montero J, Lopez-Monteon A, Dumonteil E. Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. Infect Genet Evol 2012;12(7):1341-3.

Rassi AJ, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. 2010;375:1388-1402.

Ricardo-Silva A, Gonçalves TCM, Luitgards-Moura JF, Lopes CM, Silva SP, Bastos AQ, et al. *Triatoma maculata* colonises urban domiciles in Boa Vista, Roraima, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Brazil 2016;Vol.111(11): 703-706.

Rio Grande do Norte. Secretaria de Recursos Hídricos. Programa de Ação Estadual de Combate à Desertificação e Mitigação dos Efeitos da Seca do Rio Grande do Norte – PAE/RN. Natal/RN, 2010;248p.

Rohlf FJ, Slice DE. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. Syst Zool 1990;39:40-59.

Rohlf FJ, Corti M. The use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. Systematic Biology, 2000;49(4):740–753.

Roman F, Iñiguez AM, Yeo M and Jansen AM. Multilocus sequence typing: genetic diversity in *Trypanosoma cruzi* I (TcI) isolates from Brazilian didelphids. Parasit & Vectors 2018;11:107.

Roque ALR, Jansen AM. Importância dos animais domésticos sentinelas na identificação de áreas de risco de emergência de doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop 2008;4(Supl 3):191-193.

Roque ALR, Jansen AM. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In Galvão C org. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. Zoologia: guias e manuais de identificação séries. 2014; p. 75-87.

Roque ALR, Xavier SCC, da Rocha MG, Duarte ACM, D'Andrea PS, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* transmission cycle among wild and domestic mammals in three areas of orally transmitted Chagas disease outbreaks. Am J Trop Med Hyg 2008;79(5):742–9.

Rosa JA, et al. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). ZooKeys. In press;2017.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 1998.

Sandoval CM, Joya M, Gutiérrez M, Angulo VM. Cleptohaematophagy in *Belminus herreri*. Med Vet Entomol 2000;14:100-101.

Santalla-Vargas J, Oporto P, Espinoza E, Rios T, Brutus L, Garcia L. Oral transmission of Chagas disease, first reported outbreak in Bolivia. In: Rozas-Dennis GS, Silva M, editores. Workshop Internacional de la enfermedad de Chagas,

vectores triatominos, *Trypanosoma cruzi* y *Triatoma* virus. Bolívia: Universidad Mayor de San Simón Cochabamba; 2012. p. 61.

Santos V, Meis J, Savino W, Andrade JAA, Vieira J, Coura JR, et al. Acute Chagas disease in the state of para, Amazon region: is it increasing? Mem Inst Oswaldo Cruz 2018;113:e170298.

Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Oliveira LS, Duarte R, D Andrea PS, de Oliveira TG, Lima MM. Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: seasonal distribution, feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population J Vector Ecol 2010; 35: 385–394.

Sarquis O, Carvalho-Costa FA, Toma HK, George I, BurgoA MR, Lima MM. Ecoepidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in the sylvatic, peridomestic and domestic environments. Parasitol Research 2012;10(4): 1481-5.

Sarquis O, Sposina R, Oliveira TG, MacCord JR, Cabello PH, Borges-Pereira J, et al. Aspects of peridomiciliar ecotopes in rural areas of Northeastern Brasil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors os Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;101(2):143-147.

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

Schaub GA. Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi* Trans R Soc Trop Med Hyg 1988; 82:94–97.

Schaub GA. The effects of trypanosomatids on insects Adv Parasitol 1992;31:255–319.

Schmid-Hempel, P. 2005. Evolutionary ecology of insect immune defenses. Annu Rev Entomol 2005;50: 529–551.

Schmidt KA, Ostfeld RS. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. Ecology 2001;82(3):609-619.

Schofield CJ, Dias JC. The Sourthen Cone Initiative against Chagas disease. Adv Parasitol 1999;42:1-27.

Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop 2009;110,88–100.

Schofield CJ. Biosystematics of the Triatominae. In: Biosystematics of Haematophagous Insects (M.W. Service, Ed.). Oxford: Clarendon Press; 1988. p. 285- 312.

Schofield CJ. *Trypanosoma cruzi* the vector parasite paradox. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95:535-544.

Sherlock IA, Guitton N. Sobre o *Triatoma petrocchiae* Pinto e Barreto, 1925 (Hemiptera: Reduviidae). Ver Brasil Malariol D Trop 1974;19(4):625-632.

Sherlock IA & Serafim EM. Fauna Triatominae do Estado da Bahia. Brasil. I – As espécies e distribuição geográfica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1972;6:265–276.

Shingleton AW, Frankino WA, Flatt T, Nijhout HF and Emlen DJ. Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. BioEssays 2007;29:536–548.

Silva MBA, Barreto AVMS, Silva HA, Galvão C, Rocha D, Jurberg J, et al. Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the State of Pernambuco, Brazil: geographical distribution and natural *Trypanosoma* infection rates between 2006 and 2007. Rev Soc Bras Med Trop; 2012;45:60-65.

Silva RAMS, Seidl A, Ramirez L, Dávila AMR. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: Biologia, Diagnóstico e controle. Corumbá: Embrapa Pantanal 2002;141p.

Silveira AC. Situação do controle da transmissão vetorial da doença de Chagas nas Américas. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. Cad Saúde Pública 2000;16(Sup. 2):35-42.

Silveira AC, Arias AR, Segura E, Guinllén G, Russomando G, Schenone H, et al. El control de la enfermedad de Chagas em los países del Cono Sur de América: História de uma iniciativa internacional. 1991/2001. Organização Pan-Americana da Saude 2002; p. 316.

Silveira AC, Dias JCP. “O controle da transmissão vetorial”. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44:52-63.

Silveira AC, Feitosa V R, Borges R. “Distribution of Triatominae captured in a domestic environment, 1975/83, Brazil.” Rev Bras Malariol D Trop 1984;36:15-312.

Silveira AC, Vinhaes MC. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94(Suppl.I):405-411.

Silveira AC. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44:122-124.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2019 [Homepage na internet]. [acesso em jul de 2019]. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet/epidemiologicas-e-morbidade>

Soares RP, Graças-Evangelista L, Laranja LS, Diotaiuti L. Population dynamics and feeding behavior of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata*, main vectors of Chagas disease in Northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000;95:151-155.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1996;83:141-52.

Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequences. Mol Biochem Parasitol 1993;62:45-52.

Sousa DM. Aspectos ecoepidemiológicos e áreas de vulnerabilidade da doença de Chagas associadas a ações de educação em saúde na região do Cariri, estado do Ceará. Rio de Janeiro. Tese [Medicina Tropical] - Instituto Oswaldo Cruz; 2016.

Steindel M, Pacheco LK, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State. Brazil Diagn Microbiol Infect Dis 2008;60:25–32.

Sturm NR, Campbell DA. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 2010;115:35-43.

Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. Molecular and Biochemical Parasitol 1989;33(3):205-214.

Sugahara R, Tanaka S. Environmental and hormonal control of body color polyphenism in late-instar desert locust nymphs: role of the yellow protein. Insect Biochem. Mol. Biol. 2018;93:27–36.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis 2012;6(8):e1749.

Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrenc M, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol* 2006;114:279-288.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:442-7.

Tobie EJ. Increased infectivity of a cyclically maintained strain of *Trypanosoma rangeli* to *Rhodnius prolixus* and mode of transmission by invertebrate host *J Parasitol* 1964;50:593-598.

Tobie EJ. Observations on the development of *Trypanosoma rangeli* in the hemocoel of *Rhodnius prolixus*. *J Invertebr Pathol*; 1970;15:118-25.

Truong LX, Dujardin JP. Epidemiological status of blood sucking bugs *Triatoma rubrofasciata* (Triatominae: Reduviidae) and risk of parasitosis in Hanoi, Vietnam. *Proceedings of the Epidemiological Status of Kissing Bugs in Vietnam Workshop, 2013 Jun 17-21, Hanoi, Vietnam, Nafosted, Hanoi. 2013;28-34.*

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001;1:472-481.

Uehara LA, Moreira OC, Oliveira AC, Azambuja P, Lima APCA, et al. Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(12):e1958.

Valença-Barbosa C, et al. Molecular Identification of Food Sources in Triatomines in the Brazilian Northeast: Roles of Goats and Rodents in Chagas Disease Epidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 2015;93(5):994-997.

Valença-Barbosa C, Lima MM, Sarquis O, Bezerra CM, Abad-Franch F. Short report: A common Caatinga cactus, *Pilosocereus gounellei*, is an important ecotope of wild *Triatoma brasiliensis* population in the Jaguaribe Valley of Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2014;90:1059-1062.

Valente VC, Valente SAS, Noireau F, Carrasco HJ, Miles M. Chagas disease in the Amazon Basin: association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. *J Med Entomol* 1998;35:99-103.

Vargas A, Malta JMAS, Costa VMD, Cláudio LDG, Alves RV, Cordeiro GDS, et al. Investigation of an outbreak of acute Chagas disease outside the Amazon Region, in Rio Grande do Norte State, Brazil, 2016. *Cad Saúde Pública*. 2018;34(1):e00006517.

Vasquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Cecere MC, Gürtler RE. Seasonal variations of micro-climatic conditions in domestic and peridomestic habitats of *Triatoma infestans* in rural northwest Argentina. *Acta Trop* [PubMed: 12443801] 2002; 84:229–238.

Vicente T, Câmara AC, *Trypanosoma cruzi* circulating among dogs and triatomines in the endemic countryside of the State of Rio Grande do Norte, Brazil, *Acta Tropica* 2019; <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105067>

Villemant C, Simbolotti G, Kenis M. Discrimination of Eubazus (Hymenoptera, Braconidae) sibling species using geometric morphometrics analysis of wing venation. *Syst Entomol* 2007;32(4):625-634.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública* 2000;16(Suppl 2):7-12.

Wagner GP. On the eigenvalue distribution of genetic and phenotypic dispersion matrices - evidence for a nonrandom organization of quantitative character variation. *J Math Biol*, 1984;21:77–95.

Walter A, Rego PI, Ferreira AJ, Rogier C. Risk factors for reinvasion of human dwellings by sylvatic triatomines in northern Bahia State, Brazil. *Cad de Saúde Pública* 2005;21(3):974-978.

Weirauch C. Cladistic analysis of Reduviidae (Heteroptera: Cimicomorpha) based on morphological characters. *Syst Entomol* 2008;33:229-274.

West-Eberhard MJ. The social biology of polistine wasps. *Misc Publ Mus Zool, Univ Michigan* 1969;140:1–101.

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop. Med. Hyg* 1994;51:771-777.

Whitman DW, Agrawal AA. What is phenotypic plasticity and why is it important. In: Whitman DW, Ananthakrishnan TN (Eds.), *Phenotypic Plast. insects Mech. consequences*, Science Publishers, 2009;1–63.

World Health Organization 2002 [homepage na internet]. Control of Chagas disease - Second report of the WHO Expert Committee - Geneva 2002 [acesso em 03 de mar 2018].
Disponível em:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42443/WHO_TRS_905.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

World Health Organization 2010 [homepage na internet]. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases - First WHO report on neglected tropical diseases [acesso em 16 de mar 2013]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/

Yefi-Quinteros E, Muñoz-San MC, Bacigalupo A, Correa JP, Cattán PE. *Trypanosoma cruzi* load in synanthropic rodents from rural areas in Chile, Parasit & Vectors, 2018; 11(171):1-7.

Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL. Geometric Morphometrics for Biologists: a Primer. London: Elsevier Academic Press 2004;443p.

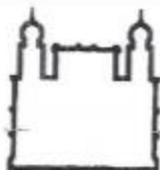
Zeledón R. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas' disease. Trypanosomiasis and Leishmaniasis with reference to Chagas' disease. 20 Ciba Foundation Symposium (new series), Amsterdam 1974;51-85.

Zeledón R, Guardia VM, Zúñiga A, Swartzwelde JC 1970. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). II. Life span of adults and fecundity and fertility of females. J Med Entomol 1970;7:462-469.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:1051-1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol 2012;12:240-53.

Zingales B, Souto MRH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil. Basis on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. Int J Parasitol 1998;28:105-112.



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-008/2015

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-025/2014), intitulado "Estudos biológicos sobre vetores da doença de Chagas", sob a responsabilidade de **JANE MARGARETH COSTA VON SYDOW** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 01/06/2019 e inclui o uso total de:

Camundongo, cepa:

Mus musculus Swiss Webster – 9600 animais fêmeas adultas

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 04 de maio de 2015.

Flávio Alves Lara

Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz