

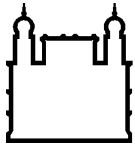
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE ESPÉCIES DO  
SUBCOMPLEXO *Triatoma rubrovaria* (Blachard, 1943) POR MEIO DA  
ANÁLISE DE COMPETÊNCIA VETORIAL E HÁBITO ALIMENTAR

THAIANE DE SOUSA VERLY

Rio de Janeiro  
Abril de 2021



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*THAIANE DE SOUSA VERLY*

Importância epidemiológica de espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria* por meio da análise de competência vetorial e hábito alimentar.

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

**Orientador (es):** Dra. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto  
Dr. Márcio Galvão Pavan

Rio de Janeiro  
Abril de 2021

Verly, Thaiane de Sousa.

Importância epidemiológica de espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria* (Blachard, 1943) por meio da análise de competência vetorial e hábito alimentar / Thaiane de Sousa Verly. - Rio de Janeiro, 2020.  
xvi, 174f f.; il.

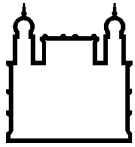
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto.

Co-orientador: Márcio Galvão Pavan.

Bibliografia: f. 111-141

1. doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. competência vetorial. 4. subcomplexo *Triatoma rubrovaria*. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***THAIANE DE SOUSA VERLY***

**Importância epidemiológica de espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria*  
por meio da análise de competência vetorial e hábito alimentar**

**ORIENTADORES: Dra. Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto  
Dr. Márcio Galvão Pavan**

### **BANCA EXAMINADORA:**

**Dra. Ana Jansen – Presidente e membro**

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos.

**Dr. Fernando Monteiro – Revisor e membro**

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular.

**Dr. Carlos Eduardo Almeida – Membro**

Universidade Federal da Bahia.

**Dra. Luciana Araripe – 1º Suplente**

FIOCRUZ / Instituto Oswaldo Cruz / Laboratório de Biologia Molecular de Insetos.

**Dr. Jader de Oliveira – 2º Suplente**

Universidade de São Paulo / Faculdade de Saúde Pública.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

*Dedico esta tese à minha família.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por cumprir as suas promessas em minha vida e por sempre me dar forças e coragem para transformar os meus sonhos em realidade.

Aos meus pais, Sergio e Valéria, que mesmo sem condições financeiras sempre priorizaram os meus estudos. Hoje, entendo o porquê pegavam tanto no meu pé para estudar. O conhecimento é a única coisa que ninguém nos tira e nos leva a lugares que jamais imaginaríamos chegar.

À minha irmã, Thainara, que diz ter orgulho de mim e que eu fui uma incentivadora em sua vida acadêmica. Mas, na verdade, sou eu que fico toda orgulhosa de tudo que ela conquistou e sei que ainda conquistará. Você vai longe!

À todos os meus amigos que torcem por mim e que vibram com as minhas conquistas. Obrigada por todo apoio e por entenderem todas as vezes que não pude estar nas resenhas por estar “enrolada com a tese”.

Aos colegas do LABIMDOE, em especial, Angélica Cardoso e Dra. Daniela Pita. Quantas vezes Angélica ficou até tarde no laboratório comigo? Lanchou comigo na quadra? Diluiu primers e fez TE para mim? Até carona me deu! Dani, aquela pessoa amorosa e com o coração enorme. Sempre acreditou em mim e em meu potencial. Me auxiliou desde à Iniciação Científica, foi a minha orientadora no TCC de licenciatura, já escrevemos juntas cronograma de disciplina e projetos. Tenho um carinho enorme por vocês!

Aos meus alunos de iniciação científica, Jasiel Júnior e Stephanie Costa, que foram os meus braços direitos nos experimentos de hábito alimentar e de comportamento e taxonomia molecular. A conclusão desse mega estudo foi possível com o auxílio de vocês. Obrigada!

À minha orientadora Dra. Constança Britto que, em 2011, abriu as portas do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas para mim. Obrigada por acreditar no meu potencial desde a minha Iniciação Científica. Obrigada por cada tempo dedicado às correções do meu TCC, dissertação, tese, resumos, artigos... e por me apoiar em participações de congressos. Grande parte do meu amadurecimento acadêmico se deu a você.

Ao meu orientador Dr. Márcio Pavan por acreditar em mim e me motivar com o seu otimismo. Obrigada por sempre estar disposto a tirar as minhas dúvidas e me mostrar o melhor caminho a seguir. Agradeço também pelo tempo dedicado a mim em cada reunião, cada correção de artigo e de projeto. Você e Constança são a melhor dupla de orientadores que eu poderia ter! Aprendi muito nesses quase 5 anos (pandemia atrasando a defesa rs) com vocês.

À Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul por tornar possível a realização desse estudo. E não poderia deixar de citar o agente de saúde, Mário Brito, que tive a imensa oportunidade de conhecer. Sempre muito disposto, foi nosso braço direito no trabalho de campo em todos os municípios do estado. Muito obrigada por toda assistência!

Às minhas colaboradoras do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera, Dra. Jacenir Mallet, Dra. Maria Luiza e Dra. Nathanielly Lima, por todo o auxílio nos trabalhos de campo, na identificação morfológica dos insetos e pelo apoio nos ensaios de comportamento.

Aos doutores Mirian Pereira e Francisco Odêncio, do Laboratório de Ultraestrutura Celular, pela ajuda na cultura de células e infecção dos camundongos.

Ao Dr. Carlos José, do Laboratório de Doenças Parasitárias, por todo auxílio na contagem dos parasitos nos ensaios de infecção experimental.

Ao Dr. Cléber Galvão, do Laboratório de Referência Nacional e Internacional em Triatomíneos, por fornecedor os insetos da colônia para a realização dos experimentos de taxonomia molecular e de comportamento.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Fernando Monteiro, Dr. Carlos Almeida, Dra. Ana Jansen, Dra. Luciana Araripe e Dr. Jader de Oliveira, por terem aceitado o convite. Tenho certeza de que farão ótimas sugestões para o enriquecimento do trabalho.

Ao Instituto Oswaldo Cruz e à Pós-graduação em Biologia Parasitária que tornaram real o meu grande desejo de fazer parte de um curso de excelência!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

O controle da doença de Chagas, que é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, concentra-se principalmente na eliminação de vetores com comprovada adaptação aos domicílios humanos. Ainda que insetos vetores domiciliados sejam os de maior importância epidemiológica, vetores autóctones de importância secundária são coletados constantemente em ambientes antrópicos, proporcionando risco de transmissão do parasito para humanos. Este estudo propôs identificar espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria* por taxonomia molecular (Cyt b) e analisar seu potencial vetorial na transmissão do parasito no bioma Pampa. Diferentes aspectos relacionados à capacidade vetorial foram avaliados, como fonte alimentar, taxa de infecção e genotipagem parasitária. Em paralelo, parâmetros bionômicos de *T. rubrovaria* após infecção por *T. cruzi* foram analisados experimentalmente. Um total de 1.724 triatomíneos foi coletado no Rio Grande do Sul, dos quais 927 insetos tiveram o DNA de seus intestinos extraídos para as análises moleculares. A filogenia do subcomplexo agrupou as 92 amostras sequenciadas com sucesso para o fragmento de Cyt b em nove clados. Das amostras sequenciadas, 19 (20,7%) foram identificadas como *T. carcavalloei*, 17 (18,5%) como *T. circummaculata* e 12 (13,04%) como *T. rubrovaria*. As restantes foram agrupadas em cinco clados sem sequência-referência, sendo quatro no clado 1, três no clado 2, cinco no clado 3, quinze no clado 4 e dezessete no clado 5. Dada a baixa divergência entre as sequências do subcomplexo e a sobreposição das divergências intra e interclados (K2P = 0,0-2,6% e 0,7-5,0%), é provável que os membros do subcomplexo estejam em processo de especiação e que ainda haja fluxo gênico interespecífico. Foram observadas no campo uma taxa de infecção por *T. cruzi* de 2,8% (26/927), com variação de carga parasitária de  $1,5 \times 10^1$  a  $2,3 \times 10^7$  equivalentes de parasito/intestino e a presença de TcI, TcV e coinfeção por TcI + TcIV. A partir de iniciadores universais para vertebrados, doze espécies de mamíferos foram identificadas, além de aves e insetos, sendo *Homo sapiens* a fonte alimentar detectada com maior frequência (73,5%), seguida de *Gallus gallus* (33,1%). Para análises de competência vetorial, ninfas N5 de *T. rubrovaria* e *T. infestans* foram alimentadas em camundongos infectados com *T. cruzi* (TcVI), em condições de laboratório. Comparamos a presença e o número de formas evolutivas do parasito nas excretas de ambas as espécies de triatomíneos aos 30, 60 e 90 dias pós-infecção. *Triatoma rubrovaria* e *T. infestans* apresentaram resultados semelhantes nas taxas de infecção e metacicloquênese de *T. cruzi* TcVI. Em relação ao comportamento vetorial, confirmamos que o triatomíneo tende a se afastar do local de picada após o repasto sanguíneo. Diferenças interespecíficas foram observadas quanto ao volume de sangue ingerido e proporção de indivíduos que excretaram após alimentação de sangue, revelando a maior eficiência alimentar e taxa de dejeção de *T. infestans*. O volume de sangue ingerido e o comportamento de picada de *T. rubrovaria* parecem ser influenciados pela infecção por TcVI. Espécimes infectados tendem a ingerir ~25% a mais de sangue e a picar mais a cabeça do hospedeiro. Comportamentos de cleptohematofagia e de coprofagia também foram observados em *T. rubrovaria*. Os resultados obtidos aqui sugerem a necessidade urgente de uma revisão taxonômica do grupo. Ademais, nossas análises evidenciam que *T. rubrovaria* é um vetor potencial de *T. cruzi*, apresentando parâmetros bionômicos associados à sua capacidade vetorial semelhantes ao do vetor *T. infestans*, principalmente quando infectados, alertando para a importância da vigilância entomológica constante nas áreas estudadas.



## ABSTRACT

The control of Chagas disease, which is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, focuses mainly on the elimination of vectors with proven adaptation to human dwellings. Although domiciled insect vectors are the most important epidemiologically, autochthonous vectors of secondary epidemiological relevance are constantly collected in anthropic environments, providing a risk of transmission of the parasite to humans. This study proposed to identify species of the subcomplex *Triatoma rubrovaria* through molecular taxonomy (Cyt b) and to analyze their vector potential on the transmission of the parasite in the Pampa biome. Different aspects related to vectorial capacity were evaluated, such as food source, infection rate and parasitic genotyping. In parallel, bionomic parameters of *T. rubrovaria* after infection by *T. cruzi* were analyzed experimentally. A total of 1.724 triatomines were collected in Rio Grande do Sul, of which 927 insects had DNA from their intestines extracted for molecular analysis. The phylogeny of the subcomplex grouped the 92 samples successfully sequenced for the Cyt b fragment in nine clades. Of the sequenced samples, 19 (20.7%) were identified as *T. carcavalloei*, 17 (18.5%) as *T. circummaculata* and 12 (13.04%) as *T. rubrovaria*. The remaining samples were grouped into five clades without reference sequence, four in clade 1, three in clade 2, five in clade 3, fifteen in clade 4 and seventeen in clade 5. Given the low divergence between the subcomplex sequences and the overlapping of intra and interclade divergences (K2P = 0.0-2.6% and 0.7-5.0%), it is likely that the members of the subcomplex are in speciation process and that there is still an interspecific gene flow. We observed an infection rate by *T. cruzi* of 2.8% (26/927) in the field, with parasitic load variation ranging from  $1.5 \times 10^1$  to  $2.3 \times 10^7$  parasite equivalents/intestine and the presence of TcI, TcV and coinfection by TcI + TcIV. Using universal vertebrate primers, twelve species of mammals were identified, in addition to birds and insects, being *Homo sapiens* the most frequently detected food source (73.5%), followed by *Gallus gallus* (33.1%). For vector competence analyses, N5 nymphs of *T. rubrovaria* and *T. infestans* were fed on mice infected with *T. cruzi* (TcVI), in laboratory conditions. We compared the presence and number of evolutionary forms of the parasite in the excreta of both species of triatomines at 30, 60 and 90 days post-infection. *Triatoma rubrovaria* and *T. infestans* presented similar results in infection rates and of *T. cruzi* TcVI metacyclogenesis. Regarding vectorial behavior, we confirm that the triatomine tends to move away from the bite site after the blood meal. Interspecific differences were observed in the volume of ingested blood and in the proportion of individuals who excreted after blood feeding, revealing the higher feeding efficiency and rate of *T. infestans* dejection. The volume of blood ingested and the bite behavior of *T. rubrovaria* seem to be influenced by TcVI infection. Infected specimens tend to ingest ~25% more blood and to bite more frequently the host's head. Kleptohematophagy and coprophagy behaviors were also observed in *T. rubrovaria*. The results obtained here suggest the urgent need for revising the taxonomy of the group. Furthermore, our analyzes show that *T. rubrovaria* is a potential vector of *T. cruzi*, having bionomic parameters associated with its vectorial capacity similar to the primary vector *T. infestans*, especially when infected, thus alerting to the importance of constant entomological surveillance in the studied areas.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Doença de Chagas</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 O agente etiológico</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Rastreamento de infecção natural por <i>T. cruzi</i> em triatomíneos</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional - PCRc (Qualitativa) .....	10
1.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Quantitativa) .....	16
<b>1.4 O inseto vetor</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5 Identificação taxonômica de triatomíneos</b> .....	<b>24</b>
<b>1.6 Competência vetorial e comportamento do inseto vetor</b> .....	<b>27</b>
1.6.1 Hábito alimentar de triatomíneos .....	28
<b>1.7 Justificativa</b> .....	<b>30</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>32</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>32</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Captura, identificação morfológica de triatomíneos e área de estudo</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2 Extração de DNA</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3 Taxonomia molecular</b> .....	<b>37</b>
3.3.1 PCRc e sequenciamento .....	37
3.3.2 Análise filogenética .....	38
<b>3.4 Pesquisa de hábito alimentar</b> .....	<b>40</b>
<b>3.5 Diagnóstico de infecção natural e carga parasitária de <i>T. cruzi</i> em triatomíneos de campo</b> .....	<b>41</b>
3.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCRc) .....	41
3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) .....	42
<b>3.6 Tipagem molecular de <i>T. cruzi</i></b> .....	<b>44</b>

<b>3.7</b>	<b>Competência vetorial de <i>T. rubrovaria</i></b> .....	<b>46</b>
3.7.1	Competência vetorial de <i>T. rubrovaria</i> em condições de laboratório.....	46
3.7.2	Deteção de <i>T. cruzi</i> TcVI em <i>T. rubrovaria</i> e <i>T. infestans</i> .....	48
3.7.3	Parâmetros comportamentais.....	49
3.7.4	Análises estatísticas .....	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta e identificação morfológica dos triatomíneos</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Análises moleculares</b> .....	<b>54</b>
4.2.1	Taxonomia molecular.....	54
4.2.2	Hábito alimentar – dos testes preliminares em laboratório aos triatomíneos de campo.....	58
4.2.3	Infecção natural .....	65
4.2.4	Carga parasitária .....	67
4.2.5	Genotipagem de <i>T. cruzi</i> em DTUs .....	69
<b>4.3</b>	<b>Competência vetorial de <i>T. rubrovaria</i></b> .....	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>82</b>
<b>5.1</b>	<b>Taxonomia molecular do subcomplexo <i>T. rubrovaria</i></b> .....	<b>83</b>
<b>5.2</b>	<b>Hábito alimentar</b> .....	<b>87</b>
<b>5.3</b>	<b>Infecção natural</b> .....	<b>90</b>
<b>5.4</b>	<b>Carga parasitária</b> .....	<b>94</b>
<b>5.5</b>	<b>Genotipagem de <i>T. cruzi</i> em DTUs</b> .....	<b>96</b>
<b>5.6</b>	<b>Competência vetorial de <i>T. rubrovaria</i></b> .....	<b>98</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>111</b>
<b>10</b>	<b>ANEXO 1</b>	<b>142</b>
<b>11</b>	<b>ANEXO 2</b>	<b>151</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estimativa mais recente do número de imigrantes com infecção por <i>T. cruzi</i> em países não endêmicos. ....	4
<b>Figura 2:</b> Principais formas evolutivas do <i>T. cruzi</i> . ....	7
<b>Figura 3:</b> Esquema do desenvolvimento de <i>T. cruzi</i> em seu inseto vetor. ....	8
<b>Figura 4:</b> Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> nos hospedeiros invertebrado e vertebrado.....	9
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do minicírculo do kDNA de <i>T. cruzi</i> .....	14
<b>Figura 6:</b> Esquema do sistema TaqMan.....	18
<b>Figura 7:</b> Diferenciação dos gêneros <i>Panstrongylus</i> , <i>Rhodnius</i> e <i>Triatoma</i> pelo ponto de inserção das antenas no tubérculo antenífero (indicado pela seta) .....	20
<b>Figura 8:</b> Ciclo de vida de um triatomíneo – <i>Triatoma brasiliensis brasiliensis</i> . ....	21
<b>Figura 9:</b> Mapas do Estado do Rio Grande do Sul destacando os municípios de Cachoeira do Sul (a), Caçapava do Sul (b), Canguçu (c), Encruzilhada do Sul (d), Lavras do Sul (e) e São Jerônimo (f).....	35
<b>Figura 10:</b> Coleta por busca ativa de triatomíneos no Rio Grande do Sul.....	36
<b>Figura 11:</b> Dissecção.....	37
<b>Figura 12:</b> Fluxograma de PCR Convencional Multilocus para genotipagem de <i>T. cruzi</i> diretamente do conteúdo intestinal de triatomíneos, com base em quatro marcadores moleculares. ....	44
<b>Figura 13:</b> Gel representativo da eficiência dos iniciadores 7432F e 7433R para o alvo Cyt b de espécies referências do subcomplexo <i>T. rubrovaria</i> provenientes de insetário.....	55
<b>Figura 14:</b> Gel representativo de espécimes do subcomplexo <i>T. rubrovaria</i> coletados no campo.....	56
<b>Figura 15:</b> Reconstrução filogenética bayesiana com o modelo <i>Birth-Death</i> . ....	57
<b>Figura 16:</b> Teste de eficiência dos iniciadores H1 e H2 (Cyt b).....	59
<b>Figura 17:</b> Cinética de detecção do conteúdo alimentar no trato digestório de <i>R. prolixus</i> alimentados com sangue de coelho.....	61
<b>Figura 18:</b> Detecção do fragmento do gene Cyt b nos triatomíneos coletados no RS. ....	62
<b>Figura 19:</b> Espécies identificadas com maiores frequências no conteúdo intestinal de triatomíneos por município. ....	65
<b>Figura 20:</b> Exemplo de revelação dos resultados da PCR convencional multiplex para avaliar infecção natural em triatomíneos.....	66

<b>Figura 21:</b> Ensaio de qPCR TaqMan.....	<b>67</b>
<b>Figura 22:</b> Curvas de amplificação representativas do ensaio de qPCR – sistema TaqMan. ....	<b>68</b>
<b>Figura 23:</b> Quantificação absoluta da carga parasitária de <i>T. cruzi</i> por PCR em Tempo Real multiplex de 26 triatomíneos kDNA-positivos coletados no RS. ....	<b>69</b>
<b>Figura 24:</b> Géis representativos da tipagem molecular de <i>T. cruzi</i> em amostras de triatomíneos naturalmente infectados. ....	<b>70</b>
<b>Figura 25:</b> Cargas de <i>T. cruzi</i> TcVI tripomastigotas metacíclicos (A) e epimastigotas (B) nas fezes/urina de <i>T. infestans</i> (em vermelho) e <i>T. rubrovaria</i> (em azul).....	<b>73</b>
<b>Figura 26:</b> Volume de sangue ingerido e <i>status</i> de excreção. ....	<b>74</b>
<b>Figura 27:</b> Parâmetros de alimentação de <i>T. rubrovaria</i> não infectado (NINF), e <i>T. rubrovaria</i> (INF) e <i>T. infestans</i> (INF) infectados - volume de sangue ingerido (A) e eficiência de alimentação (B). ....	<b>76</b>
<b>Figura 28:</b> Coeficientes da média ( $\pm$ IC 95%) das variáveis independentes (pontos brancos) e os interceptos (pontos pretos) de Modelos Lineares Generalizados. ....	<b>79</b>
<b>Figura 29:</b> Gráfico de radar exibindo a porcentagem de picadas de <i>T. rubrovaria</i> não infectado (NINF) e infectado (INF) em diferentes partes do corpo do camundongo (cabeça, dorso, rabo, abdômen e pernas). ....	<b>80</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequências dos iniciadores e sondas para os ensaios de PCRc e qPCR. .....	<b>43</b>
<b>Tabela 2:</b> Iniciadores e condições para a tipagem molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	<b>46</b>
<b>Tabela 3:</b> Modelos Lineares Generalizados (GLMs) com distribuição Gama testados com diferentes características comportamentais como variáveis dependentes. ....	<b>52</b>
<b>Tabela 4:</b> Distribuição de triatomíneos submetidos às análises moleculares quanto ao estágio evolutivo e local de captura em seis municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (2015-2017). ....	<b>54</b>
<b>Tabela 5:</b> Média das divergências par-a-par utilizando o Modelo de Substituição Nucleotídica K2P. ....	<b>58</b>
<b>Tabela 6:</b> Análise de similaridade das fontes alimentares testadas pelos iniciadores H1 e H2 (Cyt b). ....	<b>60</b>
<b>Tabela 7:</b> Frequência de espécies identificadas como fonte alimentar por município em que os triatomíneos foram coletados. ....	<b>63</b>
<b>Tabela 8:</b> Correlação entre espécie, estágio evolutivo, carga parasitária, DTU, fonte alimentar e município em que os triatomíneos kDNA-positivos foram coletados. ....	<b>71</b>
<b>Tabela 9:</b> Modelo Linear Generalizado para a presença de formas tripomastigotas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> TcVI nas fezes/urina de <i>T. rubrovaria</i> e de <i>T. infestans</i> em diferentes dias após a infecção (dpi). ....	<b>72</b>
<b>Tabela 10:</b> Estatísticas resumidas e testes de Wilcoxon-Mann-Whitney (W) entre <i>T. rubrovaria</i> não infectado e infectado e <i>T. infestans</i> infectado por <i>T. cruzi</i> TcVI. ....	<b>75</b>
<b>Tabela 11:</b> Resultados dos parâmetros comportamentais dos melhores Modelos Lineares Generalizados com diferentes variáveis dependentes. ....	<b>78</b>
<b>Tabela 12:</b> Coeficientes de Parâmetros para Regressão Logística Multinomial de locais de picada. ....	<b>81</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSC	Bloco de Sequência Conservada
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
c.f.	Conferir
Cm	Centímetro
CT	<i>Threshold Cycle</i>
°C	Graus Celsius
DCh	Doença de Chagas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxinucleotídeos Trifosfatos
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
DTUs	<i>Discret Typing Units</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
Eff	Eficiência
e.g.	Por exemplo
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
EUA	Estados Unidos da América
Fg	Fitograma
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
g	Aceleração da Gravidade
GLMs	Modelos Lineares Generalizados
GPS	Sistema de Posicionamento Global
h	Hora
H <sub>2</sub> O	Água
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus Infection</i>
IC	Intervalo de Confiança
INF	Infectado
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LABIMDOE	Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas
LIVEDIH	Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera

KCl	Cloreto de Potássio
kDNA	Ácido Desoxirribonucléico do Kinetoplasto
M	Marcador de Peso Molecular
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
Min	Minutos
mL	Mililitro
MLR	Regressão Logística Multinomial
mM	Milimolar
mtDNA	DNA Mitocondrial
N	Número Amostral
NaCl	Cloreto de Sódio
NI	Não Identificado
NINF	Não Infectado
nM	Nanomolar
NTC	<i>Negative Template Control</i>
N1	Ninfa de 1º estágio
N2	Ninfa de 2º estágio
N3	Ninfa de 3º estágio
N4	Ninfa de 4º estágio
N5	Ninfa de 5º estágio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
pb	Pares de Base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCRC	<i>Conventional Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphisc DNA</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Linearidade
RS	Rio Grande do Sul
s	Segundos
SE	Erro Padrão
SL	Spliced Leader



TBE	Solução Tampão Tris/Borato/EDTA
TcI	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo I
TcII	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo II
TcIII	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo III
TcIV	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo IV
TcV	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo V
TcVI	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo VI
Tcbat	<i>Trypanosoma cruzi</i> grupo <i>bat</i>
TX	Texas
UR	Umidade Relativa
V	Volts
USA	The United States of America
UV	Ultravioleta
$\chi^2$	Teste qui-quadrado de Pearson
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Chagas

Em 1909, foi anunciada a descoberta de uma nova doença pelo médico e pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, intitulada Tripanossomíase Americana, também conhecida como doença de Chagas (DCh) (CHAGAS, 1909). A descoberta é considerada única na história da medicina, porque além de caracterizar o agente causador da infecção – o protozoário parasito *Trypanosoma cruzi* – Chagas identificou o inseto transmissor, o triatomíneo, reservatórios domésticos e silvestres, e pôde ainda fazer a descrição da doença e o diagnóstico parasitológico de fase aguda (KROPF, 2009; REY, 2011).

A via clássica de transmissão do *T. cruzi* para o hospedeiro vertebrado é por meio da eliminação das fezes/urina contaminadas do triatomíneo durante o repasto sanguíneo. A transmissão também pode ocorrer por ingestão de bebidas ou alimentos contaminados com as excretas do vetor ou com o próprio inseto macerado – transmissão oral (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012); por transfusão sanguínea; transplante de órgãos (SCHMUNIS, 2007; KUN et al. 2009; GONTIJO et al., 2009; FIORELLI et al., 2011); transmissão congênita ou vertical (da mãe infectada para o recém-nascido) (HOWARD et al., 2014; CARLIER & TRUYENS, 2017); e por acidentes de laboratório (DIAS & COURA, 1997; COURA et al., 2005). A transmissão por via oral é geralmente responsável pela ocorrência de surtos esporádicos de infecção aguda em áreas onde ocorrem vetores naturalmente infectados, resultando em apresentação clínica aguda mais severa e altas taxas de mortalidade (PEREIRA et al., 2009). Os primeiros casos de DCh transmitidos por via oral foram descritos no Brasil por Silva et al. (1968) no estado do Rio Grande do Sul, e por Shaw et al. (1969) no estado do Pará, e ambos ocorreram devido à ingestão de alimentos contaminados (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012).

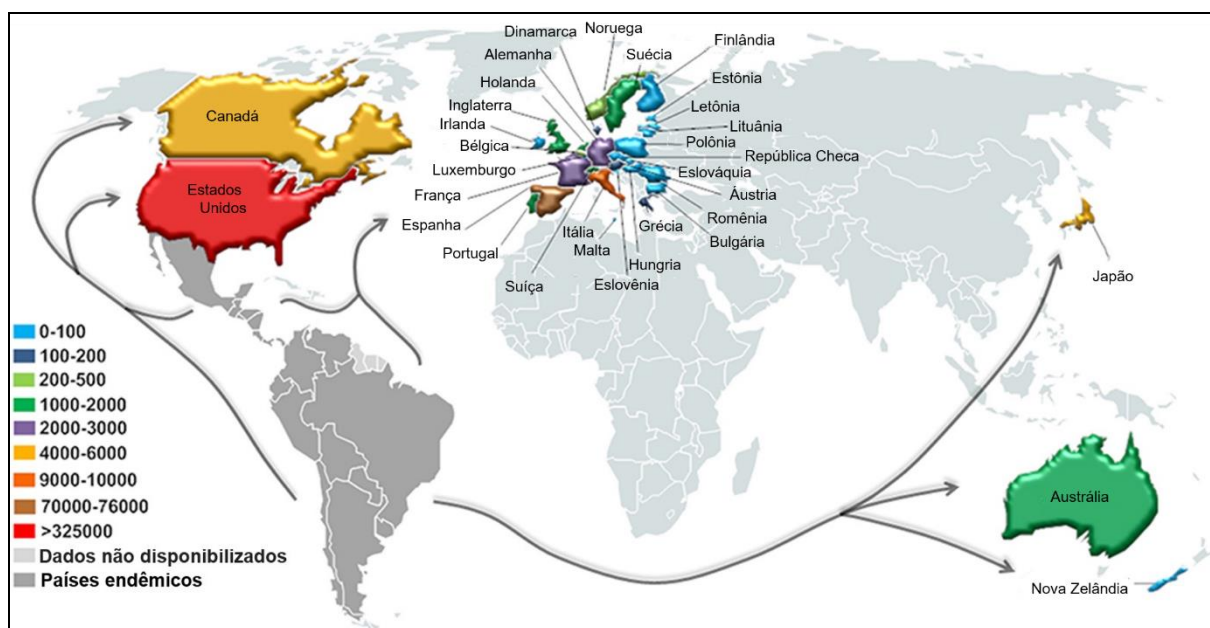
Existem situações que levam a DCh a ser considerada uma infecção reemergente a depender do modo de transmissão. Como exemplo, a migração de humanos infectados assintomáticos para áreas não endêmicas, e que podem transmitir o parasito no ato de doarem sangue ou órgãos, em países que não rastreiam a infecção por *T. cruzi* em bolsas de sangue (BONNEY, 2014). Similarmente, dificuldades no diagnóstico e tratamento de mulheres grávidas

infectadas e assintomáticas, tornam as infecções congênicas uma fonte potencial para disseminação contínua da infecção em países endêmicos e não endêmicos (BARONA-VILAR et al., 2012). E, finalmente, a transmissão oral de *T. cruzi* em áreas endêmicas demonstra que o controle vetorial nas moradias não é suficiente para evitar a transmissão (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012).

Esta parasitose pode ser dividida em duas fases no ser humano: (i) **fase aguda**: estágio de infecção inicial pelo *T. cruzi* e pode persistir por até dois meses após o contato com o parasito (OMS, 2018), correspondendo ao período de elevada parasitemia e, na maioria das vezes, oligossintomática (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010; REY, 2011; OMS, 2018). Em 5% dos casos (STANAWAY & ROTH, 2015) é caracterizada por febre, astenia, poliadenite, aumento do fígado e do baço, e sinal de Romaña ou de outros tipos de chagoma de inoculação (REY, 2011), podendo ser fatal em casos muito raros, em crianças, relacionados a complicações associadas com meningocefalite e/ou miocardite (PINTO et al., 2004; RASSI et al., 2001); e (ii) **fase crônica**, que pode resultar em três potenciais formas clínicas, onde cerca de 60 - 70% dos indivíduos infectados nunca apresentarão sintomas da infecção crônica e permanecerão na forma clínica indeterminada (latente) (BARRETT et al., 2003; COURA & BORGES-PEREIRA, 2010; RASSI & MARIN-NETO, 2010; REY, 2011). Os 30% restantes poderão apresentar disfunção de órgãos decorrente da colonização, pelo parasito, do miocárdio e/ou músculos do sistema digestório (OMS, 2018), relacionados à cardiopatia chagásica crônica e ao megaesôfago ou megacólon (MARIN-NETO et al., 2007; PINAZO et al., 2010; REY, 2011; NUNES et al., 2013). Deste modo, até 30% das pessoas infectadas desenvolvem a forma cardíaca e até 10% a forma digestiva, neurológica ou mista da doença (VAGO et al., 2000; OMS, 2018). Isso acontece, geralmente, 10 a 30 anos após a infecção inicial (BARRETT et al., 2003), dificultando as investigações epidemiológicas quanto às formas e locais de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Pacientes na fase crônica indeterminada que apresentam quadro de imunossupressão (coinfecção com HIV, transplantados) podem ser sintomáticos (revisito por GUARNER, 2019).

A DCh constitui a doença parasitária responsável pelo maior número de mortes na América Latina, superando a malária (DE SOUZA, 2010), tendo sido classificada na década de 90 como a de maior impacto na América do Sul e Central em termos socioeconômicos por representar a principal causa de doença cardíaca em adultos jovens e economicamente produtivos, tratando-se de anos de vida

perdidos por morte ou incapacidade (SCHOFIELD & DIAS, 1999). Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, sobretudo em 21 países latino-americanos (OMS, 2018). Os métodos de prevenção do aumento da incidência da doença são o controle vetorial, controle dos bancos de sangue, e a realização de exames em mulheres grávidas para prevenir a transmissão congênita (OMS, 2018). Porém, os desafios ampliam-se diante de estimativas nas quais mais de 80% das pessoas acometidas pela DCh no mundo não possuem acesso a diagnóstico ou tratamento, o que sustenta o elevado impacto de morbimortalidade e a associação com o custo social. Apesar dos avanços no controle vetorial e na garantia de qualidade das transfusões de sangue em vários países endêmicos, o que levaram à redução de novos casos da doença, é ainda inequívoca a relevância desta doença como problema de saúde pública, permanecendo milhões de pessoas cronicamente infectadas e mais de 10 mil mortes anuais relacionadas à DCh (OMS, 2018). Somado a isso, a taxa de transmissão congênita permanece inalterada, entre 1 a 8%, sendo responsável por 1/5 dos novos casos nas Américas, e é atualmente a principal causa de transmissão da DCh na Argentina e em países não-endêmicos (BUEKENS et al., 2018). Ações de vigilância e controle na América do Norte, Europa, Japão e Austrália têm sido necessárias em função do aumento migratório que eleva o risco de transmissão do *T. cruzi* por transfusão de sangue, doação de órgãos e transmissão congênita (SCHMUNIS & YADON, 2010; COURA & VIÑAS, 2010; CONNERS et al., 2016; SIMÕES et al., 2018; LIDANI et al., 2019; OMS, 2018) (Figura 1).



**Figura 1:** Estimativa mais recente do número de imigrantes com infecção por *T. cruzi* em países não endêmicos. (Modificado de LIDANI et al., 2019)

No Brasil, as estimativas mais atuais sugerem que haja entre 1 e 4,6 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, correspondendo a 1,0 - 2,4% da população mundial (HOTEZ & FUJIWARA et al., 2014; MARTINS-MELO et al., 2014; SIMÕES et al., 2018), com cerca de 6.000 mortes por ano (MARTINS-MELO et al., 2016). A DCh é a quarta causa de morte entre doenças infecciosas e parasitárias no país no período de 1999 a 2007 (MARTINS-MELO et al. 2012), e no período de 2000 a 2011, representou 76,7% de todas as mortes por Doenças Tropicais Negligenciadas, atingindo a maior carga de morbimortalidade (COSTA DE ALBUQUERQUE et al., 2017).

Entre 1975 e 1983, o programa de controle da DCh teve início no Brasil devido à infestação domiciliar pelo vetor epidemiologicamente mais relevante, *Triatoma infestans* Klug, 1834, em 700 municípios de 12 estados brasileiros (SILVEIRA et al., 1984). Acredita-se que, nestes anos, 4,2% da população brasileira estava infectada pelo *T. cruzi* e cerca de 100.000 novos casos tenham sido registrados a cada ano (CAMARGO et al., 1984). Neste mesmo inquérito sorológico a maior prevalência foi encontrada no estado do Rio Grande do Sul (8,84%), seguido de Minas Gerais (8,83%), Goiás (7,40%), Sergipe (5,97%) e Bahia (5,44%) (CAMARGO et al., 1984). Em 1991, o Brasil aderiu ao consórcio internacional do Cone Sul com o objetivo de reduzir a transmissão do parasito por vetores através do

uso de inseticidas (DIAS et al., 2002; GURGEL-GONÇALVES et al., 2012) e melhoria habitacional (DIAS, 2007). Esta iniciativa teve um grande impacto sobre a doença nos países pertencentes ao Cone Sul, ocorrendo uma redução de 94% da incidência após 10 anos de medidas realizadas (OMS, 2002). E, em 2006, a Organização Pan-Americana da Saúde conferiu ao Ministério da Saúde do Brasil a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão de *T. cruzi* pelo *T. infestans* (FERREIRA & SILVA, 2006). Apesar disso, alguns estudos têm mostrado a persistência da transmissão vetorial, provavelmente devido à existência de vetores silvestres em ambientes peridomiciliares e intradomiciliares. Isto evidencia que esta transmissão continua apresentando risco, possivelmente devido à existência de vetores autóctones com alto potencial de colonização, bem como focos residuais de *T. infestans* (SILVEIRA & DIAS, 2011; VINHAES et al., 2014).

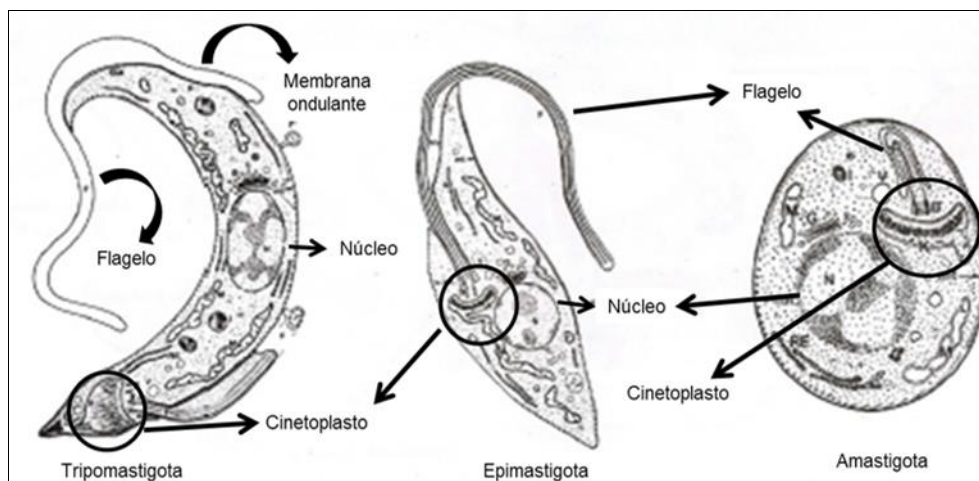
Nas décadas de 80 e 90 a transfusão sanguínea foi a principal via de transmissão do parasito em áreas endêmicas do Brasil (DIAS, 2002; OMS, 2008). Com uma melhor cobertura na triagem de doadores de sangue, houve uma drástica redução na taxa de transmissão por essa via (MORAES-SOUZA & FERREIRA-SILVA, 2011). Com relação à transmissão vertical, em estudo realizado por Ostermayer e colaboradores (2011), o estado do Rio Grande do Sul possuía alta taxa de transmissão congênita, correspondendo a 60% do total de casos de infecção incluídos na pesquisa. Já o aumento da incidência de transmissão oral no Brasil tornou-se evidente com a ingestão de alimentos contaminados com *T. cruzi*, podendo estar associado à presença de vetores e/ou reservatórios infectados nas imediações do local de ocorrência. Mais de 5.000 casos de DCh aguda foram notificados no Brasil entre 2001 – 2018 (SANTOS et al., 2020), com prevalência majoritária na região Amazônica (estados do Pará e Amapá), seguida do Nordeste, Sul, Centro Oeste e Sudeste, causados por ingestão de água (DIAS et al., 2008), consumo de alimentos (NEVES et al., 1968), de cana-de-açúcar (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991) e açaí (DA SILVA VALENTE et al., 1999; VALENTE, 2005; NÓBREGA, 2009) contaminados com *T. cruzi*. Apesar de a região Amazônica não ser considerada uma área endêmica, atualmente, é responsável pelo maior número de casos de DCh aguda, principalmente por transmissão oral, incentivando medidas de vigilância que visam à pasteurização dos produtos, o controle da exportação de sucos e outros produtos não tratados (PINTO et al., 2008; DIAS & AMATO NETO, 2011); e a participação da comunidade na notificação da presença do vetor (ABAD-FRANCH et al., 2011), a partir de medidas educativas.

Quando o sistema de controle de vigilância em saúde for falho, a interação parasito-vetor-vertebrado pode ser mantida em regiões onde espécies de triatomíneos autóctones são comumente encontradas. As medidas de controle de vetores autóctones passaram a ser aplicadas pelos governos municipais, após a descentralização do sistema de saúde no Brasil, porém se deparam com dificuldades operacionais, políticas e falta de investimentos (COUTINHO et al., 2014). Além disso, em locais onde triatomíneos silvestres são frequentes, o baixo efeito residual de inseticidas juntamente com as alterações nos biomas facilitam a invasão e colonização de triatomíneos em ambientes domiciliar e peridomiciliar (DIAS, 2000), aumentando o risco de contato entre vetores autóctones infectados por *T. cruzi* e o homem. Ainda de acordo com Dias (2000), os maiores desafios quanto à luta antivetorial são a *“sustentação da participação comunitária, manutenção da vontade política, manejo do peridomicílio e detecção de triatomíneos em baixas densidades”*.

## 1.2 O agente etiológico

O agente etiológico da DCh, como dito anteriormente, é o *T. cruzi*, um protozoário flagelado e unicelular da ordem Kinetoplastea e família Trypanosomatida (MOREIRA et al., 2004). Esse parasito é caracterizado pela existência de um único flagelo que se origina de uma invaginação, conhecida como bolsa flagelar, além de um cinetoplasto capaz de auto-replicação, que possui uma condensação de DNA (DNA do cinetoplasto ou kDNA) no interior dessa mitocôndria única (CLAYTON, 2002).

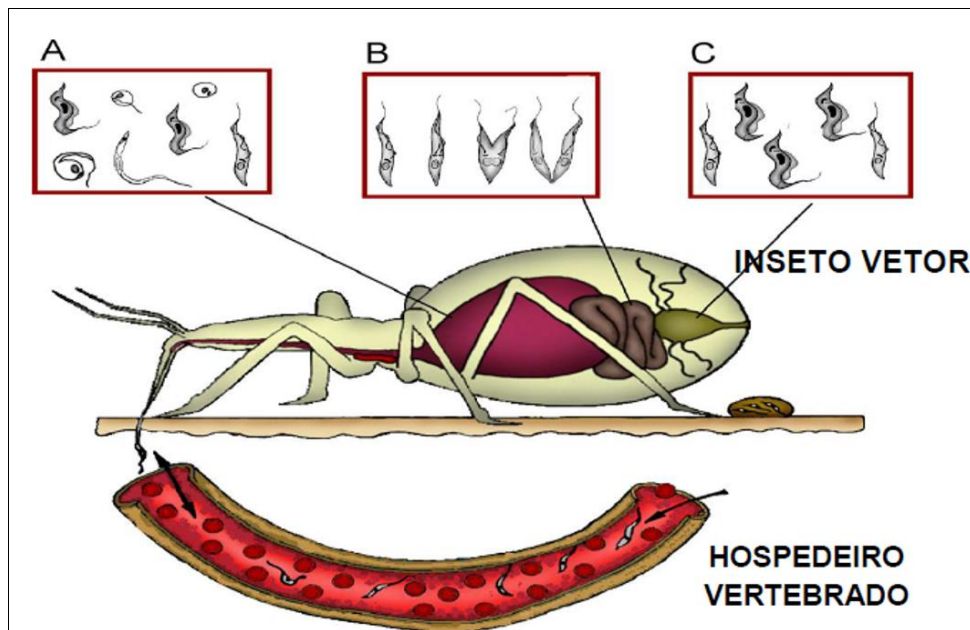
Ao longo do seu ciclo biológico complexo, o *T. cruzi* assume diferentes formas evolutivas: amastigota, epimastigota e tripomastigota (BRENER, 1971, 1973). Estas formas são diferenciadas morfológicamente pelo aspecto geral da célula, pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e pela região de emergência do flagelo (BRENER, 1971, 1973; DE SOUZA, 2002; REY 2011, 2013) (Figura 2).



**Figura 2:** Principais formas evolutivas do *T. cruzi*.  
(Modificado de REY, 2013)

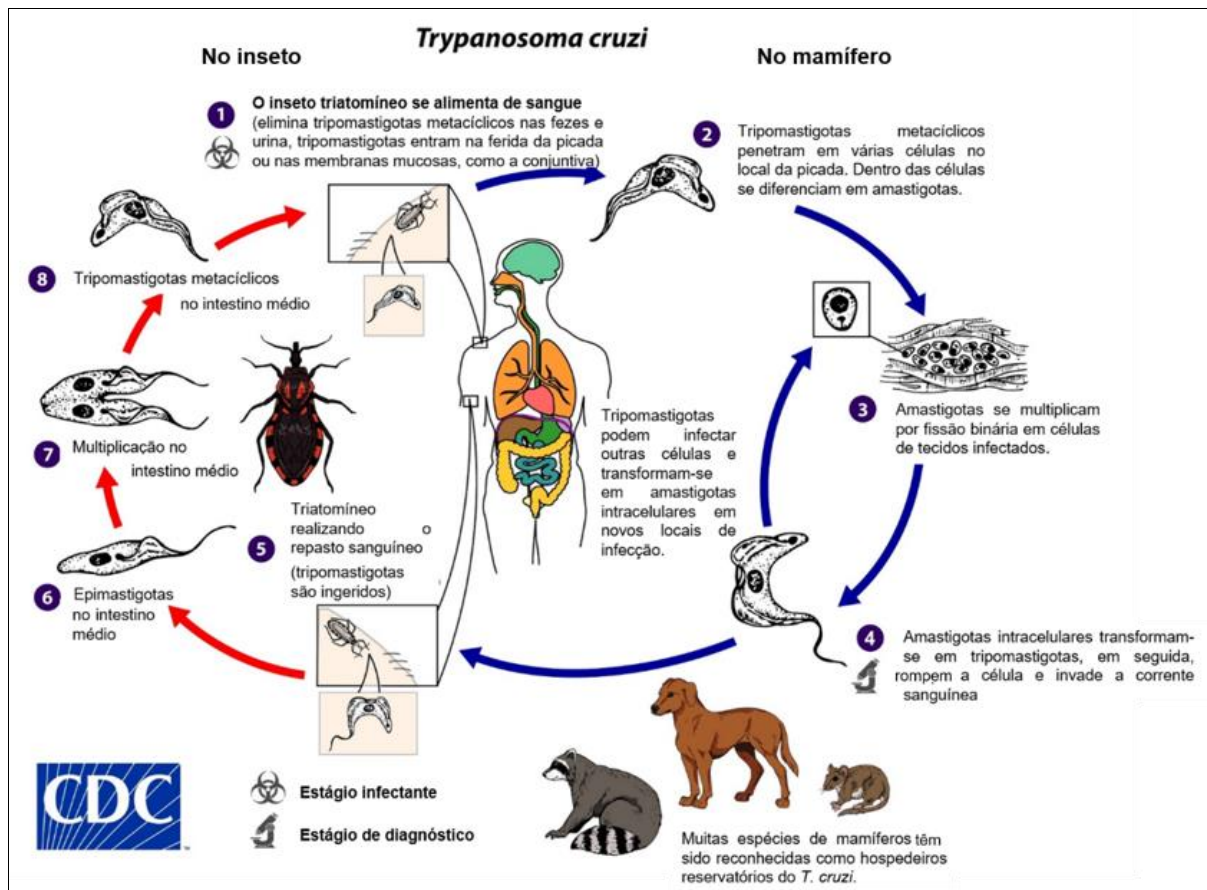
Este parasito heteroxênico se desenvolve alternadamente entre um hospedeiro invertebrado, representado por numerosas espécies de triatomíneos, e um hospedeiro vertebrado, mamíferos silvestres ou domésticos, incluindo o homem. Seu ciclo evolutivo nos insetos hematófagos ocorre nos intestinos médio posterior e posterior (ampola retal/reto) (Figura 3). O triatomíneo se infecta com as formas tripomastigotas sanguícolas ao sugar o sangue de um mamífero infectado. No intestino médio posterior, os tripomastigotas transformam-se em epimastigotas e em algumas formas transitórias. Após multiplicação ativa, os epimastigotas sofrem uma nova diferenciação na ampola retal adotando a forma tripomastigota metacíclica. Esta constitui a forma infectante para os vertebrados e é eliminada pelas fezes e urina, podendo penetrar no vertebrado por meio de lesões cutâneas, mucosas ou na conjuntiva (GARCIA et al., 2007; ARGOLO et al., 2008; REY, 2011, 2013; CDC, 2019). É importante destacar que as formas metacíclicas de *T. cruzi* também estão presentes na glândula de cheiro de marsupiais (DEANE et al., 1984; URDANETA-MORALES & NIRONI, 1996).





**Figura 3:** Esquema do desenvolvimento de *T. cruzi* em seu inseto vetor. Ao realizar o repasto sanguíneo de um vertebrado infectado o triatomíneo ingere as formas tripomastigotas sanguícolas que irão se diferenciar em formas epimastigotas e em algumas formas transitórias no intestino médio anterior (A). No intestino médio posterior as formas epimastigotas se multiplicarão (B) aumentando a população de parasitos. Na ampola retal (intestino posterior) os epimastigotas irão se transformar em tripomastigotas metacíclicos (C) que serão eliminados com as fezes e urina do inseto. (Modificado de Garcia et al., 2007).

No hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas metacíclicas podem invadir diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais. Ao invadir estas células, os tripomastigotas metacíclicos se diferenciam em amastigotas, que se proliferam intracelularmente por fissão binária. Depois de intensa divisão, as formas amastigotas se transformam nas formas tripomastigotas sanguícolas que rompem a célula, as quais podem então invadir novas células localizadas no sítio de infecção ou podem atingir a via linfática e sanguínea, e potencialmente colonizar diferentes tecidos do hospedeiro, em especial células musculares (cardíaca, lisa e esquelética) e ganglionares (Figura 4) (ARGOLO et al., 2008; REY, 2011, 2013; CDC, 2019).



**Figura 4:** Ciclo de vida do *T. cruzi* nos hospedeiros invertebrado e vertebrado (Modificado de CDC, 2019).

A plasticidade genômica (ganho, perda ou rearranjo de fragmentos do DNA) do *T. cruzi* pode conferir mecanismos para sua sobrevivência ao estresse ambiental (por exemplo, temperatura e pH), além de promover diversidade genética entre linhagens do parasito (McDANIEL & DVORAK, 1993). *T. cruzi* é uma espécie heterogênea representada por subgrupos de cepas ou isolados que circulam entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Visando o entendimento de questões de biologia básica do parasito, a nomenclatura sub-específica de *T. cruzi* foi revisada. Esta nova revisão inclui seis Unidades Discretas de Tipagem (DTUs), *T. cruzi* I - VI (ZINGALES et al., 2009, 2012). O termo DTU é definido como o conjunto de isolados que podem ser identificados por marcadores moleculares ou imunológicos comuns (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2012). Além destas DTUs, foi identificado um novo genótipo de *T. cruzi*, 'TcBat', infectando morcegos (MARCILI et al., 2009) e, mais recentemente, humanos (RAMÍREZ et al., 2014). Lima e colaboradores (2015) propuseram TcBat como uma DTU independente.

O conhecimento da distribuição geográfica das populações de *T. cruzi* torna-se fundamental para melhor compreender os aspectos epidemiológicos da doença,

uma vez que tem sido sugerida a associação entre os genótipos do parasito e as formas clínicas da DCh (STURM & CAMPBELL 2010; ZINGALES et al., 2012; RODRIGUES-DOS-SANTOS et al., 2018; MONJE-RUMI et al., 2020; BIZAI et al., 2020). A partir da revisão de literatura sobre a distribuição das DTUs I a VI em humanos, é reconhecido que estas apresentam distribuições geográficas distintas e que todas estão envolvidas com a ocorrência da DCh (ZINGALES et al., 2012). Nos países que integram o Cone Sul, as DTUs TcI, TcII, TcV e TcVI são as principais responsáveis pela manifestação da doença, sendo que TcII predomina na maior parte dos estados do Sul, Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste do Brasil, TcV na Argentina, Bolívia e Paraguai, e TcVI no Gran Chaco (Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil). A DTU TcI está relacionada com a DCh na Amazônia, países Andinos (Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Chile e Venezuela), América Central e México (ZINGALES et al., 2012). Acredita-se que a DTU TcI não favoreça a forma digestiva e que as DTUs TcII e TcV promovem as manifestações cardíaca e digestiva (CARRANZA et al., 2009; ZINGALES, 2011). A TcIII está associada ao ciclo silvestre no Brasil e em países adjacentes (ZINGALES et al., 2012), já foi isolada em cães domésticos (CHAPMAN et al., 1984; CARDINAL et al., 2008) e, mais recentemente, foi observada infectando humanos no Nordeste do Brasil (K MARTINS et al., 2015). A distribuição geográfica da DTU TcIV, na América do Sul, é semelhante à de TcIII (ZINGALES et al., 2012), ocorrendo frequentemente em humanos (MILES et al., 1981), tendo sido ainda identificada em surtos de transmissão oral na Venezuela (RAMIREZ et al., 2010).

A ampliação dos trabalhos de campo e uma investigação em laboratório mais acurada acerca da identificação das fontes alimentares dos vetores e das diferentes DTUs de *T. cruzi* que circulam em triatomíneos de uma determinada região são necessárias para aumentar o nosso conhecimento acerca da ecologia desse parasito.

### **1.3 Rastreamento de infecção natural por *T. cruzi* em triatomíneos**

#### **1.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase Convencional - PCRC (Qualitativa)**

A determinação da taxa de infecção natural por *T. cruzi* nos vetores triatomíneos em regiões com diferentes índices de endemicidade é relevante para o melhor conhecimento acerca da epidemiologia da DCh, assim como para a vigilância

epidemiológica e elaboração de programas de controle da disseminação da doença. Taxas de infecção do vetor em regiões endêmicas para a DCh são variáveis, alcançando 5% a 10% no Brasil (DIAS, 2002; RIBEIRO JR. et al. 2019) e até 79% na Bolívia (Cochabamba) (MEDRANO-MERCADO et al., 2008).

O monitoramento realizado pelos programas de controle da prevalência de infecção por *T. cruzi* nos triatomíneos, quando há, ocorre por meio da microscopia óptica de suspensão do conteúdo intestinal fresco destes vetores, em busca de tripanosomatídeos ativos. Esta metodologia possui algumas vantagens como baixo custo, fácil execução e utilização de poucos equipamentos, sendo acessível para qualquer laboratório (CDC, 2018), no entanto, apresenta algumas limitações, tais como: baixa sensibilidade em amostras com números reduzidos de parasitos, perda de especificidade devido a dificuldade de diferenciar o parasito de outras infecções por tripanosomatídeos, como *Trypanosoma rangeli* e *Blastocrithidia triatoma* (CERISOLA et al. 1971; CHIURILLO et al. 2003), baixa reprodutibilidade, dificuldade no processamento de ninfas muito pequenas, necessidade da análise em insetos frescos, além da microscopia ser um procedimento laborioso quanto a análise de um elevado número de insetos. Além disso, por muitas vezes nas regiões endêmicas, os insetos são coletados por agentes de saúde em comunidades rurais isoladas; até estes espécimes chegarem a um laboratório para análise, frequentemente, já se encontram mortos, o que inviabiliza ou dificulta o exame microscópico.

Neste contexto, ensaios de biologia molecular baseados na Reação em Cadeia da Polimerase Convencional ou Qualitativa (PCRc) para a detecção de DNA de *T. cruzi* em triatomíneos já vêm sendo descritos na literatura por diversos autores (SILBER et al., 1997; VALLEJO et al., 1999; CHIURILLO et al., 2003; CORONADO et al., 2006; LIARTE, 2006; MARCET et al., 2006; BACIGALUPO et al., 2012; PINHO, 2012; VILLACIS et al., 2015; MOREIRA et al., 2017; RIBEIRO JR. et al. 2019). Nestes estudos, o DNA do parasito pode ser detectado diretamente em amostras biológicas, como o conteúdo intestinal dos triatomíneos, apresentando algumas vantagens com relação ao método tradicional parasitológico, como uma maior sensibilidade e reprodutibilidade no diagnóstico (MOREIRA et al., 2017). Os resultados provenientes da PCR são obtidos em um tempo mais curto quando comparados ao método parasitológico indireto, por hemocultura, que apresenta resultados somente após semanas ou até meses (LUQUETTI & RASSI, 2000; YANG & ROTHMAN, 2004). Também é possível o exame em insetos mortos e em ninfas de 1º estágio, por exemplo, além da possibilidade de repetição dos testes em caso de

resultados inconclusivos, uma vez que esta técnica faz uso de pequenos volumes de amostra (YANG & ROTHMAN, 2004). Vale ressaltar que o uso da PCR para a avaliação de infecção natural em triatomíneos de campo permite o rastreamento de um grande número de exemplares simultaneamente, fornecendo maior agilidade para o monitoramento da prevalência de infecção pelo *T. cruzi* em áreas endêmicas, sendo uma ferramenta importante para estudos da dinâmica de transmissão do parasito. Porém, a diversidade genética de *T. cruzi* deve ser considerada no desenvolvimento de testes diagnósticos moleculares (SCHIJMAN, 2018).

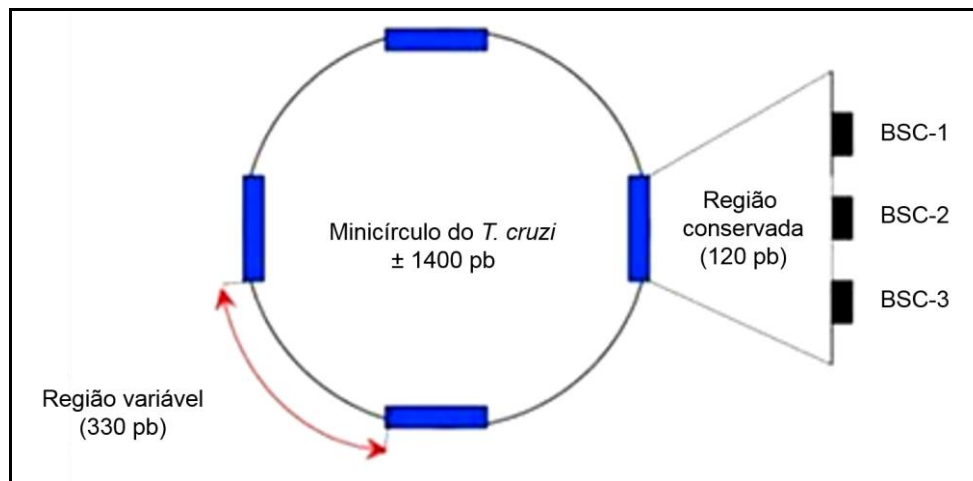
### **O kDNA de *T. cruzi* como alvo de detecção**

A seleção de um fragmento de DNA cuja sequência seja conservada em todas as cepas e isolados do parasito e que esteja presente em inúmeras cópias é necessária para a realização de ensaios da PCR para detecção de *T. cruzi*. As moléculas de minicírculos que constituem majoritariamente a rede de kDNA ou DNA do cinetoplasto, que representa o genoma mitocondrial, têm sido usadas com sucesso desde a década de 90 por diferentes grupos de pesquisa para o diagnóstico molecular de infecção por *T. cruzi* em amostras biológicas de humanos, como sangue (AVILA et al., 1991, 1993; BRITTO et al., 1993, 1995, 2001; WINCKER et al., 1994; JUNQUEIRA et al., 1996; SCHIJMAN et al., 2003; BRITTO, 2009; FERNANDES et al., 2009; RAMÍREZ et al., 2010; MURCIA et al., 2010; SCHIJMAN et al., 2011), em diferentes tecidos de modelo experimental murino (ANDRADE et al., 2002), e em excretas (RUSSOMANDO et al., 1996; BRITO et al., 2008; PINHO, 2012; GRIJALVA et al., 2014; CANTILLO-BARRAZA et al., 2015) e intestinos de triatomíneos (VALLEJO et al., 1999; GURGEL-GONÇALVES et al., 2004; VILLACÍS et al., 2015; MOREIRA et al., 2017).

O kDNA representa a maior quantidade de DNA extranuclear já identificada em células eucarióticas, consistindo de 20 a 25% do DNA total da célula (RAY, 1989; WESTENBERGER et al., 2006). É representado por uma rede altamente compactada formada por milhares de moléculas circulares de DNA entrelaçadas entre si, os minicírculos, com tamanhos de 1.400 pb e presentes em cerca de 10.000 a 20.000 cópias por rede, perfazendo 95% do kDNA (DEGRAVE et al., 1988; KLINGBEIL & ENGLUND, 2004; THOMAZ et al., 2007). Estas moléculas codificam RNAs pequenos (RNAs guias), que participam no processo de edição dos transcritos de maxicírculos (OCHSENREITER, 2007). Os maxicírculos são moléculas maiores

localizadas na periferia da rede, com tamanhos que variam entre 20.000 – 40.000 pb e são representados em número de cópias bem menores (25 - 50 cópias idênticas por célula; 5% do kDNA). São moléculas análogas funcionais ao DNA mitocondrial de outros eucariotos, codificando proteínas da cadeia de transporte de elétrons e RNA ribossômico mitocondrial (VERLAG & VERLAG, 2001; KLINGBEIL & ENGLUND, 2004; PIMENTEL, 2012).

Os minicírculos apresentam classes de sequências altamente heterogêneas (JUNQUEIRA et al., 2005; TELLERIA et al., 2006), entretanto, se organizam em quatro regiões de sequências conservadas de DNA, dispostas a 90° uma das outras, e são intercaladas por sequências variáveis de DNA (Figura 5). Com a utilização de iniciadores específicos previamente desenhados para os blocos de sequências conservadas, é possível amplificar fragmentos conservados (120 pb) e variáveis (330 pb) do DNA de minicírculos de *T. cruzi* (DEGRAVE et al., 1988; RAY, 1989; STURM et al., 1989; AVILA et al., 1991; BRITTO et al., 1993; WINCKER et al., 1994; SIMPSON, 1997; JUNQUEIRA et al., 2005).



**Figura 5:** Representação esquemática do minicírculo do kDNA de *T. cruzi*. Organização das quatro regiões conservadas (retângulos em azul), com aproximadamente 120pb cada, contendo os blocos de seqüências mais conservadas da molécula: BSC-1, BSC-2 e BSC-3 (retângulos em preto). As regiões de seqüências hipervariáveis dos minicírculos de 330 pb (seta em vermelho) encontram-se intercaladas com as regiões conservadas (Modificado de STURM et al., 1989).

Apesar de sua comprovada sensibilidade diagnóstica, a especificidade da PCR-kDNA para a pesquisa de *T. cruzi* em triatomíneos foi desafiada quando a seqüência completa do DNA de minicírculos de *Trypanosoma (Tejeraia) rangeli* foi disponibilizada. As seqüências, a ordem e a distância dos blocos de seqüências conservadas dos minicírculos de *T. cruzi* e *T. rangeli* revelaram alta similaridade entre estes parasitos (VALLEJO et al. 1999; GUHL & VALLEJO, 2003), o que poderia confundir o diagnóstico em se tratando de infecções mistas por *T. cruzi* e *T. rangeli*, em áreas onde ambos os parasitos coexistam, compartilhando vetores e hospedeiros (GRISARD et al., 1999; GUHL & VALLEJO, 2003). Muito embora *T. rangeli* tenha a capacidade de infectar mamíferos e triatomíneos, em especial espécies do gênero *Rhodnius* (VALLEJO et al., 2002) – apesar de ter sido detectado, recentemente, em *Triatoma brasiliensis* (LIMA-OLIVEIRA et al., 2020) – nas Américas Central e do Sul, o seu potencial patogênico ao homem ainda é muito controverso (OSORIO et al., 1995; ZÚÑIGA et al., 1997; PALÁU et al., 2001).

Os iniciadores para a PCR-kDNA descritos para a detecção de *T. cruzi* também se anelam nas seqüências conservadas de minicírculos do kDNA de *T. rangeli*, embora os fragmentos amplificados sejam facilmente diferenciados pelo tamanho em gel de poliacrilamida (VALLEJO et al., 1999) e de agarose (MOREIRA et al., 2017). Um fragmento de 330 pb é esperado para amostras infectadas com *T. cruzi* (Figura 5) e um fragmento de 760 pb, junto a uma possível série de fragmentos entre 300 – 450 pb são esperados para as infecções por *T. rangeli* (VALLEJO et al.,

1999; MOREIRA et al., 2017). Considerando que o exame microscópico direto para a pesquisa de tripanossomos em triatomíneos mostra-se limitado em diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli*, pela similaridade morfológica entre as espécies (D'ALESSANDRO-BACIGALUPO & SARAIVA, 1992), alguns grupos vêm empregando a PCR-kDNA para a identificação diferencial destas espécies, a partir do conteúdo intestinal do inseto (VALLEJO et al., 1999; GURGEL-GONÇALVES et al., 2004; VILLACÍS et al., 2015; MOREIRA et al., 2017).

### **O DNA nuclear satélite de *T. cruzi* como alvo de detecção**

O genoma nuclear de *T. cruzi* possui cerca de  $10^5$  cópias de uma repetição de 195 pb (DNA satélite), que equivale, aproximadamente, a 10% do DNA total do parasito (ELIAS et al., 2003). O DNA nuclear satélite representa arranjos não codificantes de DNA, constituídos de repetições diretas (*in tandem*) da mesma sequência de nucleotídeos. Apesar da conservação de sequências (ELIAS et al., 2003, 2005; VARGAS et al., 2004; LIARTE, 2006; MARTINS et al., 2008), polimorfismos nas sequências de DNA satélite devido a diferenças entre as DTUs de *T. cruzi* devem ser considerados, a fim de se obter um aumento da sensibilidade da PCR direcionada a este alvo (RAMIREZ et al., 2017). Em estudo inicial realizado por Elias e colaboradores (2003), verificou-se que o DNA satélite é de quatro a seis vezes mais abundante nas cepas Y e CL-Brener, em comparação com Silvio X10 cl1 (ELIAS et al., 2003). Posteriormente, foi observado que isolados de TcI apresentam menor número de cópias de DNA nuclear satélite quando comparados a isolados de outras DTUs (DUFFY et al., 2009; IENNE et al., 2010; RAMIREZ et al., 2017). Apesar disso, as unidades de repetições satélite são agrupadas, no genoma nuclear, em conjuntos que compreendem cerca de 30 bases a  $\pm 10$  kb (ELIAS et al., 2003). A análise de sequências de várias unidades de repetição de DNA satélite das três cepas (Y, CL-Brener e Silvio X10 cl1) revelou uma semelhança notável com blocos de nucleotídeos conservados (ELIAS et al., 2003).

Machado et al. (2000) apresentaram uma metodologia de detecção do DNA satélite de *T. cruzi*, através da PCR, a partir de amostras de fezes de triatomíneos. Os resultados encontrados pelos autores confirmam a alta sensibilidade e especificidade da PCR direcionada ao DNA satélite do parasito. Em 2003, Virreira e colaboradores compararam a sensibilidade de alguns conjuntos de iniciadores usados para detecção de *T. cruzi* pela PCR utilizando como alvos o DNA nuclear



satélite, região conservada do elemento de repetição E13 (REQUENA et al., 1996), kDNA e proteína flagelar F29. Os iniciadores que amplificam o DNA satélite detectaram DNA do parasito em todas as linhagens testadas com maior sensibilidade que os marcadores E13 e F29 (VIRREIRA et al., 2003).

Assim como os minicírculos do kDNA, a abundância do número de repetições das sequências de DNA satélite do núcleo de *T. cruzi*, tornam este um alvo de elevada sensibilidade e especificidade para pesquisa diagnóstica por PCR em sangue e amostras de tecidos em humanos, e nas fezes do vetor (MOSER et al., 1989; OLIVARES-VILLAGÓMEZ et al., 1998; DIAZ et al., 1992; MACHADO et al., 2000; MARCON et al., 2011; DE FREITAS et al., 2011; HERNÁNDEZ et al., 2016).

### **1.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Quantitativa)**

Para os estudos em triatomíneos, a técnica clássica de contagem usando câmara de Neubauer tem sido amplamente empregada para quantificar *T. cruzi* em homogenatos ou conteúdo intestinal, assim como em amostras de fezes (MELLO et al., 1996; KOLLIEN & SCHAUB, 1998; ARAUJO et al., 2008, 2014). Embora útil para quantificação rápida de amostras contendo cargas parasitárias elevadas, o método não é acurado para amostras que apresentam um número reduzido de parasitos, o que é de ocorrência comum na natureza.

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa (qPCR) tem mostrado ser um método preciso para estimativa da carga parasitária por *T. cruzi* em sangue periférico de pacientes infectados, assim como em amostras de conteúdo intestinal de triatomíneos. Sua aplicação já vem sendo descrita por diversos grupos para inferir parasitemia em humanos (MORA et al., 2005; PIRON et al., 2007; DUFFY et al., 2009, 2013; DE FREITAS et al., 2011; BUA et al., 2012; QVARNSTROM et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; MELO et al., 2015; RAMÍREZ et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2016), ensaios de interação parasito-inseto vetor (UEHARA et al., 2012), cinética de colonização por *T. cruzi* em diferentes segmentos do trato digestório de *Rhodnius prolixus* (DIAS et al., 2015) ou ainda em estimativas de carga parasitária de insetos coletados no campo (MOREIRA et al., 2017).

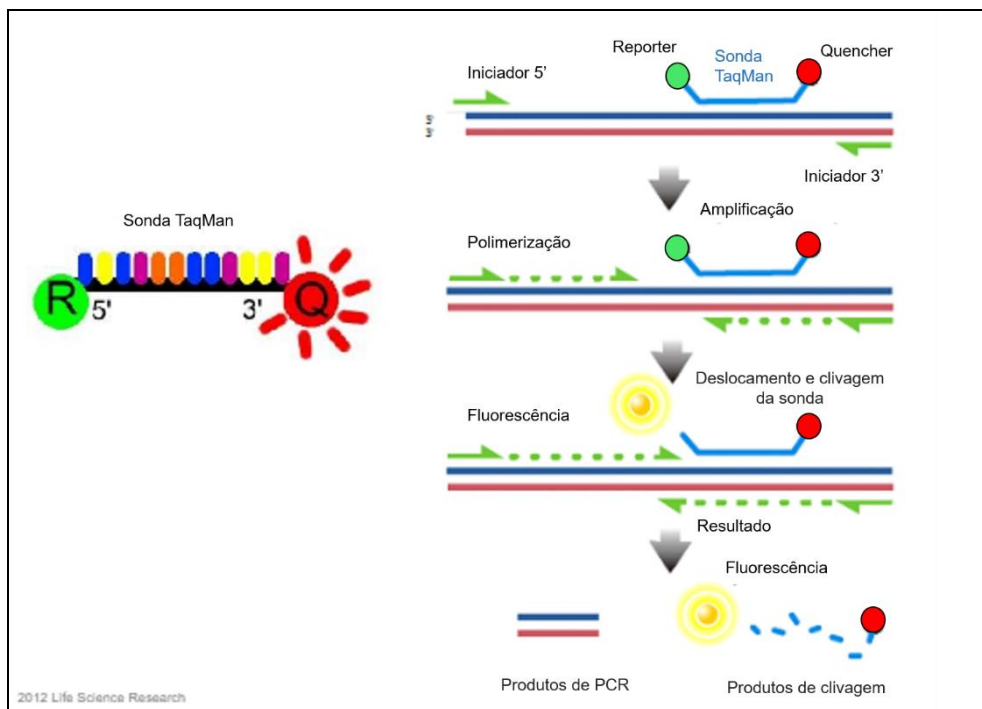
A partir da qPCR é possível monitorar a amplificação do DNA no momento em que a reação está ocorrendo, isto é, em tempo real. Para estimar a quantidade de DNA alvo presente em uma amostra, a técnica utiliza o ciclo limiar de detecção (Ct ou ciclo *threshold*), cuja amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez por emissão de sinal fluorescente que ultrapassa o valor pré-definido de limite

(*threshold*). O ensaio de quantificação mede a quantidade de ácido nucléico alvo presente em determinada amostra, a cada ciclo de amplificação da qPCR (HIGUCHI et al., 1993). Quanto mais elevado o número de cópias iniciais do ácido nucléico alvo, mais rápido (menor valor de Ct) será visualizado o crescimento significativo da fluorescência (VITZHUM et al., 1999; NOVAIS, 2004; VELASCO et al., 2006). A *Applied Biosystems* desenvolveu dois sistemas de detecção de sequência: o Sistema SYBR® e o Sistema Taqman® (APPLIED BIOSYSTEMS, 2002).

O sistema SYBR® utiliza o corante SYBR®Green, que é um intercalante de DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme este se acumule durante os ciclos da reação (ZIPPER et al., 2004; BENGTSSON et al., 2003). Durante a PCR, a DNA Polimerase amplifica a sequência alvo, a partir dos iniciadores específicos, gerando os *amplicons*. O corante SYBR®Green se liga a qualquer nova cópia de DNA dupla-fita. Assim, o resultado é tido como o aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR (RUTLEDGE & COTE, 2003). A vantagem desse sistema incide no fato de não ser necessário o uso de sonda interna fluorescente, o que reduz a configuração do ensaio e os custos de execução. A desvantagem é que o SYBR®Green detectará a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla-fita, inclusive produtos de reação não específicos, como dímeros de iniciadores, podendo gerar resultados falso-positivos ou ainda superestimativas de DNA total (NOVAIS, 2004).

O sistema TaqMan® detecta um produto específico da PCR conforme o seu acúmulo durante os ciclos da reação a partir de uma sonda fluorescente (Figura 6), desenhada internamente para o alvo amplificado (HEID et al., 1996). Esta sonda contém um corante fluorescente *Reporter* na extremidade 5' e um *Quencher* (inibidor da fluorescência) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta (não hibridizada ao alvo específico), a proximidade do *Quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *Reporter* (Efeito de Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência, do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer* ou FRET) (ALBERTS et al., 2002). Se a sequência-alvo de DNA estiver presente, a sonda se anela logo após a um dos iniciadores e é clivada através da atividade nucleásica 5' da Taq DNA polimerase enquanto o iniciador é estendido. Com a clivagem da sonda, o *Reporter* é separado do *Quencher*, aumentando o sinal do corante *Reporter* (HEID et al., 1996). A sonda é removida da fita alvo de DNA, permitindo que a extensão do iniciador continue até o final da fita molde. Assim, moléculas do corante *Reporter* são clivadas em suas respectivas sondas, resultando em um aumento na intensidade de

fluorescência, de acordo com a quantidade de *amplicon* produzido. Esse sistema tem como vantagens (i) a hibridização específica entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente, o que aumenta a especificidade da reação (HOLLAND et al., 1991); e (ii) as sondas podem ser marcadas com corantes *Reporter* distintos, os quais permitem a amplificação de duas ou mais sequências distintas em uma única reação (reação em multiplex). A principal desvantagem é a necessidade de síntese de diferentes sondas para alvos distintos, o que eleva os custos da reação (NOVAIS, 2004).



**Figura 6:** Esquema do sistema TaqMan.

A sonda TaqMan contém um corante fluorescente Reporter na extremidade 5' (em verde) e um Quencher (em vermelho) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta ocorre o Efeito FRET. A sonda se anela à sequência alvo logo após um dos iniciadores e é clivada através da atividade nucleásica 5' da Taq DNA polimerase enquanto o iniciador é estendido. Com a clivagem da sonda, o Reporter é separado do Quencher, aumentando o sinal fluorescente do corante Reporter. A sonda é removida da fita alvo e, assim, moléculas do corante Reporter são clivadas em suas respectivas sondas, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, de acordo com a quantidade de *amplicon* produzido (Modificado de GIUSTI, 2012).

De maneira geral, o bom desempenho das técnicas de PCR exige alta qualidade da extração de DNA das amostras a serem estudadas. A presença de inibidores da PCR pode reduzir a sua eficiência, resultando em falso negativo na PCR convencional ou quantificação subestimada ou ausência de quantificação da carga parasitária na qPCR. Sendo assim, todos os ensaios de PCR para diagnóstico

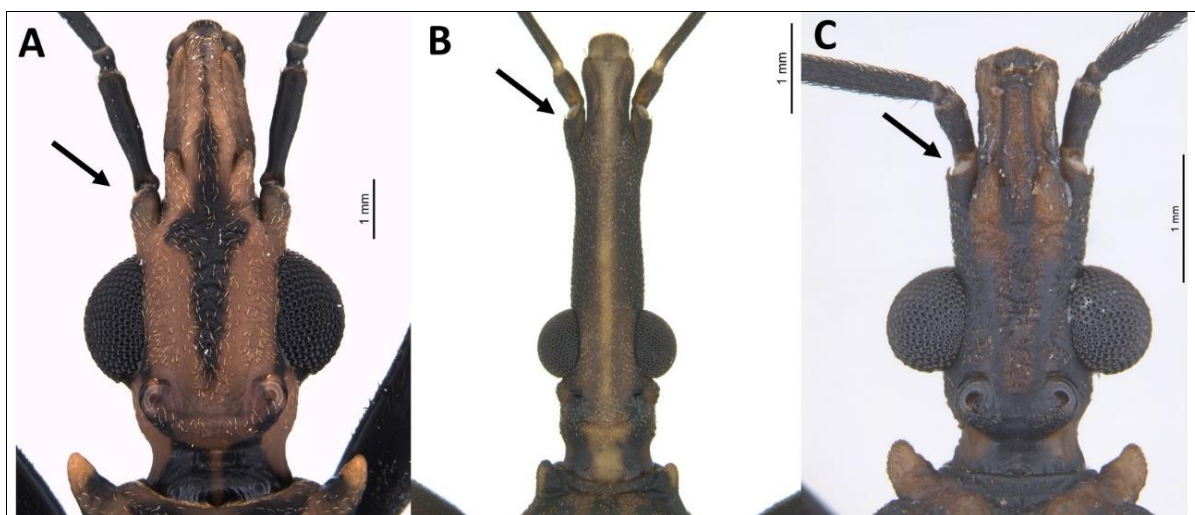
devem incluir um controle interno ou exógeno que possibilite controlar a qualidade do DNA recuperado e eventual presença de inibidores nas amostras.

Em 2012, nosso grupo demonstrou pela primeira vez a aplicação acurada do sistema SYBR®Green de qPCR para a quantificação dos níveis de carga parasitária por *T. cruzi* em amostras de intestino de *R. prolixus* mantidos em laboratório, objetivando investigar o papel da cruzipaina na interação do parasito com o hospedeiro triatomíneo (UEHARA et al., 2012). Os ensaios foram realizados independentemente para dois alvos moleculares: DNA satélite de *T. cruzi* (PIRON et al., 2007) e gene para o RNA ribossomal 12S de *R. prolixus* (novo iniciador desenhado pelo nosso grupo), como controle interno da reação (UEHARA et al., 2012). Em 2015, DIAS e colaboradores desenvolveram um sistema TaqMan® de qPCR, também direcionado para o DNA satélite de *T. cruzi*, para monitorar a colonização do parasito no trato digestório de *R. prolixus* durante o estabelecimento da infecção no vetor, a fim de gerar maior conhecimento sobre a dinâmica de colonização no intestino do inseto (DIAS et al., 2016). Mais recentemente, em 2017, publicamos o artigo “*Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and Trypanosoma cruzi load in triatomine vectors*” (MOREIRA et al., 2017), fruto do meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) quando eu ainda era aluna de Iniciação Científica. Neste estudo, desenvolvemos metodologias altamente sensíveis baseadas na PCR para monitorar a infecção por *T. cruzi* em intestinos de diferentes espécies de triatomíneos coletados no campo. Esse ensaio possibilitou avaliar a carga parasitária e possivelmente poderá ser útil como um biomarcador promissor da competência vetorial de triatomíneos em áreas endêmicas da DCh.

#### **1.4 O inseto vetor**

Os triatomíneos são insetos vetores do *T. cruzi* e pertencem à subfamília Triatominae (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae) (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Esta subfamília divide-se em cinco tribos (Rhodniini, Triatomini, Cavernicolini, Bolboderini e Alberproseniini), incluindo 18 gêneros e 153 espécies atuais e 3 fósseis (SOUZA et al., 2016; BARGUES et al., 2017; JUSTI & GALVÃO 2017; ROSA et al., 2017; DORN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; LIMA-CORDÓN et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2019; POINAR Jr. 2019; ALEVI et al., 2020; ZHAO et al., 2021). No Brasil, já foram registradas 66 espécies de triatomíneos com

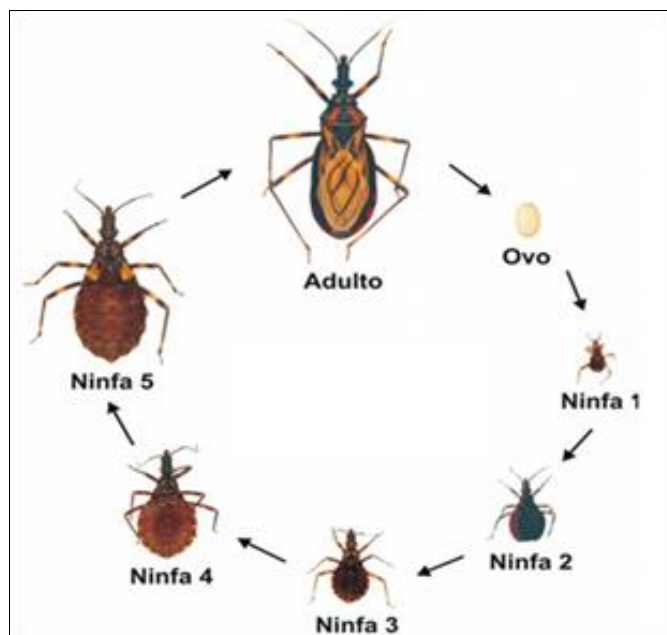
potencialidade para transmitir o parasito nas 27 unidades federativas (GALVÃO & GURGEL-GONÇALVES, 2014; SOUZA et al., 2016). Cerca de dez espécies e três gêneros (*Triatoma* Laporte 1832, *Panstrongylus* Berg 1879 e *Rhodnius* Stal 1859) são epidemiologicamente mais importantes devido aos seus aspectos comportamentais (REY, 2011; JURBERG et al., 2014). A inserção das antenas nos tubérculos anteníferos auxilia na diferenciação destes principais gêneros (Figura 7).



**Figura 7:** Diferenciação dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* pelo ponto de inserção das antenas no tubérculo antenífero (indicado pela seta). (A) *Panstrongylus lignarius*: as antenas encontram-se inseridas junto à margem anterior dos olhos. (B) *Rhodnius neglectus*: as antenas apresentam-se no ápice da cabeça. (C) *Triatoma maculata*: as antenas inserem-se na metade da distância entre o ápice da cabeça e a margem anterior dos olhos. Imagens utilizadas da Coleção de Triatominae UNESP Araquara - <https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae>. Acesso em 28 de abril de 2021.

Estes insetos têm hábitos noturnos, permanecendo em seus abrigos durante o dia (DIAS et al., 2013). São hematófagos estritos em todas as fases de vida, possuindo uma probóscida retilínea com apenas três segmentos (REY, 2011). A sua metamorfose é incompleta (hemimetábolos) e as alterações morfológicas são gradativas ao longo do seu crescimento e desenvolvimento (ARGOLO et al., 2008; MESSIAS, 2011; OLIVEIRA, 2013). O seu ciclo de vida é representado por ovo, cinco estádios ninfais (N1 a N5) e uma fase adulta (macho ou fêmea), havendo nesta o surgimento das asas e a completa diferenciação sexual (ARGOLO et al., 2008) (Figura 8). Na maioria dos triatomíneos, esses ovos são depositados livremente no substrato, mas em algumas espécies o ovo contém uma substância adesiva, podendo ficar preso em pelos e penas de animais ou materiais presentes no peridomicílio que são levados para as habitações humanas, fatores importantes para a dispersão passiva desses vetores (SOLER et al., 1969; SCHOFIELD & DIAS, 1999; OPAS, 2020). O ciclo biológico completo em Triatominae pode variar de 6 a 24 meses, e essa variação pode estar relacionada a fatores bióticos (OPAS, 2020).

Conhecer a biologia do inseto é importante para a elaboração de medidas de controle, já que a aplicação de inseticidas nos domicílios deve evitar que os insetos cheguem à fase adulta, diminuindo as chances de recolonização do ambiente que foi tratado (DIAS, 1991; OPAS, 2020).



**Figura 8:** Ciclo de vida de um triatomíneo – *Triatoma brasiliensis brasiliensis*. (ARGOLO et al., 2008)

A família Reduviidae inclui diversas subfamílias, sendo a subfamília Triatominae a única que realiza a hematofagia obrigatória em animais vertebrados para a conclusão do ciclo de vida do inseto (ALMEIDA et al., 2014). Algumas espécies, como *Belminus herreri* (SANDOVAL et al., 2004) e *Triatoma circummaculata* Stål, 1859 (LOROSA et al., 2000a; RUAS-NETO et al., 2001), conseguem se desenvolver realizando a hemolinfagia em baratas no laboratório. Sabe-se que os triatomíneos podem se alimentar da hemolinfa de outros insetos para sobreviver à estivação (LOROSA et al., 2000a; RUAS-NETO et al., 2001; ANGULO & SANDOVAL et al., 2001; ALMEIDA et al., 2002a; DURÁN et al., 2016) e realizar a coprofagia (ingestão das fezes/urina) e a cleptohematofagia (sangue retirado do intestino de outro triatomíneo) (RYCKMAN, 1951; LAZZARI et al., 2018) em que o *T. cruzi* é excepcionalmente transmitido de vetor a vetor (SCHAUB, 1988; JURBERG & GALVÃO, 2006). Além destas, em 2016, DÍAZ-ALBITER et al. descreveram o primeiro relato de alimentação experimental com açúcar e fitofagia em triatomíneos.

A maioria das espécies vive em ecótopos silvestres e está associada a mamíferos, aves e répteis. Porém, com as crescentes mudanças ocorridas no

habitat natural destes insetos e a alta disponibilidade de alimentação sanguínea, houve a adaptação e instalação de algumas espécies no ecótopo artificial ocupado pelo homem, no ambiente domiciliar e peridomiciliar, especialmente em frestas e rachaduras das casas, galinheiros, currais, amontoados de telhas, tijolos, lenhas e em paióis (GAUNT & MILES, 2000; ALMEIDA et al., 2014).

Cada um dos três gêneros de triatomíneo de alta importância epidemiológica possui sua especificidade ecológica. As espécies de *Rhodnius* estão normalmente associadas a palmeiras, nas quais são encontrados pássaros, pequenos roedores e lagartos (LIMA & SARQUIS, 2008); as de *Panstrongylus* são predominantemente encontradas em tocas ou cavidades de árvores; e as espécies do gênero *Triatoma* são comumente encontradas em frestas de rochas e tocas de roedores. Dentro deste gênero, há ainda espécies exclusivamente encontradas em cavidades das árvores ou em ninhos, enquanto outras em cavernas com morcegos (GAUNT & MILES, 2000; COSTA et al. 2003; SARQUIS et al. 2006; FREITAS et al. 2004; ALMEIDA et al., 2014).

Os triatomíneos são vetores biológicos em que o agente etiológico se multiplica e se desenvolve em seu interior antes de ser transmitido para um hospedeiro vertebrado. Na transmissão biológica, há especificidade entre o vetor e o patógeno, decorrente de condições fisiológicas e bioquímicas próprias dos tecidos do hospedeiro invertebrado, onde ocorre a interação parasito-vetor.

A capacidade vetorial está relacionada aos parâmetros ecológicos, comportamentais e fisiológicos de um vetor biológico e é definida como a velocidade com que o parasito pode ser disseminado entre os indivíduos susceptíveis de uma área por meio deste vetor (FORATTINI, 1992; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2013). Esta capacidade do vetor de disseminar o parasito irá depender de diversos fatores, como: (i) a eficiência de reprodução do vetor em ambientes artificiais e sua longevidade; (ii) a suscetibilidade à infecção pelo parasito e este dispor de (iii) ampla capacidade de metaciclogênese; (iv) além da capacidade de ingerir volume de sangue expressivo; e (v) apresentar curto período de repasto e (vi) intervalo reduzido entre o repasto e a dejeção, já que a transmissão vetorial se dá pela penetração das formas infectantes do parasito, eliminadas nas fezes e urina do triatomíneo durante a sua alimentação no hospedeiro vertebrado (ARGOLO et al., 2008; DIAS et al., 2013). Vale ressaltar que a competência vetorial é um dos fatores que fazem parte da capacidade vetorial, uma vez que é preciso que o vetor se infecte, propiciando a multiplicação e a transmissão do parasito a um hospedeiro

vertebrado. Esta habilidade é influenciada por fatores genéticos, pela carga parasitária no hospedeiro vertebrado infectado, fatores ambientais e climáticos, barreiras fisiológicas (como a diferença de pH em cada porção do intestino do inseto) e a microbiota do inseto vetor (BENNETT et al., 2002; OLIVEIRA, 2013; DIÁZ et al., 2016; VIEIRA et al., 2018; WALTMANN et al., 2019).

*Triatoma infestans* foi (e permanece sendo, juntamente com *R. prolixus*) o principal vetor na América do Sul e Central. Em 2006, o Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão de *T. cruzi* por este vetor. No entanto, por razões desconhecidas, focos residuais deste vetor ainda são encontrados na Bahia e Rio Grande do Sul (GURGEL-GONÇALVES et al., 2012; PESSOA et al., 2015; BRANDÃO et al., 2015). Adicionalmente, muitas espécies, como *Triatoma sordida* Stål, 1859; *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843; *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964; *T. brasiliensis* Neiva, 1911; *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 e *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 vêm ocupando em algumas regiões do Brasil os nichos que foram liberados pelo *T. infestans* no peridomicílio e intradomicílio, aumentando os riscos de infecção por *T. cruzi* ao homem (ZELEDÓN; RABINOVICH, 1981; CARBAJAL DE LA FUENTE; CATALÁ, 2002; COSTA et al., 2003; BRASIL, 2009; CORTEZ et al., 2010).

O Rio Grande do Sul, área de estudo do presente trabalho, abriga uma ampla fauna de triatomíneos, representada por 13 espécies, a saber: *P. megistus*, *Panstrongylus tupynambai* Lent, 1942; *Triatoma delpontei* Romañae Abalos, 1947; *T. infestans*, *T. sordida*, *Triatoma platensis* Neiva, 1913 e as espécies pertencentes ao subcomplexo *T. rubrovaria* (GALVÃO & GURGEL-GONÇALVES, 2014), foco deste estudo. O subcomplexo *T. rubrovaria* é composto por *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha e Lent, 1998; *T. circummaculata*, *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent e Galvão, 2001; *Triatoma oliveirai* Neiva, Pinto e Lent, 1939; *T. rubrovaria* (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009), *Triatoma limai* Del Ponte, 1929 (PITA et al., 2016), *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha e Rocha, 2013 (JURBERG et al., 2013), *Triatoma patagonica* Del Ponte, 1929 e *Triatoma guaysana* Wygodzinsky & Abalos, 1949 (KIERAN et al., 2021). No território gaúcho os triatomíneos podem ser classificados como espécies introduzidas de hábitos sinantrópicos (*T. infestans* e *T. sordida*) e espécies autóctones de hábitos silvestres (as demais 12 espécies) (GALVÃO, 2014). *Triatoma rubrovaria* tem sido encontrada no interior de habitações e em áreas peridomiciliares (ALMEIDA et al., 2000; COSTA et al., 2009; SILVEIRA & MARTINS, 2014), o que sugere adaptação do inseto ao ambiente antrópico. No



peridomicílio, essa espécie pode ser capturada sob as rochas, cercas, muros ou paredes construídas com rochas sobrepostas (SHERLOCK, 1979; SILVEIRA & MARTINS, 2014). *Triatoma rubrovaria* é a espécie mais importante epidemiologicamente do subcomplexo *T. rubrovaria* devido a sua capacidade de transmissão de *T. cruzi*, seguida de *T. circummaculata* e *T. carcavalloi* (CARDOZO-DE-ALMEIDA et al., 2014). Essas três espécies são simpátricas, presentes em ambientes silvestres rochosos (consideradas espécies rupestres), e exibem hábito alimentar eclético (ALMEIDA et al., 2002a; CARDOZO-DE-ALMEIDA, 2007).

### 1.5 Identificação taxonômica de triatomíneos

A primeira descrição taxonômica de Triatominae foi a de um macho de *Triatoma rubrofasciata* realizada por De Geer (1773). A partir do século XX, com a descoberta dos triatomíneos como vetores do agente etiológico da DCh, diversos estudos de descrição das espécies foram publicados (NEIVA, 1911; PINTO, 1925; DEL PONTE, 1930; NEIVA & LENT, 1936, 1941; USINGER, 1944; ABALOS & WYGODZINSKY, 1951; RYCKMAN, 1962; GALVÃO, 2003), culminando com a importante revisão sistemática de LENT & WYGODZINSKY (1979). A taxonomia clássica baseia-se na morfologia para descrever, nomear e classificar os seres vivos (GODFRAY, 2002; MONTEIRO et al., 2018). Com o intuito de solucionar problemas taxonômicos, uma nova abordagem tem sido utilizada nos últimos anos, a chamada Taxonomia Integrativa, que reúne dados de morfologia, genética, biogeografia, ecologia e comportamento (DAYRAT, 2005; MONTEIRO et al., 2018). Com o advento da biologia molecular e utilização de marcadores moleculares para identificação taxonômica foi possível observar que algumas espécies: (i) compartilham características morfológicas, mas são geneticamente distintas (NOIREAU et al., 1998; NOIREAU et al., 2002; PAVAN & MONTEIRO, 2007); (ii) são morfológicamente distintas, mas representam uma mesma espécie (DUJARDIN et al., 1999; NOIREAU et al., 2000a,b).

As limitações taxonômicas como polimorfismo cromático intrapopulacional e ocorrência de espécies crípticas dificultam o desenvolvimento de estratégias acuradas de eliminação e vigilância entomológica eficientes para triatomíneos (NOIREAU et al. 1998, 1999; SCHROEDER et al. 2003; MONTEIRO et al., 2018), uma vez que as espécies crípticas podem ter importâncias epidemiológicas distintas – como é o caso, por exemplo, de *R. prolixus* e *Rhodnius robustus*. Desta forma,

órgãos ligados à saúde pública incentivam projetos integrando a taxonomia morfológica com a molecular, a fim de garantir respostas mais rápidas e acuradas (AMORIM, 2002; MONTEIRO et al. 2013; MESQUITA et al. 2015). Métodos com base em sequências de DNA tendem a produzir uma maior compreensão da biodiversidade, detectando, por exemplo, divergência interespecífica em indivíduos reconhecidos erroneamente como uma única morfoespécie (SMITH et al., 2005).

Os marcadores moleculares mais utilizados em insetos, incluindo para triatomíneos, são os mitocondriais. O DNA mitocondrial (mtDNA) contém genes essenciais ao processo celular de fosforilação oxidativa, está presente em quase todos os eucariotos e possui herança exclusivamente materna (LANG et al., 1999; GRAY et al., 2004; BULLERWELL & GRAY, 2004; PAVAN & MONTEIRO, 2014). O mtDNA apresenta taxa de mutação muito maior quando comparada à taxa do DNA nuclear (PAVAN & MONTEIRO, 2014). Marcadores mitocondriais são adequados para análises populacionais e filogeográficas, mas não são aconselháveis em estudos sobre híbridos e àqueles contendo espécies filogeneticamente distantes (com exceção dos genes 12S e 16S) (PAVAN & MONTEIRO, 2014). Em 2003, Monteiro e colaboradores revelaram que *R. robustus* é um táxon distinto de *R. prolixus* e que compõe um complexo de espécies crípticas. Mais tarde, Pavan & Monteiro (2007) desenvolveram uma PCR multiplex com base em fragmentos de Cyt b para diferenciar em géis de agarose amostras de *R. prolixus* das linhagens de *R. robustus*, ao gerar *amplicons* com tamanhos distintos. Além de *R. robustus*, outros estudos envolvendo complexos de espécies crípticas, a partir do sequenciamento de fragmentos do Cyt b foram realizados, como por exemplo, *T. brasiliensis* (MONTEIRO et al. 2004, ALMEIDA et al. 2008, MENDONÇA et al. 2009) e *T. rubida* (PFEILER et al. 2006). O Cyt b também foi utilizado em estudos populacionais com as espécies *T. infestans* (GIORDANO et al. 2005), *R. prolixus* (FITZPATRICK et al. 2008) e *T. dimidiata* (BLANDÓN-NARANJO et al. 2010).

Desde a década de 90, autores chamam a atenção para o uso de diferentes metodologias para a identificação de novas espécies (NOIREAU et al., 1998; DUJARDIN et al., 1999; MONTEIRO et al., 2018). As variações cromáticas, no tamanho e na forma das estruturas morfológicas dos triatomíneos podem dificultar ou gerar erros na descrição de espécies pela taxonomia clássica (SCHOFIELD & GALVÃO, 2009; MONTEIRO et al., 2018). O polimorfismo cromático intrapopulacional foi observado pela primeira vez em *T. rubrovaria* por Almeida e colaboradores (2002b). Espécimes de *T. rubrovaria* foram coletados em quatro

municípios com distância entre 75 e 322 km e analisados por padrões de cores e isoenzimas. O estudo mostrou a existência de, pelo menos, duas populações distintas de *T. rubrovaria* no RS com diferentes padrões fenotípicos e genéticos.

O subcomplexo *T. rubrovaria* foi objeto de estudo em dois projetos de doutorado no ano de 2017 que tinham como objetivo geral identificar as espécies deste subcomplexo utilizando a taxonomia integrativa. Coutinho (2017) combinou diferentes metodologias, como morfometria geométrica dos adultos, quimiotaxonomia (hidrocarbonetos cuticulares) e marcadores moleculares (Cyt b). A morfometria geométrica diferenciou as espécies *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. klugi* dos diferentes morfotipos de *T. rubrovaria*. O perfil de hidrocarbonetos cuticulares permitiu a comparação das espécies *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*, indicando ser uma ferramenta útil na descrição desse grupo de espécies de triatomíneos. No entanto, os dados de biologia molecular para esse grupo foram inconclusivos, pois a divergência observada foi insuficiente para a resolução da filogenia (COUTINHO, 2017). O estudo realizado por Silva (2018) utilizou a microscopia eletrônica de varredura para descrever os caracteres da cabeça, tórax e abdômen, possibilitando a distinção de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*. As análises morfométricas de 14 parâmetros da cabeça, tórax e abdomen possibilitaram a distinção de *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*; e as de dois caracteres da cabeça de fêmeas e de dois caracteres da cabeça de machos permitiram distinguir *T. circummaculata* de *T. pintodiasi*. Já a partir da análise de morfometria geométrica do tamanho do centroide, da análise discriminante e do dendograma de similaridade morfométrica, foi possível observar que *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* formam um único agrupamento. Por fim, as análises dos genes mitocondriais COI, Cyt b e do gene ribossomal 16S confirmaram que *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* constituem um subcomplexo; e que *T. circummaculata* e *T. pintodiasi*, embora distintas, são espécies irmãs (SILVA, 2018).

A identificação taxonômica de complexos de espécies semelhantes morfológicamente e simpátricas torna-se essencial para a melhoria do controle de vetores e estratégias de vigilância, principalmente se as espécies pertencentes ao complexo possuem diferenças em suas capacidades vetoriais.

## 1.6 Competência vetorial e comportamento do inseto vetor

A incidência de uma doença cujo agente etiológico é transmitido por um inseto vetor pode ser determinada por vários fatores, incluindo a densidade de vetores com ampla capacidade vetorial, eficiência de replicação e infectividade do parasito em hospedeiros vertebrados e invertebrados, além da presença de hospedeiros (COLLEY, 2000; JANSEN et al., 2018). A dispersão dos parasitos depende do comportamento de seus vetores artrópodes (MARLIÉRE et al., 2015). Embora a gama de conhecimento acerca da competência vetorial de triatomíneos seja escassa quando comparado a outros vetores, como carrapatos e mosquitos, estudos relevantes sobre a fisiologia, comportamento, genética, distribuição geográfica, ecologia e padrões de alimentação têm sido descritos, desde a comprovação do papel dos triatomíneos como vetores de *T. cruzi* por Carlos Chagas (RABINOVICH et al., 2011).

O *T. cruzi* é transmitido principalmente através da urina/fezes de triatomíneos (GARCIA et al., 2007). Segundo LENT & WYGODZINSKY (1979), alguns fatores devem ser considerados na avaliação de uma determinada espécie atuando como um vetor potencial para a transmissão do *T. cruzi*: (i) sua habilidade em colonizar o interior de moradias; (ii) sua capacidade de estabelecer populações em habitats domésticos ou peridomésticos; (iii) sua habilidade em adquirir infecção pelo *T. cruzi* e a taxa de infecção natural na população de triatomíneos; (iv) tempo e taxa de dejeção durante e após a alimentação. Os comportamentos de busca de hospedeiros e de alimentação / excreção são alguns dos parâmetros chave para determinar a capacidade vetorial destes insetos (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Dados recentes mostram que o *T. cruzi* causa impactos negativos na aptidão do vetor (GUARNERI & LORENZO, 2017), como por exemplo, prejudicando a fertilidade, o desenvolvimento e a sobrevivência (OLIVEIRA et al., 2010; NOUVELLET et al., 2011; FELLETT et al., 2014; ELLIOT et al., 2015; CORDERO-MONTOYA et al., 2019). No entanto, os fenótipos comportamentais dos triatomíneos infectados podem ser discrepantes, com um aumento na atividade locomotora de *Triatoma pallidipennis* Stal 1945 (RAMÍREZ-GONZÁLEZ et al., 2019) ou uma redução da atividade de *R. prolixus* (MARLIÉRE et al., 2015). Considerando o comportamento de alimentação / excreção, parece que a infecção por *T. cruzi* não influencia na quantidade de sangue ingerido por *R. prolixus* ou no período de tempo entre a alimentação sanguínea e a excreção (TAKANO-LEE & EDMAN, 2002), mas

em *T. infestans* esses parâmetros comportamentais são influenciados pela presença do parasito no trato digestório do vetor (PEREYRA et al., 2020). Na verdade, o impacto da infecção por *T. cruzi* no fenótipo do comportamento do inseto é pouco estudado, requerendo mais atenção (LAZZARI et al., 2013). Ademais, mudanças no comportamento do vetor devido à infecção pelo parasito podem contribuir para um melhor entendimento da dinâmica de transmissão de patógenos.

Os programas de controle da DCh são baseados na eliminação de vetores domiciliados por meio de pulverização com inseticida em ambientes fechados (ABAD-FRANCH et al., 2010). Quando a vigilância entomológica cessa, os vetores nativos voltam a invadir as habitações, o que pode levar à transmissão do parasito (GÜRTLER et al., 2007; ABAD-FRANCH et al., 2013). A eliminação do vetor *T. infestans* no Brasil, em grande parte, reduziu a incidência e a carga da doença (ABAD-FRANCH et al., 2013). No entanto, espécimes nativos de *T. rubrovaria* têm sido constantemente coletados no interior de habitações humanas e ecótopos peridomiciliares no sul do Brasil (ALMEIDA et al., 2000; SILVEIRA & MARTINS, 2014). Além disso, esta espécie (i) possui alimentação sanguínea eclética, sendo capaz de se alimentar em humanos (ALMEIDA et al., 2002); (ii) já foi coletada naturalmente infectada com *T. cruzi* (MARTINS et al., 2008); (iii) excreta tripomastigotas metacíclicos em condições de laboratório (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & MOREIRA, 1994); e também (iv) possui características bionômicas que podem ser favoráveis para contrair a infecção e transmitir o parasito ao homem (ALMEIDA et al., 2005).

### **1.6.1 Hábito alimentar de triatomíneos**

O interesse na identificação das fontes alimentares de insetos hematófagos foi ampliado a partir de novos conhecimentos relacionados com o envolvimento destes insetos na veiculação de patógenos causadores de doenças. Estabelecer o padrão alimentar de insetos hematófagos é de suma importância para o entendimento de sua biologia e de sua participação nos ciclos de transmissão dos diversos patógenos na natureza, o que pode afetar humanos, animais silvestres e animais domésticos (DUARTE, 1997; RABINOVICH et al., 2011). Através dos estudos de fonte alimentar, é possível conhecer o comportamento dos insetos hematófagos, uma vez que foi observado que tal comportamento pode se modificar segundo as alterações do ambiente e de acordo com a oferta alimentar existente (BHEHAM & GARRET-JONES 1973; DUARTE, 1997).

A hematofagia é um hábito obrigatório de triatomíneos durante todo o ciclo de vida desses insetos, sendo uma fonte de energia e nutrientes (LEHANE, 2005). Populações de triatomíneos estão intimamente relacionadas à disponibilidade de alimentos e, portanto, à distribuição (na maioria das vezes) dos mamíferos e aves na natureza. A acessibilidade de hospedeiros é o principal fator que modula os padrões de alimentação sanguínea dos triatomíneos (RABINOVICH et al., 2011), e os primeiros trabalhos descrevem a importância e a amplitude de suas dietas (BRUMPT, 1927). Porém, ainda hoje, existem poucos dados acerca das fontes de alimentação de sangue e preferências tróficas (caso existam) das populações silvestres de espécies de triatomíneos (BUIRAGO et al., 2016). A identificação de fontes alimentares de triatomíneos é importante para entender a dinâmica de transmissão do parasito nos ambientes domiciliar, peridomiciliar e silvestre (RABINOVICH et al., 2011). ARAGÃO (1983) sugeriu que a colonização de novos ecótipos pelo vetor está associada aos hospedeiros vertebrados a eles relacionados. Esta hipótese pode ser avaliada com estudos de fontes alimentares e análises filogenéticas. Assim, o melhoramento das habitações humanas está entre as estratégias mais eficazes para o controle da DCh (RABINOVICH et al., 2011).

A identificação de fontes de alimentação de insetos hematófagos, sob condições naturais, pode ser realizada por métodos imunológicos - teste de precipitina (RODRIGUEZ 1966; LOROSA et al. 1999, 2003), imunoenzimático (DE COLMENARES et al., 1995; AFONSO et al., 2012) ou por ferramentas moleculares – baseadas na PCR (MOTA et al., 2007; PIZARRO & STEVENS 2008; HAMER et al., 2009; MALEKI-RAVASAN et al., 2009; KENT, 2009; CHAVES et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2015). Embora as técnicas imunológicas sejam sensíveis e de menor custo, ainda assim possuem desvantagens como a necessidade de mão-de-obra especializada; alguns reagentes podem degradar-se com facilidade, com exposição à luz do sol ou a elevadas temperaturas; e por ser uma técnica sensível e específica, é muito susceptível a erros de pipetagem, variações nos tempos de incubação e lavagens e alterações nos reagentes (SENA, 2010). A abordagem molecular tem sido amplamente utilizada, apresentando maior precisão para a pesquisa do hábito alimentar de diversos vetores hematófagos (KIRSTEIN & GRAY, 1996; SANT'ANNA et al., 2008; DANABALAN et al., 2014). Assim, diferentes alvos moleculares têm sido empregados para identificar a fonte alimentar de insetos vetores, como citocromo b (Cyt b), citocromo oxidase I (COI) e prepronoci-ceptina

(PNOC) (KOCHER et al., 1989; HEOUAS et al., 2007; ABASSI et al., 2009; PEÑA et al., 2012; AZIZI et al., 2016; ARAUJO-PEREIRA et al., 2020).

## 1.7 Justificativa

O Rio Grande do Sul abriga diversas espécies de triatomíneos. Com a modificação ambiental devido às atividades agropecuárias e à eliminação de *T. infestans* (existindo somente focos residuais no noroeste do RS e na Bahia), espécimes de *T. rubrovaria*, embora silvestres, têm sido coletados constantemente dentro de casas, aumentando o risco da transmissão vetorial de *T. cruzi* para humanos. Portanto, esta espécie de vetor é considerada atualmente a mais importante em termos epidemiológicos no território gaúcho, se alimentando de diversos hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Parâmetros bionômicos de *T. rubrovaria* já foram avaliados em condições de laboratório. Esta espécie é capaz de transmitir o *T. cruzi* ao homem e apresenta características biológicas semelhantes aos principais vetores desse parasito, tais como excreção em um curto período de tempo pós-alimentação e próxima ao local de picada, alta resistência ao jejum, ingestão de grandes volumes de sangue e ecletismo alimentar. No entanto, até então, não existem estudos que demonstrem a competência vetorial através de parâmetros biológicos somado à possível modulação do comportamento de *T. rubrovaria* frente à infecção experimental por *T. cruzi*. Além disso, são escassos os estudos que avaliam (concomitantemente) a taxa de infecção natural por *T. cruzi*, a estimativa da carga parasitária no vetor, a identificação do genótipo do parasito e as fontes alimentares de triatomíneos coletados no Rio Grande do Sul.

Sendo assim, neste estudo observamos os principais aspectos relacionados a capacidade vetorial destas espécies provenientes do Rio Grande do Sul: (i) infecção natural por *T. cruzi*, (ii) carga parasitária de *T. cruzi*, (iii) caracterização genética das subpopulações (DTUs) de parasitos circulantes, (iv) fonte alimentar, (v) capacidade da espécie *T. rubrovaria* em infectar-se em laboratório e (vi) comportamento de alimentação e excreção desta espécie. Além disso, buscamos identificar molecularmente as espécies do subcomplexo.

A abordagem interdisciplinar deste trabalho poderá proporcionar o conhecimento fundamental para o desenvolvimento de vigilância entomológica e estratégias de controle destes vetores nas áreas de estudo.





## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar parâmetros bionômicos e moleculares associados à capacidade vetorial de *T. rubrovaria* na dinâmica de transmissão de *T. cruzi* no bioma Pampa (Rio Grande do Sul).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Identificar molecularmente as espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*.
- Identificar as fontes alimentares de triatomíneos de campo.
- Avaliar as taxas de infecção natural por *T. cruzi* no subcomplexo *T. rubrovaria*.
  - Estimar carga parasitária de *T. cruzi*, além de identificar as DTUs do parasito presentes nos vetores.
  - Infectar experimentalmente e avaliar a suscetibilidade de *T. rubrovaria* à infecção por *T. cruzi* (isolado TcVI).
  - Analisar o comportamento alimentar e de dejeção de *T. rubrovaria* infectado por TcVI em condições de laboratório.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

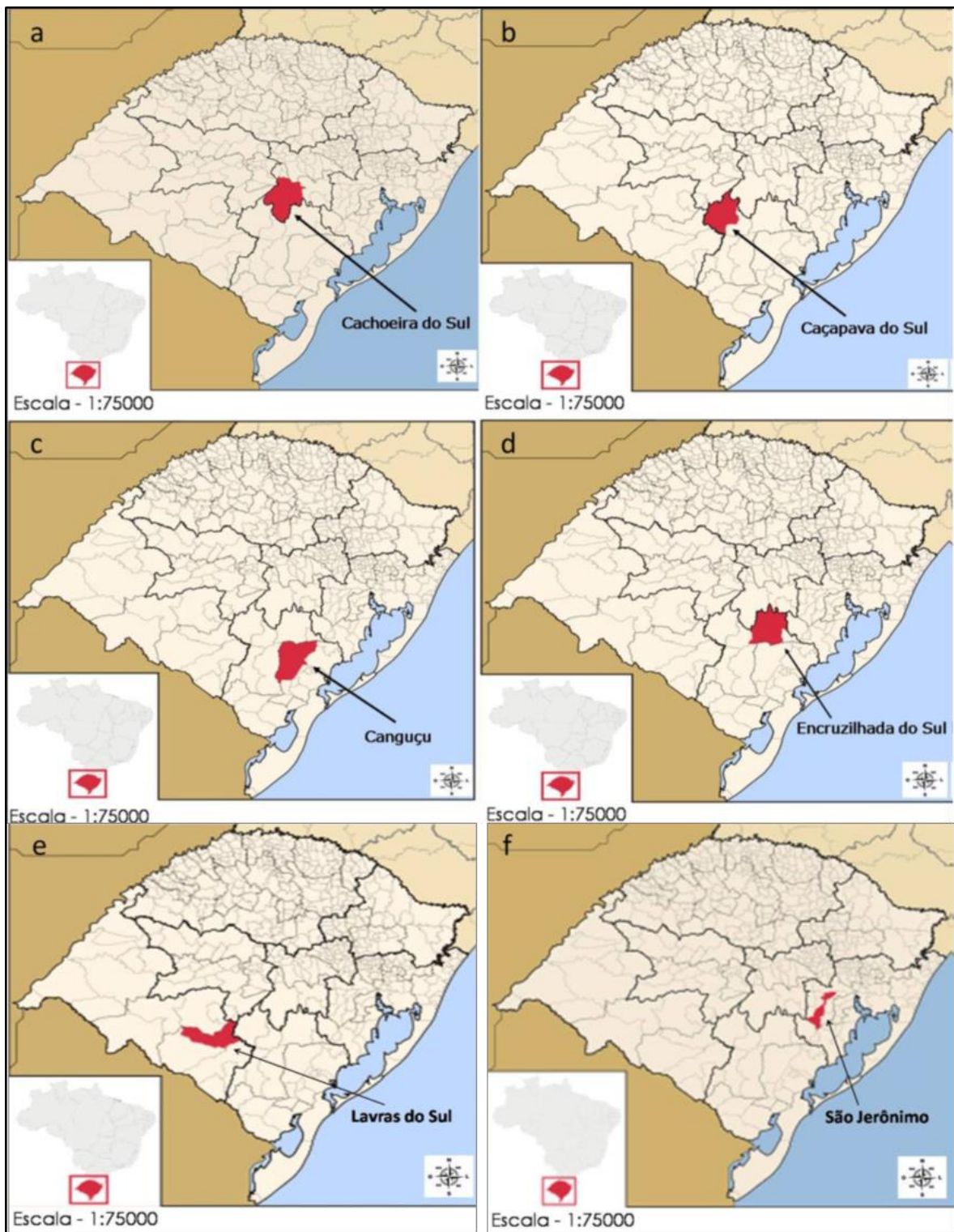
#### 3.1 Captura, identificação morfológica de triatomíneos e área de estudo

O trabalho de campo foi realizado pela aluna em colaboração com o Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera (LIVEDIH) do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz) e com os agentes de saúde dos municípios ligados a Coordenação de Vigilância Epidemiológica do Rio Grande do Sul, em seis municípios nos períodos de Janeiro/2015, Agosto/2016 e Março/2017.

Os insetos foram capturados nos municípios de Caçapava do Sul (30°36'14"S, 53°48'49"O), Encruzilhada do Sul (30°32'38"S; 52°26'51"O), Lavras do Sul (30°36'12"S; 53°47'54"O), Cachoeira do Sul (30°20'49,4"S; 52°45'04"O), Canguçu (31°23'58"S; 052°43'06"O) e São Jerônimo (29°57'32"S; 51°43'19"O) (Figura 9). Estas localidades estão presentes no bioma Pampa, que ocupa 63% do território estadual. O Pampa é caracterizado por uma vegetação rasteira formada por gramíneas e pequenos arbustos. O clima é do tipo subtropical úmido com verões quentes e uma pequena área, localizada na região nordeste, em altitudes mais elevadas, com verões amenos. As temperaturas médias anuais variam entre 15°C e 18°C. A precipitação pluviométrica é bem distribuída ao longo do ano e situa-se entre 1.200 a 1.800 mm anualmente (SRS, 2020).

A vigilância entomológica foi realizada por busca ativa no intradomicílio, no peridomicílio e no ambiente silvestre (Figura 10). Foi considerado peridomicílio a área existente ao redor do domicílio em um raio não superior a 100 m, e o ambiente silvestre aquele com distância superior a 100 m da residência (OLIVEIRA-LIMA et al., 2000). A maioria das unidades domiciliares dos municípios estudados era construída por madeira, sendo avaliadas 30 casas em cada município, com exceção de Encruzilhada do Sul, onde foram vistoriados apenas 3 domicílios. A busca por triatomíneos foi feita debaixo de colchões, atrás de quadros pendurados nas paredes, frestas nas paredes, atrás de mobílias, além de procura por possíveis vestígios da presença destes insetos, como fezes e urina, exúvia e ovos. Já no peridomicílio foram examinados os currais de animais, amontoados de telhas, tijolos e madeiras, casinha de cachorro e sob rochas. E no ambiente silvestre sob as rochas.

Os triatomíneos de campo foram levados vivos (sempre que possível) para o LIVEDIH em tubos plásticos devidamente identificados e georreferenciados (GPS Garmin), com pequenos furos na tampa, contendo papel de filtro em seu interior. Posteriormente, os insetos adultos e algumas ninfas foram identificadas por meio da chave dicotômica preconizada por Lent & Wygodzinsky (1979) e Galvão (2014).



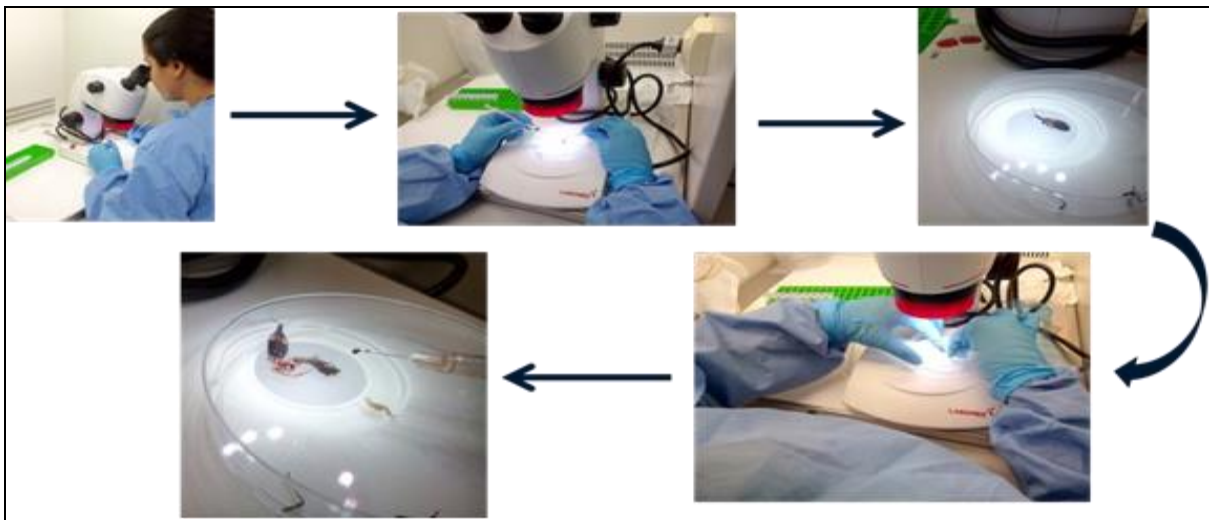
**Figura 9:** Mapas do Estado do Rio Grande do Sul destacando os municípios de Cachoeira do Sul (a), Caçapava do Sul (b), Canguçu (c), Encruzilhada do Sul (d), Lavras do Sul (e) e São Jerônimo (f).  
(LIMA, 2017)



**Figura 10:** Coleta por busca ativa de triatomíneos no Rio Grande do Sul. A, B, C: Intradomicílio. D, E, F: Peridomicílio. G, H, I: Ambiente silvestre.

### 3.2 Extração de DNA

O intestino médio posterior e o intestino posterior de cada triatomíneo foram dissecados (Figura 11) e transferidos para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 200  $\mu$ L da mistura: 194  $\mu$ L de tampão de lise 1X (Tris-HCl 1 mM, EDTA 1 mM, pH 9,2) e 6  $\mu$ L de Proteinase K (150  $\mu$ g/mL, SIGMA-Aldrich®, São Paulo, Brasil). As preparações foram incubadas (2 horas, 56 °C), com agitações constantes, e o DNA foi extraído em colunas de sílica, utilizando o kit de extração QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA), seguindo o protocolo do fabricante com modificação na etapa final de eluição do DNA (eluído em 100  $\mu$ L). O DNA eluído foi dosado no espectrofotômetro Pico200 (Picodrop™) e armazenado a -20° C para posteriores ensaios de PCRC, qPCR, hábito alimentar e identificação de espécies por meio da taxonomia molecular.



**Figura 11:** Dissecção.

Retirada do intestino médio posterior e intestino posterior de triatomíneos para extrair DNA.

### 3.3 Taxonomia molecular

#### 3.3.1 *PCR* e sequenciamento

Para a identificação molecular das espécies, utilizamos o DNA genômico obtido dos intestinos médio posterior e posterior do inseto, como descrito no item 3.2. O DNA genômico das amostras foi submetido à PCR utilizando dois pares de iniciadores que flanqueiam o gene mitocondrial citocromo b (Cyt b): CYTB7432F 5' GGACGWGGWATTTATTATGGATC 3' e CYTB7433R 5' GCWCCAATTCARGTTARTAA 3', amplificando um fragmento de 682 pb (MONTEIRO et al., 2003); e CYTB105-27F 5' GGACAAATATCCCTYTGAGGAGC 3' e CYTB622-45R 5' TCCTTGRAACTTTCTCTTRTTAGT 3', desenhados pelo nosso grupo para este estudo, gerando um produto de 500 pb. Os ensaios foram padronizados com as seguintes condições de reação: volume final de 50  $\mu$ L, contendo 5  $\mu$ L de DNA (20 a 25 ng), 5  $\mu$ L de tampão GoTaq® Flexi Buffer (0,5X), 1,6  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (0,8 mM), 0,5  $\mu$ L de enzima PCR GoTaq® Hot Start (0,02 U), 0,6  $\mu$ L de dNTPs (0,12 mM, Life Technologies, USA), 1,2  $\mu$ L de cada iniciador 7432F e 7433R ou Cytb105-27F e Cytb622-45R (0,24 mM) e 33,1  $\mu$ L de água ultra-pura. A ciclagem térmica foi realizada no aparelho modelo GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies, USA), com a seguinte programação: Hot Start (3 min, 94° C), seguido por 35 ciclos de desnaturação (30 s, 94° C), anelamento (45 s, 56° C), extensão (45 s, 72° C) e extensão final (7 min, 72° C).

Após a amplificação, 20  $\mu$ L do *amplicon* foram misturados com 4  $\mu$ L do tampão da amostra 1X (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno-cianol; 30%

de glicerol), e aplicados em gel de agarose a 1,5% corado com Nancy-520 DNA Gel Stain (SIGMA-Aldrich®, São Paulo, Brasil) e imerso em tampão TBE 1X (Trizma base a 89 mM, Ácido Bórico a 88 mM e EDTA a 2 mM, pH 8,0). A corrida eletroforética foi realizada por cerca de 1:00-1:30h a 80V. O tamanho dos produtos da PCR foi determinado em comparação ao marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder - Invitrogen, California, USA) incluído nos géis. Os fragmentos amplificados foram visualizados por transiluminação em luz ultravioleta e registrados digitalmente pelo sistema de fotodocumentação de imagens em gel – UVP Bioimaging Systems (Upland, CA, USA).

Os produtos obtidos para o gene Cyt b foram purificados utilizando o kit Wizard SV PCR Clean-up System kit (Promega), utilizando as recomendações do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada para ambas as fitas senso e antisenso de cada um dos *amplicons* com uso do kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), com os mesmos iniciadores usados na amplificação, e as amostras foram submetidas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies, USA) à 30 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C a 4 min. Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados, seguindo o protocolo de precipitação com isopropanol para remoção dos dideoxi-nucleotídeos excedentes (<http://webserver.mbi.ufl.edu/~rowland/protocols/isopropprecip.pdf>). Os produtos purificados foram ressuspensos em formamida Hi-Di® (Applied Biosystems) e sequenciados pelo método de Sanger (SANGER et al. 1975) na Plataforma Genômica – Sequenciamento de DNA RPT01A - PDTIS/Fiocruz (ABI 3730XL Applied Biosystem).

### **3.3.2 Análise filogenética**

A edição das sequências das fitas senso e antisenso de cada amostra e a geração da sequência consenso de cada indivíduo foram feitas a partir da observação no programa SEQMAN LASERGENE v.7 (DNAStar, Inc.) dos eletroferogramas gerados no sequenciamento pelo método de Sanger. Todos os sítios ambíguos (e.g. formação de picos duplos ou regiões de repetições nucleotídicas) foram verificados visualmente, para que fossem corrigidos os possíveis erros de leitura durante o sequenciamento. As sequências foram alinhadas na ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004), implementada no programa MEGA-X

v10.2.2 (KUMAR et al., 2018). Para a identificação taxonômica das amostras de campo, foram incluídas nas análises amostras identificadas morfológicamente como *T. rubrovaria*, *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. klugi* e *T. pintodiasi* e mantidas em colônias no laboratório de Referência Nacional e Internacional em Triatomíneos. Infelizmente para esse estudo não foi possível obter amostras de *T. oliveirai* e de *T. limai*.

A determinação inicial das espécies coletadas foi realizada com base na aplicação do conceito filogenético de espécies (MISHLER & BRANDON, 1987), na qual indivíduos agrupados em clados monofiléticos foram considerados como pertencentes a uma mesma espécie. Adicionalmente, foram calculadas as distâncias intra e interclados monofiléticos no programa MEGA-X v10.2.2 (KUMAR et al., 2018), a partir de comparações par-a-par das sequências de Cyt b utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980) e 500 replicações de bootstrap como método de reamostragem. Espera-se que clados que contenham a mesma espécie apresentem valores de divergência entre sequências inferiores àqueles provenientes de comparações entre clados contendo sequências de espécies distintas, e ainda que não haja uma sobreposição entre as divergências intra e interespecíficas (em analogia ao *Barcoding Gap*; cf. ČANDEK & KUNTNER, 2015).

As reconstruções filogenéticas das sequências de Cyt b foram realizadas a partir do método bayesiano no BEAST v2.6.3 (BOUCKAERT et al., 2019). Foram testados dois modelos de árvore filogenética *a priori*, o modelo coalescente de população constante, que assume que todas as sequências derivam de uma mesma espécie e que suas populações permaneceram constantes ao longo do tempo, e o modelo *Birth-Death*, que assume que os nós dos ramos representam eventos de especiação. Para cada análise foram realizadas três corridas independentes com  $6 \times 10^7$  cadeias de Markov e Monte Carlo (MCMC), das quais 10% foram consideradas como *burn-in* e descartadas. O modelo de substituição nucleotídica utilizado foi o Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), determinado a partir do critério de informação bayesiano no programa jModelTest v2.1.1 (DARRIBA, 2012). O programa Tracer (<http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>) foi utilizado para confirmar a convergência das MCMC, a partir da inspeção visual e do cálculo de tamanho amostral efetivo (ESS). Foram encontrados valores acima de 200 (ESS > 500) para cada parâmetro calculado e, portanto, considerados satisfatórios. As árvores filogenéticas geradas foram editadas no programa FigTree v1.4.4



(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). A probabilidade dos clados serem verdadeiros foi estimada a partir do cálculo das probabilidades a posteriori (PP).

### 3.4 Pesquisa de hábito alimentar

Para avaliação do hábito alimentar dos triatomíneos capturados no Rio Grande do Sul, o DNA extraído (item 3.2) diretamente do conteúdo intestinal foi submetido a PCRc utilizando os iniciadores que amplificam o gene citocromo b (Cyt b): 5' CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3' e 5' CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA 3' (BOAKYE et al., 1999; PEÑA et al., 2012). As reações ocorreram em um volume final de 50 µL, consistindo de GoTaq® Green Master Mix (Promega®) 1X, 0,2 µM de cada primer, 5 µL de DNA (20 a 25 ng) e água ultrapura para completar o volume. A ciclagem térmica consistiu de 36 ciclos e foi realizada no aparelho modelo Gene Amp® PCR System 9700, com a seguinte programação, por ciclo: desnaturação (30 s, 95 °C), anelamento (1 min, 55 °C) e extensão (1:30 min, 72 °C). Este programa foi precedido de uma etapa (2 min, 95 °C) para ativação da enzima e após os 36 ciclos foi incluído um passo de extensão final (5 min, 72 °C).

Após a PCRc, 12 µL dos produtos amplificados foram misturados com 2,4 µL do tampão de amostra 1X (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno-cianol; 30% de glicerol), e aplicados em gel de agarose a 2% imerso em tampão TBE 1X (Trizma base a 89 mM, Ácido Bórico a 88 mM e EDTA a 2 mM, pH 8,0) e corado com Nancy-520 DNA Gel Stain (SIGMA-Aldrich®, São Paulo, Brasil). A eletroforese foi realizada por cerca de 20 min a 80V (até todo o conteúdo amostral sair do poço de aplicação), seguida de 40 min a 1 h em 110V. O tamanho dos produtos da PCR foi determinado em comparação ao marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder - Invitrogen, California, USA) incluído nos géis.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por transiluminação em luz ultravioleta e registrados digitalmente pelo sistema de fotodocumentação de imagens em gel – UVP Bioimaging Systems (Upland, CA, USA), sendo submetidos a purificação utilizando o kit comercial illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE, Fairfield, Connecticut, EUA). O material purificado foi submetido ao sequenciamento de DNA pelo método de Sanger como apresentado em 3.3.1. As sequências foram alinhadas com ClustralW10, editadas com BioEdit 7.0.5 e comparadas com as depositadas no banco de dados de Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (do inglês *Basic Local Alignmen Search Tool* ou

BLAST:<<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>), utilizando o algoritmo Blast N na base de dados de nucleotídeos.

### **3.5 Diagnóstico de infecção natural e carga parasitária de *T. cruzi* em triatomíneos de campo**

Os procedimentos moleculares realizados obedeceram às Boas Práticas de Laboratório para evitar contaminações durante os ensaios baseados em PCR: separação física das etapas de extração de DNA e PCRs (pré-reação e pós-reação) e a descontaminação prévia de todos os materiais e capelas/fluxos laminares com o uso de hipoclorito de sódio a 2% ou DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions (AMBION, Austin, TX), no caso dos equipamentos. Todas as ferramentas utilizadas na dissecação do inseto eram descartáveis e submetidas aos mesmos processos. Para monitorar eventual contaminação, foram utilizados controles negativos para as etapas de extração de DNA (dissecação de triatomíneo mantido em insetário do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC, livre de infecção, e tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo) e PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA e um tubo contendo apenas água estéril).

#### **3.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa (PCRc)**

Para a amplificação pela PCR convencional do material genético de *T. cruzi* presente nas amostras de triatomíneos, foram utilizados os iniciadores 121 e 122 que flanqueiam o fragmento de 330 pb das regiões hipervariáveis do kDNA do parasito (STURM et al., 1989; AVILA et al., 1991; BRITTO et al., 1993; WINCKER et al., 1994) (ver figura 5). No mesmo ensaio, em formato duplex, foram introduzidos os iniciadores P2B e P6R, desenhados previamente pelo nosso grupo (UEHARA et al., 2012) e que flanqueiam um fragmento conservado de 163 pb do gene 12S do RNA ribossomal das espécies pertencentes aos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*. As reações da PCR ocorreram em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de DNA (20 a 25 ng), 5 µL de solução tampão 10X (100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500mM de KCl), 9 µL MgCl<sub>2</sub> (4,5 mM), 0,4 µL Platinum Taq DNA polimerase (2 U, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 2 µL dNTPs (0,2 mM, Life Technologies, USA), 1 µL de cada iniciador 121 e 122 (200 nM) e 0,5 µL de cada iniciador P2B e P6R (100 nM), e 19,6 µL de água ultra-pura. A ciclagem

térmica foi realizada no aparelho modelo GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies, USA), com a seguinte programação: Hot Start (12 min, 94 °C), seguido por 36 ciclos de desnaturação (30 s, 94 °C), anelamento (30 s, 55 °C), extensão (30 s, 72 °C) e extensão final (10 min, 72 °C).

Em todas as reações foram incluídos os seguintes controles positivos (os parasitos foram doados pelo LIVEDIH): DNAs de *T. rangeli* (Cepa Macias), *T. cruzi* (Cepa Dm28c) e amostra reconstituída experimentalmente (DNA de lisado de *R. prolixus* não infectado misturado a DNA de *T. cruzi* Dm28c), sendo este último necessário para confirmar a eficiência da reação em multiplex. Também foram incluídos os controles negativos da reação de PCR. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese assim como em 3.4.

### **3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR)**

Para estimar a carga parasitária de triatomíneos positivos para kDNA de *T. cruzi* pela PCRc, foram realizados ensaios de quantificação absoluta utilizando o sistema TaqMan® de qPCR. Assim como na PCRc, os ensaios TaqMan® foram realizados em multiplex, contendo na mesma reação os iniciadores para o gene que codifica a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos (iniciadores P2B e P6R) e sonda Taqman® para triatomíneos (Triat) desenhada pelo nosso grupo (MOREIRA et al., 2017), além dos iniciadores para o alvo DNA nuclear satélite de *T. cruzi* (Cruzi1 e Cruze2), desenhados para amplificar uma região de 166 pb e a sonda Cruze3 (PIRON et al, 2007) (Tabela 1). As reações ocorreram em um volume final de 20 µL contendo 2 µL de DNA (8 a 10 ng), 10 µL do TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems), 1,2 µL de cada iniciador Cruze1 e Cruze2 (600 nM) e 1 µL da sonda Cruze 3 (FAM/NFQ-MGB - Applied Biosystems) (250 nM), 0,6 µL do iniciador P2B (300 nM), 1 µL do iniciador P6R (500 nM) e 0,3 µL da sonda Triat (VIC/NFQ-MGB - Applied Biosystems) (150 nM), além de 2,7 µL de água ultra-pura. Os ensaios foram realizados no equipamento ABI Prism 7500 Fast (Sequence Detector System – Applied Biosystems), da plataforma PDTIS RPT-09A/Fiocruz, com a seguinte programação: atividade inicial da enzima amperase (1 min, 50 °C), desnaturação inicial/ativação Taq Polimerase Hot start (10 min, 95 °C), 40 ciclos de desnaturação (15 s, 95 °C) e anelamento/extensão (1 min, 58 °C).

**Tabela 1:** Sequências dos iniciadores e sondas para os ensaios de PCRc e qPCR.

Alvos	Iniciadores/Sondas	Produtos amplificados (pb)	Sequência (5' – 3')	Referência
kDNA de <i>T. cruzi</i>	121 (Forward)	330	AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATG	Sturm et al., 1989 Wincker et al., 1994
	122 (Reverse)		GGTTCGATTGGGGTTGGTGA ATATA	
DNA Satélite de <i>T. cruzi</i>	Cruzi 1 (Forward)	166	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA	Piron et al., 2007
	Cruzi 2 (Reverse)		AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	
	Cruzi 3 (Sonda)		FAM-TTGGTGTCCAGTGTGTG-NFQ-MGB	
12S RNAr de triatomíneo	P2B (Forward)	163	AAAGAATTTGGCGGTAATTTAGTCT	Moreira et al., 2017
	P6R (Reverse)		GCTGCACCTTGACCTGACATT	
	Triat (Sonda)		VIC-TCAGAGGAATCTGCCCTGTA-NFQ-MGB	

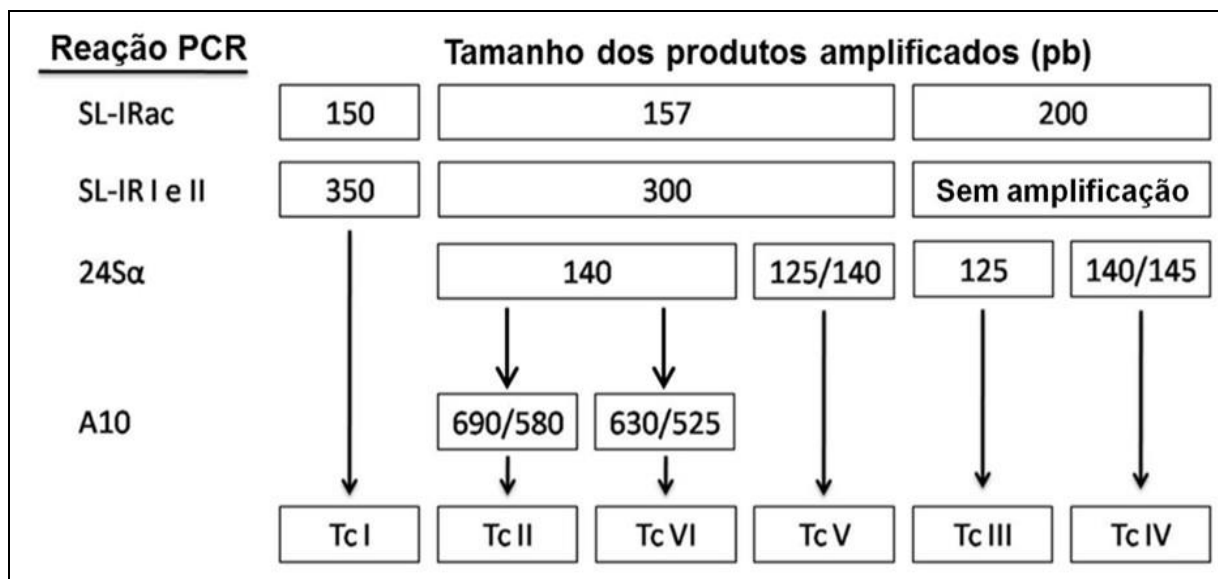
As curvas padrão de calibração para os alvos *T. cruzi* e triatomíneo foram construídas a partir de diluições seriadas de DNA extraído de um *pool* de cinco intestinos de triatomíneos não infectados (*R. prolixus* de laboratório, 5º estágio) e misturados com formas epimastigotas de *T. cruzi* (CL-Brener), variando de  $10^7$  a 0,5 equivalentes de parasito. O DNA destas amostras reconstituídas foi extraído de acordo com o método descrito no item 3.2, porém a etapa de lavagem (AW2) foi realizada duas vezes para que não saturasse a coluna com os 5 intestinos de triatomíneos utilizados na curva. O DNA de intestino de triatomíneo não infectado foi usado como diluente e ainda como controle interno para verificação da qualidade do DNA extraído e a possível presença de inibidores da PCR nas amostras.

Cada diluição correspondeu a um ponto da curva padrão para quantificação absoluta de *T. cruzi* nos triatomíneos. A curva padrão foi incluída em todos os ensaios quantitativos, em duplicatas para cada ponto da curva. Todas as amostras foram quantificadas em duplicatas e em cada placa (corrida) foram incluídos controle positivo (20 fg DNA de *T. cruzi* CL-Brener) e controles negativos (NTC: *Negative Template Control* da reação de qPCR – 2 µL de água ultrapura ao invés de DNA, e controle para *T. cruzi* - 2 µL de DNA extraído a partir de 100 µL de extrato de intestino de triatomíneo não infectado).

Os dados da qPCR foram expressos como médias aritméticas ou mediana  $\pm$  desvio padrão. Foram utilizados os testes Mann–Whitney Rank Sum ou One-way ANOVA, admitindo-se um índice de significância de 5%. Todas as análises foram conduzidas com o programa GraphPad Prism versão 5.0.

### 3.6 Tipagem molecular de *T. cruzi*

A caracterização molecular do *T. cruzi* em DTUs foi realizada utilizando o DNA extraído (item 3.2) diretamente do conteúdo intestinal de triatomíneos. Foi utilizada a metodologia adaptada de BURGOS et al. (2010), RAMIREZ et al. (2010) e DOS SANTOS-RODRIGUES (2015), baseada em reações de PCR convencional multilocus (Figura 12).



**Figura 12:** Fluxograma de PCR Convencional Multilocus para genotipagem de *T. cruzi* diretamente do conteúdo intestinal de triatomíneos, com base em quatro marcadores moleculares. O fluxograma indica o tamanho do produto de PCR em pb. SL-IRac e SL-IR I e II: Região intergênica do gene de spliced-leader (SL) ou mini-exon. 24S $\alpha$ : Amplificação semi-nested do domínio D7 dos genes do RNA ribossomal 24S $\alpha$ . A10: Reação semi-nested para o fragmento nuclear A10.

A identificação subsequente dos genótipos se baseia no conjunto dos perfis de produtos da PCR apresentados para cada alvo, utilizando os seguintes marcadores moleculares: (i) região intergênica do gene Spliced Leader (SL) ou mini-exon SL-IRac utilizando os iniciadores UTCC e TCac (descrito por BURGOS et al., 2007) para distinguir Tc I (150 pb), TcII/V/VI (157 pb) e TcIII/IV (200 pb); (ii) para SL-IR I e II, os iniciadores TCC, TC1 e TC2 (descrito por SOUTO et al., 1996, adaptado por MARCET et al., 2006), usados simultaneamente, diferenciando Tc I (350 pb), TcII/V/VI (300 pb) e TcIII/IV (sem amplificação); (iii) domínio variável D7 do gene da subunidade 24S $\alpha$  do RNA ribossomal, utilizando os iniciadores D75, D76 e D71 em PCR semi-nested, para distinguir TcII/VI (140 pb), TcIII (125 pb), TcIV (140/145 pb) e TcV (125/140 pb) (BRISSE et al., 2000a); (iv) região do fragmento nuclear A10, com o emprego dos iniciadores Pr1, Pr6 e Pr3 (BRISSE et al., 2000b) para diferenciar

TcII (690/580 pb) e TcVI (630/525 pb), em semi-nested (Figura 12). Todas as reações de PCR foram realizadas para um volume final de 30  $\mu$ L.

Para os alvos SL-IRac e SL-IRI e II os ensaios obedeceram às seguintes condições de reação: 5  $\mu$ L de DNA (20 a 25 ng), 3  $\mu$ L de solução tampão 10X (100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl), 0,15  $\mu$ L de Platinum Taq DNA polimerase (0,75 U) (Life Technologies, USA), 1,8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 0,12  $\mu$ L de cada dNTP (400  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de cada primer (1,66  $\mu$ M) e 17,57  $\mu$ L de água ultra-pura (16,57  $\mu$ L de água para o alvo SL-IRI e II, pois utilizam-se três iniciadores nessa etapa).

As condições de reação para o alvo 24S $\alpha$  foram: primeira ciclagem (iniciadores D75, D76) – 5  $\mu$ L de DNA (20 a 25 ng), 3  $\mu$ L de solução tampão 10X [100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500mM de KCl], 0,12  $\mu$ L de Platinum Taq DNA polimerase (0,6 U) (Life Technologies, USA), 1,8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 0,12  $\mu$ L de cada dNTP (400  $\mu$ M), 2,4  $\mu$ L de cada primer (3,98  $\mu$ M) e 14,8  $\mu$ L de água ultra-pura. Para a segunda ciclagem (iniciadores D71, D76), 1  $\mu$ L de produto amplificado na primeira ciclagem, 3  $\mu$ L de solução tampão 10X [100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl], 0,15  $\mu$ L Platinum Taq DNA polimerase (0,75 U) (Life Technologies, USA), 1,2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 0,12  $\mu$ L de cada dNTP (400 mM), 3  $\mu$ L de cada iniciador (4,98  $\mu$ M) e 18,17  $\mu$ L de água ultra-pura.

A primeira ciclagem para o alvo do fragmento nuclear A10 (iniciadores Pr1 e Pr6) consistiu de 5  $\mu$ L de DNA (20 a 25 ng), 3  $\mu$ L de solução tampão 10X (100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl), 0,15  $\mu$ L de Platinum Taq DNA polimerase (0,75 U) (Life Technologies, USA), 1,8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 0,12  $\mu$ L de cada dNTP (400  $\mu$ M), 0,3  $\mu$ L de cada iniciador (0,49  $\mu$ M) e 18,97  $\mu$ L de água ultra-pura. Para a segunda ciclagem (iniciadores Pr1 e Pr3), utilizou-se 2  $\mu$ L de produto amplificado na primeira ciclagem, 3  $\mu$ L de solução tampão 10X (100 mM de Tris-HCl pH 8,3 contendo 500 mM de KCl), 0,15  $\mu$ L de Platinum Taq DNA polimerase (0,75 U) (Life Technologies, USA), 1,8  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (3 mM), 0,12  $\mu$ L de cada dNTP (400  $\mu$ M), 1  $\mu$ L de cada iniciador (1,66  $\mu$ M) e 20,57  $\mu$ L de água ultra-pura.

Os isolados de referência utilizados como controles positivos nas reações foram: Dm28c (TcI), Y (TcII), INPA 3663 (TcIII), INPA 4167 (TcIV), LL014 (TcV) e CL (TcVI), provenientes da Coleção de Protozoários do Instituto Oswaldo Cruz (COLPROT). Os controles negativos da reação de PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA) e para *T. cruzi* (DNA extraído a partir de 100  $\mu$ L de extrato de intestino de triatomíneo não infectado mantido em laboratório -

Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC) também foram incluídos. As sequências de iniciadores e as condições da reação para a tipagem molecular de *T. cruzi* estão representadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Iniciadores e condições para a tipagem molecular de *Trypanosoma cruzi*.

Alvo	Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Concentração	Termociclagem					
				Hot Start	D	A	E	EF	C
SL-IRac	UTCC TCac	CGTACCAATATAGTACAGAAACT G CTCCCCAGTGTGGCCTGGG	1,66 µM 1,66 µM	94°/10'	94°C/30"	70°C/30"	72°C/30"	72°C/10'	3
					94°C/30"	68°C/30"	72°C/30"		3
					94°C/30"	66°C/30"	72°C/30"		4
					94°C/30"	64°C/30"	72°C/30"		6
					94°C/30"	62°C/30"	72°C/30"		34
SL-IR I SL-IR II	TCC TC2 TC1	CCCCCTCCCAGGCCACACTG CCTGCAGGCACACGTGTGTG TCCGCCACCTCCTTCGGGCC	1,66 µM 1,66 µM 1,66 µM	94°C/5'	94°C/1'	67°C/1'	72°C/1'	72°C/10'	5
					94°C/1'	65°C/1'	72°C/1'		5
					94°C/1'	63°C/1'	72°C/1'		5
					94°C/1'	61°C/1'	72°C/1'		30
24Sα-rDNA 1ª ciclagem 2ª ciclagem	D76 D75	GGTTCTCTGTTGCCCTTTT GCAGATCTTGGTTGGCGTAG	1,66 µM 1,66 µM	94°C/10'	94°C/30"	64°C/45"	72°C/1'	72°C/10'	3
					94°C/30"	62°C/45"	72°C/1'		3
					94°C/30"	60°C/45"	72°C/1'		3
	D76 D71	GGTTCTCTGTTGCCCTTTT AAGGTGCGTCGACAGTGTGG	1,66 µM 1,66 µM		94°C/30"	58°C/45"	72°C/1'		35
					94°C/30"	60°C/30"	72°C/30"		6
					94°C/30"	57°C/30"	72°C/30"		6
94°C/30"	55°C/30"	72°C/30"	30						
Fragmento A10 1ª ciclagem 2ª ciclagem	Pr1 Pr6	CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA GTGATCGCAGGAAACGTGA	1,66 µM 1,66 µM	94°C/3'	94°C/1'	65°C/1'	72°C/1'	72°C/10'	35
					Pr1 Pr3	CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA CGTGCCATGGGGTAATAAAGCA	1,66 µM 1,66 µM		94°C/1'

**Hot Start:** Ativação da enzima, **D:** Desnaturação, **A:** Anelamento, **E:** Extensão, **EF:** Extensão final, **C:** Ciclos.

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese assim como em 3.4.1, porém utilizando 20 µL dos produtos amplificados com 4 µL do tampão de amostra 1X, aplicados em gel de agarose a 3%.

### 3.7 Competência vetorial de *T. rubrovaria*

#### 3.7.1 Competência vetorial de *T. rubrovaria* em condições de laboratório

##### Cultura do parasito

A cepa CL de *T. cruzi* (TcVI) usada neste ensaio foi isolada das excretas de *T. infestans* coletado no Rio Grande do Sul e foi cultivada em meio Triptose de Infusão de Fígado (LIT), contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) a 28 °C (CAMARGO, 1964). A cepa foi doada pelo Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas – Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz. No Laboratório de Ultraestrutura Celular - IOC/FIOCRUZ, tripomastigotas

metacíclicos, coletados de cultura LIT na fase estacionária, foram usados para infectar células Vero. Formas tripomastigotas liberadas de células Vero infectadas por *T. cruzi* em quatro dias pós-infecção (dpi) foram usadas para infectar camundongos *Swiss webster*.

### **Hospedeiros experimentais**

Camundongos *Swiss webster* machos pesando entre 18 e 20 g, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB / Fiocruz), foram mantidos em gaiolas (19,56 x 30,91 x 13,34 cm, com quatro animais / gaiola), sob umidade e temperatura controladas ( $55\% \pm 5\%$  e  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ , respectivamente) e ciclos claro-escuro (12:12h), sem restrição alimentar. Os animais foram infectados intraperitonealmente com tripomastigotas da cepa CL derivados de tecido ( $1 \times 10^4$  parasitos / 0,1 mL NaCl 0,9%). A parasitemia foi avaliada diariamente após 4 dpi pelo método Pizzi-Brener (BRENER, 1962). Ao atingir o nível de parasitemia de  $1 \times 10^5$  parasitos / mL, os animais foram usados para alimentar espécimes de quinto estágio de *T. rubrovaria* e de *T. infestans*.

### **Alimentação e infecção de *T. rubrovaria* e *T. infestans***

Ninfas de quinto estágio recém-mudadas de *T. rubrovaria* (geração F3) e *T. infestans* (geração F20) foram obtidas da colônia do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, e mantidas sob condições de temperatura e umidade relativa (UR) controladas, a  $26 \pm 2^\circ \text{C}$  e 70%, respectivamente. Escolhemos este estágio de desenvolvimento devido à baixa taxa de mortalidade (OSCHEROV et al., 2005), alta eficiência de alimentação (BAR et al., 2003; ALMEIDA et al., 2003) e fácil manuseio. Para fins de comparação de infecção e parâmetros comportamentais de *T. rubrovaria*, o vetor *T. infestans* foi incluído na análise, devido à sua alta capacidade de infecção e transmissão do *T. cruzi* (controle positivo). Como controle negativo, usamos espécimes de *T. rubrovaria* não infectados. Espécimes de *T. infestans* não infectados com TcVI não foram incluídos nas análises, uma vez que sua bionomia e comportamento estão bem estabelecidos na literatura (LAZZARI et al., 2013; PEREYRA et al., 2020).

Dez dias após a muda até o 5º instar, os insetos foram alimentados em camundongos *Swiss webster* anestesiados (combinado de cloridrato de cetamina 100 mg/kg e cloridrato de xilazina 10 mg/kg), infectados ou não com a cepa CL de *T. cruzi* (TcVI). Trinta dias após a infecção (30 dpi), triatomíneos em jejum infectados



ou não com TcVI foram alimentados novamente em camundongos anestesiados não infectados para fins de análises comportamentais. Para cada ciclo experimental, um único camundongo foi lateralmente posicionado na presença de cinco triatomíneos em um recipiente de plástico arredondado (12 cm de diâmetro x 4 cm de altura) coberto no fundo com toalhas de papel. As ninfas foram centralizadas em frente ao abdômen do camundongo a 7 cm de distância, e a fonte de sangue foi oferecida por 30 min, incluindo o tempo de adaptação do triatomíneo ao ambiente (definido pelos primeiros 10 min dentro do recipiente para reconhecer o hospedeiro e iniciar o repasto sanguíneo, sem qualquer separação entre os insetos e o hospedeiro). Os espécimes foram substituídos quando não se alimentavam após este período; não obstante, alguns grupos experimentais terminaram com menos de cinco triatomíneos alimentando-se do camundongo. O ensaio foi realizado duas vezes, sob iluminação artificial baixa e indireta, no início da noite, no tempo Zeitgeber (ZT) 12, que representa o pico de atividade dos triatomíneos para alimentação (LAZZARI, 1992). A fonte de sangue não infectada foi oferecida novamente em 60 e 90 dpi.

Os camundongos sobreviventes foram sacrificados após os experimentos por injeção peritoneal de cloridrato de cetamina (300 mg/kg) e cloridrato de xilazina (30 mg/kg) em volume final de 0,5 mL. Os animais mortos foram congelados em um saco de descarte biológico e esterilizados a 121 °C por 20 min para descarte final.

### **Aspectos éticos**

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Instituto Oswaldo Cruz (IOC) / Fiocruz (Licenças L015/17, LW-28/15 e L028/18).

### **3.7.2 Detecção de *T. cruzi* TcVI em *T. rubrovaria* e *T. infestans***

Os grupos não infectados (*T. rubrovaria*) e infectados (*T. infestans*, como controle positivo, e *T. rubrovaria*) foram alimentados com camundongo em 30, 60 e 90 dpi. As excretas dos triatomíneos foram coletadas individualmente após alimentação sanguínea e dejeção espontânea em até 4h. Vinte microlitros das fezes/urina foram diluídos em 100 µL de solução salina tamponada com fosfato 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) para contagem de parasitos na câmara de Neubauer, usando microscópio óptico Primo Star (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com uma ampliação de 400 X. A classificação morfológica das formas evolutivas em epimastigotas ou tripomastigotas de *T. cruzi* foi baseada na forma, tamanho, largura

e mobilidade da célula (HOARE, 1972). Definimos como "transitórios" todos os parasitos que não se ajustaram morfológicamente em nenhuma das duas formas evoluídas (KOLLIEN & SCHAUB, 2000). No caso de dúvidas na morfologia, mudamos para uma ampliação de 1000 X e classificamos de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e pela emergência do flagelo (HOARE, 1972), sempre que estas estruturas eram visíveis.

### **3.7.3 Parâmetros comportamentais**

Amostras dos grupos "controle negativo" e "triatomíneos infectados com TcVI" foram analisadas individualmente em 30 dpi para os seguintes parâmetros: (i) tempo de alimentação (min), que é o período entre a primeira inserção da probóscide na pele do camundongo e sua remoção final (ou seja, quando o inseto afasta-se do local da picada); (ii) tempo de excreção (até 10 min) após a alimentação (min); (iii) distância das fezes em relação ao local da picada (cm); (iv) volume de sangue ingerido ( $\mu\text{L}$ ); (v) eficiência de alimentação (volume de sangue ingerido / tempo de alimentação;  $\mu\text{L} / \text{min}$ ); (vi) eficiência de excreção (tempo de alimentação / distância das fezes; min / cm); e (vii) local da picada no camundongo (cabeça, dorso, cauda, abdômen e pernas). A quantidade de sangue ingerido foi calculada através da pesagem de amostras antes e após a alimentação sanguínea em uma escala de precisão de cinco dígitos (modelo AY220, Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão) e convertido em volume com uma proporção de 1 mg de peso após a alimentação com  $\sim 1 \mu\text{L}$  de sangue, uma vez que a massa de sangue de camundongo é quase igual à da água (VITELLO et al., 2015). Também comparamos a proporção de indivíduos que excretaram durante o ensaio entre as espécies (*T. rubrovaria* e *T. infestans*), com seu estado de infecção (infectados e não infectados), e também com o número de tentativas de alimentação. Nós consideramos como um evento de tentativa de alimentação quando o vetor inseriu a probóscide na pele do camundongo e, em seguida, removeu e se afastou do local da picada.

### **3.7.4 Análises estatísticas**

Todas as análises estatísticas foram conduzidas em ambiente R (R TEAM, 2014) com pacotes apropriados. A infecção e os dados de comportamento não apresentaram distribuição normal (testes de Shapiro-Wilk,  $p < 0,001$ ) e, portanto, usamos testes estatísticos que não assumem essa distribuição de probabilidade. As

réplicas experimentais não foram significativamente distintas (teste qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) e Kruskal-Wallis não significativos) e, portanto, foram analisadas em conjunto.

### **Infecção**

As infecções de *T. rubrovaria* e *T. infestans* com *T. cruzi* TcVI foram analisadas qualitativa e quantitativamente. Para cada espécie, a presença/ausência de triatomíneos infectados em 30, 60 e 90 dpi, além da presença das formas tripomastigotas, epimastigotas e transitórias de *T. cruzi* nas fezes/urina contaminadas de triatomíneos foram tratadas como variáveis binárias (análises qualitativas). Comparações pareadas entre *T. rubrovaria* e *T. infestans* foram realizadas com o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ), incluindo infecção geral (ou seja, independentemente de dpi e das formas de *T. cruzi*), e diferenças na proporção de espécimes com formas parasitárias distintas nos três parâmetros de dpi analisados.

As cargas parasitárias (análises quantitativas) foram comparadas com o Teste de Kruskal-Wallis (H) não paramétrico, seguido pelo Teste de Dunn entre 30, 60 e 90 dpi. O Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney também foi utilizado para comparar as cargas parasitárias em *T. rubrovaria* e *T. infestans* para cada ponto do tempo. O efeito das comparações (r) foi calculado com a fórmula de Rosenthal (ROSENTHAL, 1994). O valor de r varia de 0 a 1, onde de 0 a 0,14 é considerado um efeito pequeno, 0,15 a 0,29 moderado e 0,30 ou superior um efeito grande. O nível de significância foi ajustado para múltiplas comparações com um método baseado na Taxa de Falsas Descobertas (do inglês *False Discovery Rate* ou FDR) (BENJAMINI & YEKUTIELI, 2001).

Modelos lineares generalizados (do inglês *Generalized Linear Models* ou GLMs) com distribuição binomial foram desenvolvidos no Pacote “GGally” (WICKHAM, 2016) para identificar efeitos significativos de espécies e dpi (variáveis independentes ou preditoras) sobre a presença de cada uma das diferentes formas de *T. cruzi* (variável dependente). A redundância entre variáveis preditoras foi acessada através do cálculo de Fator de Inflação da Variância (VIF) com o pacote “car” (FOX & WEISBERG, 2017). Este fator mede o quanto a variância de um coeficiente de regressão é inflada devido à multicolinearidade entre os preditores. Problemas de multicolinearidade consistem em incluir, no mesmo modelo, variáveis com relações preditivas semelhantes ao resultado. Os valores VIF são inteiros e sempre positivos, e VIF < 5 representa ausência de multicolinearidade (YOO et al.,

2014; JAMES et al., 2014). Portanto, os preditores com VIF > 5 foram excluídos da análise, pois representariam redundância e poderiam comprometer a precisão do modelo (YOO et al., 2014; BRUCE & BRUCE, 2017). A seleção do modelo foi feita através do cálculo de segunda ordem do Critério de Informação de Akaike Corrigido (AICc) no pacote "AICcmodavg v.2.2" (MAZEROLLE, 2019).

Os modelos foram classificados e então comparados com o delta AICc ( $\Delta AICc$ ), para o qual  $\Delta AICc > 2$  indicou uma escolha de modelo clara. Além disso, calculamos os pesos do modelo AICc ( $W_t$ ), que podem ser interpretados como a probabilidade relativa de um modelo, onde  $W_t$  próximo a 1,0 significa mais provável (BURNHAM & ANDERSON, 2002). A força da associação entre cada variável independente foi expressa pela Razão de Odds (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

### **Comportamento**

A proporção de indivíduos que excretaram durante os experimentos comportamentais foi comparada entre as espécies (*T. rubrovaria* e *T. infestans*) e o estado de infecção (*T. rubrovaria* infectado e não infectado) por meio do Teste  $\chi^2$ . O mesmo método estatístico foi utilizado para comparar o número de tentativas de alimentação. Comparações par-a-par foram realizadas com o Teste W de Wilcoxon-Mann-Whitney para analisar os seis parâmetros comportamentais (i a vii, descrito no item 3.7.3). Dois testes diferentes foram realizados: *T. rubrovaria* infectado versus *T. infestans* infectado (W1), para inferir possíveis diferenças entre as espécies; e *T. rubrovaria* não infectado e infectado (W2), para observar se a infecção por *T. cruzi* alterou os parâmetros de excreção e de alimentação deste vetor. O nível de significância foi ajustado para comparações múltiplas com o método FDR (BENJAMINI & YEKUTIELI, 2001). Além disso, usamos o mesmo método estatístico para inferir se o volume de sangue ingerido foi diferente para os indivíduos que excretaram ou não após a alimentação sanguínea.

GLMs assumindo distribuição Gamma foram realizados no Pacote "GGally" (WICKHAM, 2016). Testamos a influência das variáveis "espécie" (*T. rubrovaria* ou *T. infestans*) e "infecção" (infectado ou não) em cada parâmetro comportamental avaliado (item 3.7.3), que resultou em GLMs com sete variáveis dependentes. Além disso, os traços comportamentais também foram incluídos como variáveis independentes nos GLMs para testar os seus respectivos efeitos nas variáveis dependentes distintas (Tabela 3). Apenas os aspectos comportamentais que

ocorreram antes ou durante a variável dependente foram incluídos nas análises como variáveis independentes para evitar associações espúrias entre características. Por exemplo, o “tempo de alimentação” pode explicar a variável dependente “volume de sangue”, pois ocorreram ao mesmo tempo, mas a “distância das fezes” não poderia explicar a variável dependente “volume de sangue ingerido”, uma vez que a primeira variável é medida após a ingestão de sangue. Todos os preditores foram avaliados quanto à multicolinearidade por meio de VIF, calculado com o pacote “car” (FOX & WEISBERG, 2019). Apenas variáveis não redundantes foram mantidas para o modelo AICc. Os modelos foram classificados e comparados com  $\Delta AICc$  e Wt. A força de cada parâmetro testado foi expressa pela Razão de Odds (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%).

**Tabela 3:** Modelos Lineares Generalizados (GLMs) com distribuição Gama testados com diferentes características comportamentais como variáveis dependentes.

Variáveis dependentes	Variáveis independentes	N <sub>M</sub>	K <sub>MAX</sub>	K <sub>BEST</sub>	$\Delta AIC_c$
Tempo de alimentação	<b>Espécies, infecção, volume de sangue ingerido</b>	8	5	4	1,26
Tempo de excreção	<b>Espécies, infecção, volume de sangue ingerido, distância das fezes, tempo de alimentação</b>	32	7	5	1,15
Distância das fezes	<b>Espécies, infecção, volume de sangue ingerido, tempo de alimentação, tempo de excreção</b>	32	7	5	0,55
Volume de sangue ingerido	<b>Espécies, infecção, tempo de alimentação</b>	8	5	5	0,04
Eficiência de alimentação	<b>Espécies, infecção, distância das fezes</b>	8	5	4	2,33
Eficiência de excreção	<b>Espécies, infecção, volume de sangue ingerido</b>	8	5	4	0,62

As variáveis independentes presentes no melhor GLM estão em negrito. N<sub>M</sub>: número de GLMs testados; K<sub>MAX</sub>: número máximo de parâmetros testados em um único GLM; K<sub>BEST</sub>: número de parâmetros no melhor GLM;  $\Delta AICc$ : Critérios de Informação delta Akaike corrigidos entre o melhor e o segundo melhor GLM.

Os locais da picada no camundongo referentes aos grupos controle negativo (*T. rubrovaria* não infectado), testado (*T. rubrovaria* infectado) e controle positivo (*T. infestans* infectado) foram computados como variáveis categóricas divididas em cinco grupos: cabeça, cauda, pernas, dorso e abdômen. A Regressão Logística Multinomial (MLR) foi realizada com o pacote "nnet" (VENABLES & RIPLEY, 2002) para estimar o impacto de variáveis predictoras (locais de picada) em condições infectado e não infectado. A significância dos coeficientes de regressão foi acessada após os Testes-z bicaudais.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Coleta e identificação morfológica dos triatomíneos

O trabalho de campo ocorreu em seis municípios do Rio Grande do Sul: Caçapava do Sul, Cachoeira do Sul, Canguçu, Encruzilhada do Sul, Lavras do Sul e São Jerônimo. Um total de 1.724 triatomíneos foram coletados com a seguinte distribuição dos ecótopos: i. Peridomicílio: 2 ninfas de 4<sup>o</sup> estágio (N4) e 1 ninfa de 5<sup>o</sup> estágio (N5) foram encontradas debaixo de uma casinha de cachorro, além de 6 ninfas (1 N2, 2 N3, 2 N4 e 1 N5) sob rochas, a uma distância de 15 m do domicílio, no município de Lavras do Sul, totalizando 9 exemplares (9/1.724; 0,5%). Neste ambiente observamos muitos animais, tais como peru, galinha, pato, cavalo, gato, cachorro, porco, gado, ovelha, cabra. ii. Silvestre: 1.715 insetos (1.715/1.724; 99,5%) foram coletados sob rochas a uma distância superior a 100 m da habitação mais próxima. Baratas silvestres foram observadas em simpatria com as espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* sob as rochas, além de bois, cabras, ovelhas, cavalos e cães serem vistos livremente na área silvestre. Mesmo em regiões onde os animais não estavam presentes próximos aos pontos de coleta, observamos fezes de gados, caprinos e ovinos. Já na busca entomológica de triatomíneos realizada no intradomicílio, no entanto, nenhum inseto foi encontrado neste ecótopo, nem vestígios de sua possível presença. Do total de insetos coletados em ambos os ecótopos (peridomicílio e silvestre), 934 espécimes (934/1.724; 54,2%) foram utilizados para as análises moleculares no presente estudo (Tabela 4), e 790 insetos do ambiente silvestre (790/1.715; 46,1%) foram transferidos para a manutenção da colônia do Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera (LIVEDIH). Dentre os insetos utilizados neste estudo (ensaios moleculares), a frequência maior de captura foi de N5 (262/934; 28,1%), seguido de N2 (240/934; 25,7%), N1 (147/934; 15,7%), N3 (146/934; 15,6%), N4 (95/934; 10,2%), fêmeas (23/934; 2,5%) e machos (21/934; 2,2%). Em relação aos seis municípios do Rio Grande do Sul, aquele que apresentou a maior frequência de insetos capturados foi Lavras do Sul (393/934; 42,1%), seguido de Caçapava do Sul (247/934; 26,4%), São Jerônimo (98/934; 10,5%), Canguçu (85/934; 9,1%), Cachoeira do Sul (73/934; 7,8%) e Encruzilhada do Sul (38/934; 4,1%) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Distribuição de triatomíneos submetidos às análises moleculares quanto ao estágio evolutivo e local de captura em seis municípios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil (2015-2017).

Município (RS) <i>Ecótopo</i>	Estádio evolutivo							Total
	N1	N2	N3	N4	N5	♂	♀	
<b>Caçapava do Sul</b>								
<i>Peridomicílio</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Silvestre</i>	37	99	39	21	44	3	4	247
<b>Cachoeira do Sul</b>								
<i>Peridomicílio</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Silvestre</i>	19	14	14	4	17	2	3	73
<b>Canguçu</b>								
<i>Peridomicílio</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Silvestre</i>	13	28	5	10	23	3	3	85
<b>Encruzilhada do Sul</b>								
<i>Peridomicílio</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Silvestre</i>	8	8	5	4	13	0	0	38
<b>Lavras do Sul</b>								
<i>Peridomicílio</i>	0	1	2	4	2	0	0	9
<i>Silvestre</i>	63	62	69	52	124	8	6	384
<b>São Jerônimo</b>								
<i>Peridomicílio</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Silvestre</i>	7	28	12	0	39	5	7	98
<b>Total</b>	<b>147</b>	<b>240</b>	<b>146</b>	<b>95</b>	<b>262</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>934</b>

A classificação por espécies de algumas ninfas e de alguns adultos através da morfologia (LENT & WYGODZINSKY, 1979) foi realizada antes da análise molecular, resultando na identificação de *Triatoma carcavalloei* (N=52), *Triatoma rubrovaria* (N=27) e *Triatoma circummaculata* (N=29). Quando não foi possível a identificação por taxonomia clássica, os espécimes foram enviados para a análise de taxonomia molecular (N=826) e os resultados estão apresentados a seguir.

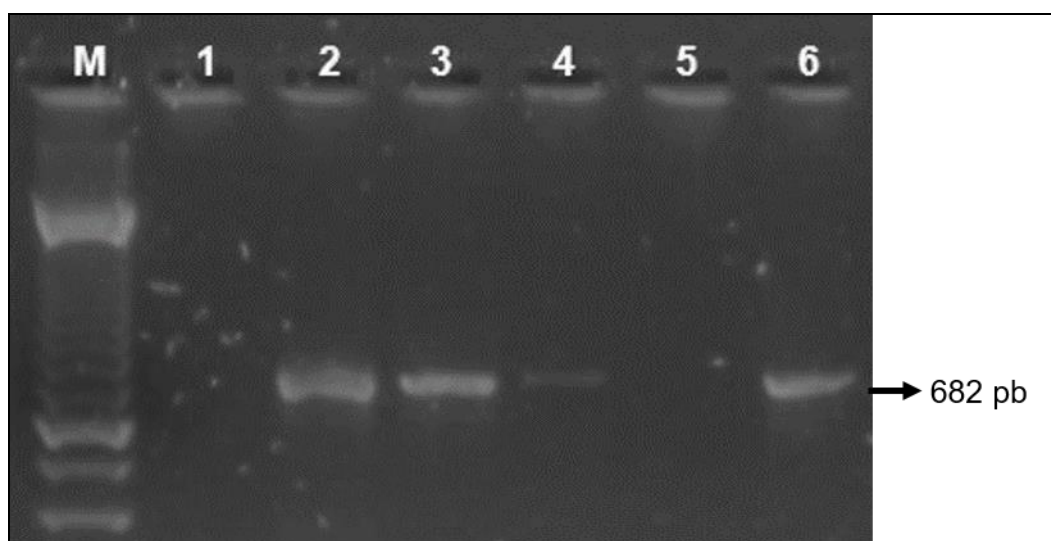
## 4.2 Análises moleculares

### 4.2.1 Taxonomia molecular

#### Sequenciamento de DNA mitocondrial e análise filogenética

Testamos a utilização dos iniciadores 7432F e 7433R em triatomíneos adultos provenientes do insetário do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos do subcomplexo *T. rubrovaria*: *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii*, *T. circummaculata*, *T. pintodiasi* e *T. klugi*. *Triatoma oliveirai* e *T. limai* foram as únicas espécies pertencentes ao subcomplexo que não foram incluídas nos ensaios moleculares de taxonomia, devido à dificuldade de coletar e manter em colônia de laboratório.

O fragmento de 682 pb do Cyt b foi amplificado com sucesso em quatro das cinco espécies analisadas com exceção do *T. pintodiasi* (Figura 13).

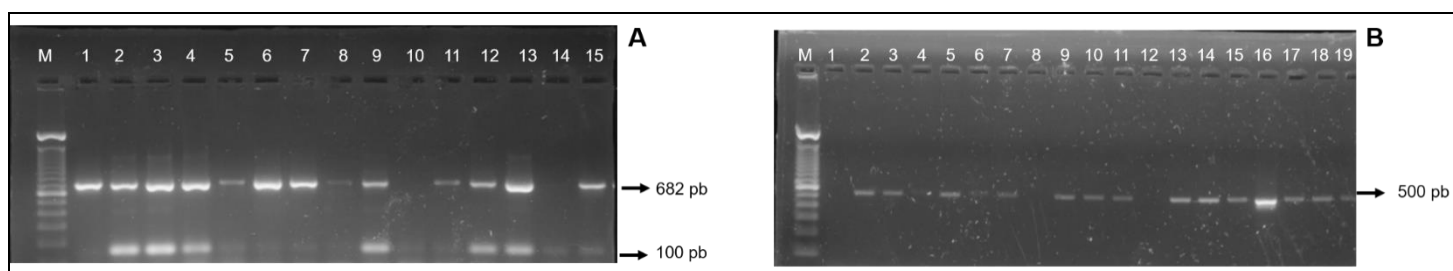


**Figura 13:** Gel representativo da eficiência dos iniciadores 7432F e 7433R para o alvo Cyt b de espécies referências do subcomplexo *T. rubrovaria* provenientes de insetário. Gel de agarose a 1,5% corado com Nancy. M: Marcador de Peso Molecular (100 pb); 1: controle negativo (somente os reagentes, sem DNA); 2: *T. rubrovaria*. 3: *T. carcavalloii*. 4: *T. circummaculata*. 5: *T. pintodiasi*. 6: *T. klugi*.

Após o teste com as amostras de insetário, repetimos as mesmas condições da PCR para as amostras coletadas no campo. No entanto, algumas amostras apresentaram bandas duplas: uma correspondente a banda de interesse (682 pb) e a outra banda referente a, aproximadamente, 100 pb (Figura 14A). Sequenciamos alguns destes *amplicons* e os eletroferogramas apresentaram picos duplos. Desta forma, desenhamos um outro par de iniciadores (Cytb105-27 e Cytb622-45R) utilizando como base as sequências de DNA das espécies referências do subcomplexo *T. rubrovaria* que tínhamos disponíveis. Por meio desta nova dupla de iniciadores foi possível amplificar um maior número de amostras contendo apenas o fragmento esperado de 500 pb (Figura 14B). Assim, demos prosseguimento ao sequenciamento das 310



amostras (de um total de 826) que foram analisadas e que apresentaram amplificação do fragmento de interesse. Posteriormente, realizamos as análises filogenéticas.

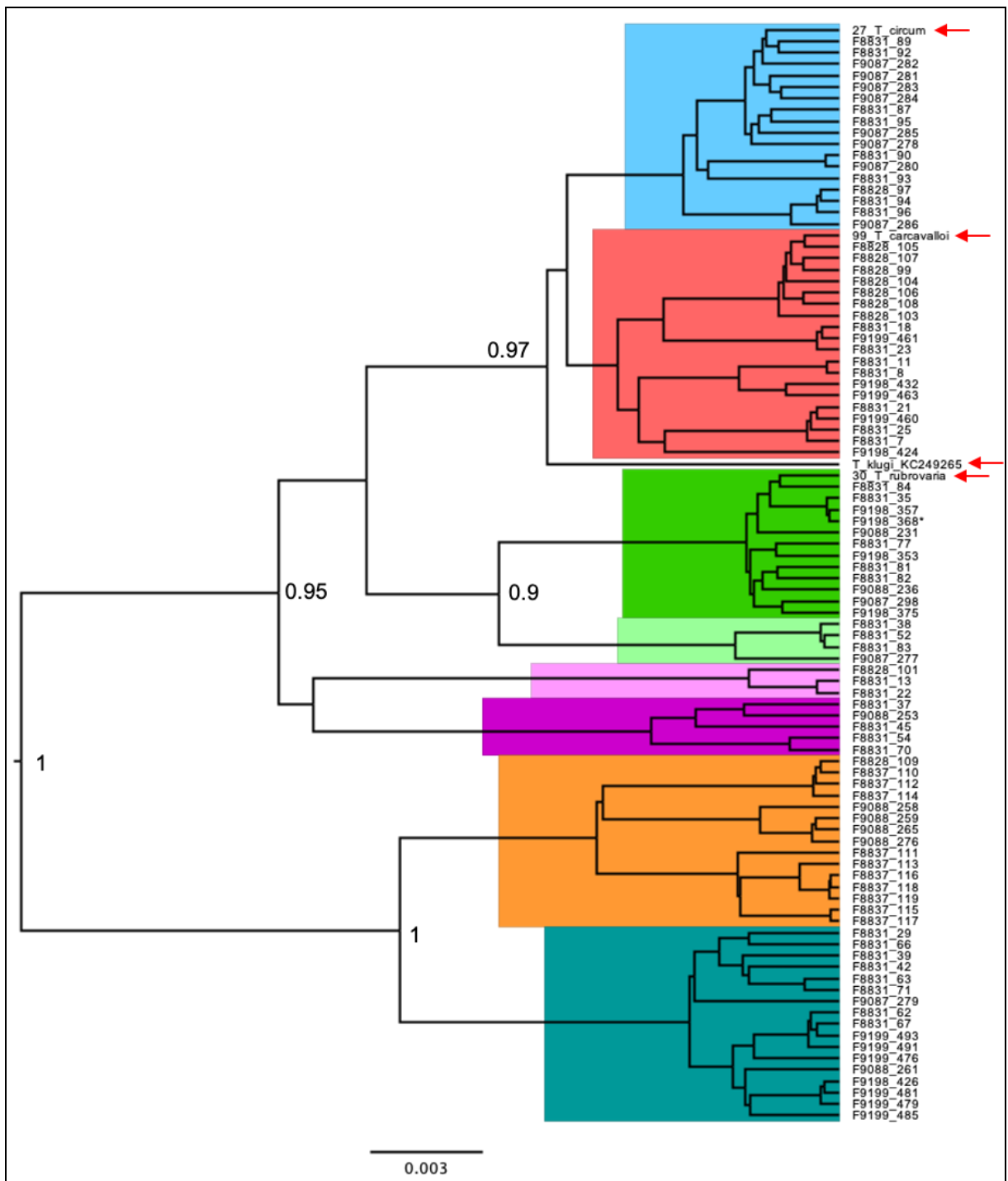


**Figura 14:** Gel representativo de espécimes do subcomplexo *T. rubrovaria* coletados no campo.

Gel de agarose a 1,5% corado com Nancy. A: Amplificação com os iniciadores 7432F e 7433R (682 pb e 100 pb) - M: Marcador de Peso Molecular (100 pb); 1-15: Insetos de campo. B: Amplificação com os iniciadores Cytb105-27 e Cytb622-45R (500 pb) - M: Marcador de Peso Molecular (100 pb); 1: controle negativo (somente os reagentes, sem DNA); 2-19: Insetos de campo.

Ao todo, 92 amostras tiveram o fragmento de 500 pb do Cyt b sequenciado (29,7%; 92/310), além das sequências-referência de insetos adultos de *T. rubrovaria*, *T. klugi*, *T. circummaculata* e *T. carcavalloi*. Os modelos de árvores filogenéticas *a priori* de coalescência e *Birth-Death* não apresentaram diferenças nos valores de verossimilhança e em geral apresentaram topologias semelhantes, com exceção do clado contendo a sequência-referência de *T. klugi*. O modelo *Birth-Death* não agrupou nenhuma sequência de triatomíneos provenientes do campo com a sequência-referência de *T. klugi*, enquanto que o modelo coalescente de crescimento populacional constante agrupou cinco indivíduos de campo à essa sequência de referência.

A árvore filogenética gerada a partir do modelo *Birth-Death* agrupou as 92 amostras em nove clados, dos quais quatro continham as sequências-referência, *T. rubrovaria* formou um clado mais distante das demais sequências-referência e *T. circummaculata* e *T. carcavalloi* foram as mais proximamente relacionadas. Das amostras sequenciadas, 17 (18,5%) foram identificadas como *Triatoma circummaculata*, 19 (20,7%) como *Triatoma carcavalloi* e 12 (13,04%) como *Triatoma rubrovaria*. As restantes foram agrupadas em cinco clados sem sequência-referência, sendo quatro no clado 1, três no clado 2, cinco no clado 3, quinze no clado 4 e dezessete no clado 5 (Figura 15).



**Figura 15:** Reconstrução filogenética bayesiana com o modelo *Birth-Death*. As cores indicam os clados cujas amostras foram atribuídas: azul: *T. circummaculata*; vermelho: *T. carcavalloi*; verde escuro: *T. rubrovaria*; verde claro: clado 1; rosa: clado 2; lilás: clado 3; laranja: clado 4; azul petróleo: clado 5.

Utilizando-se como base a reconstrução filogenética bayesiana, os nove clados encontrados foram tratados como sendo nove unidades taxonômicas distintas. A partir do cálculo das divergências par-a-par utilizando o modelo de substituição nucleotídica K2P, de forma geral, a divergência média intraclados variou de 0,001 - 0,003, enquanto a divergência média interclados foi de 0,014 - 0,044. As

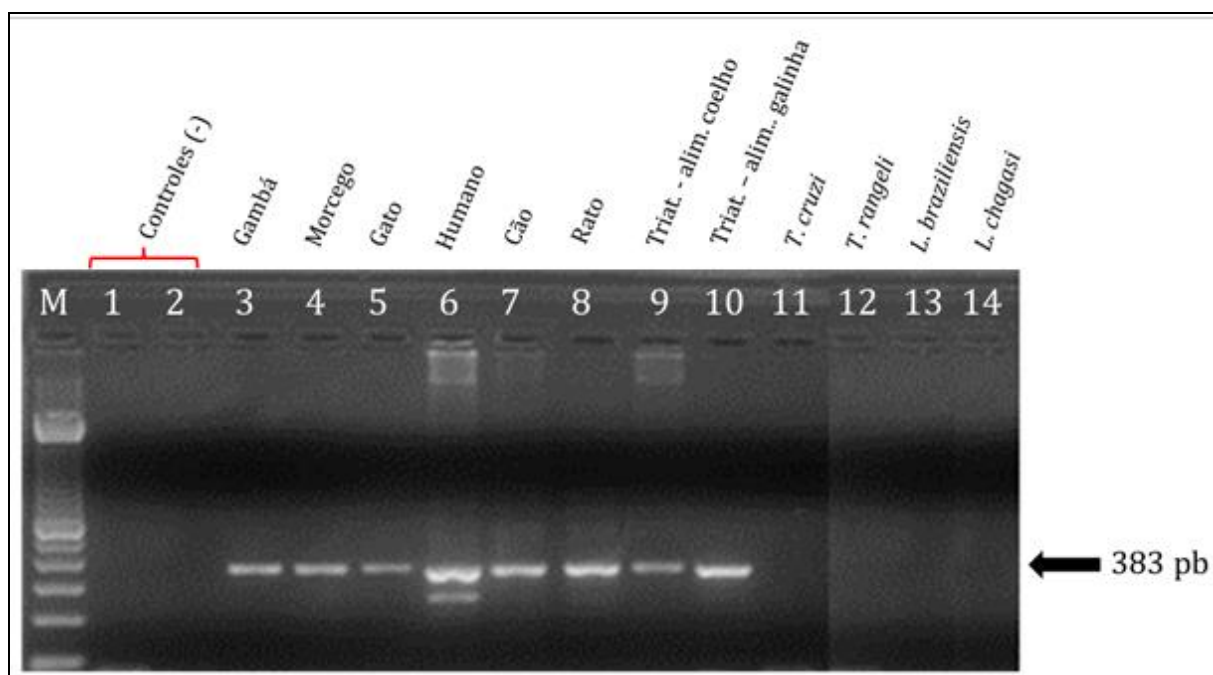
divergências entre as sequências-referência foram baixas, se comparadas àquelas obtidas entre espécies de *Rhodnius* e *Triatoma* ( $K2P < 0,03$ ) (MONTEIRO et al. 2003, 2004). Algumas divergências intraclados obtiveram valores que se assemelhavam àqueles observados em comparações entre sequências de clados distintos, como foi o caso das sequências do clado de *T. circummaculata*, ou ainda nos clados 3 e 4 (divergências de até 0,016; 0,011; e 0,017, respectivamente), se comparados com as divergências calculadas entre *T. klugi* e *T. carvalhoi* (0,016), *T. circummaculata* e *T. carvalhoi* (0,008), clados 1 e 3 (0,018), e ainda clados 2 e 3 (0,016). A maior divergência encontrada entre as sequências-referência foi de 0,032, na comparação entre *T. klugi* e *T. rubrovaria*. Considerando ainda as sequências dos demais clados sem sequência-referência, a maior divergência média encontrada foi entre o clado de *T. rubrovaria* e o clado 4 (0,044) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Média das divergências par-a-par utilizando o Modelo de Substituição Nucleotídica K2P. Entre parêntesis estão os valores mínimo e máximo de divergência. Em vermelho, são os valores de divergência intraclados.

Clados	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>T. klugi</i>	NA								
2. <i>T. circummaculata</i>	0,022 (0,017- 0,028)	0,002 (0,000- 0,016)							
3. <i>T. carvalhoi</i>	0,016 (0,013- 0,020)	0,008 (0,007- 0,011)	0,003 (0,000- 0,009)						
4. <i>T. rubrovaria</i>	0,032 (0,029- 0,036)	0,024 (0,022- 0,027)	0,019 (0,018- 0,022)	0,001 (0,000- 0,004)					
5. Clado 1	0,022 (0,020- 0,020)	0,021 (0,018- 0,022)	0,014 (0,014- 0,014)	0,020 (0,019- 0,020)	0,002 (0,000- 0,005)				
6. Clado 2	0,025 (0,024- 0,028)	0,014 (0,012- 0,017)	0,015 (0,014- 0,018)	0,024 (0,023- 0,025)	0,020 (0,016- 0,020)	0,001 (0,000- 0,004)			
7. Clado 3	0,028 (0,022- 0,033)	0,023 (0,020- 0,026)	0,018 (0,013- 0,022)	0,028 (0,025- 0,032)	0,018 (0,014- 0,022)	0,016 (0,014- 0,020)	0,007 (0,003- 0,011)		
8. Clado 4	0,043 (0,039- 0,046)	0,039 (0,033- 0,044)	0,032 (0,025- 0,036)	0,044 (0,035- 0,050)	0,034 (0,025- 0,040)	0,034 (0,023- 0,040)	0,030 (0,018- 0,040)	0,009 (0,000- 0,017)	
9. Clado 5	0,037 (0,032- 0,042)	0,031 (0,020- 0,038)	0,027 (0,017- 0,032)	0,041 (0,038- 0,046)	0,026 (0,014- 0,035)	0,025 (0,015- 0,032)	0,023 (0,011- 0,032)	0,019 (0,015- 0,032)	0,003 (0,000- 0,009)

#### 4.2.2 Hábito alimentar – dos testes preliminares em laboratório aos triatomíneos de campo

Antes de iniciarmos os experimentos com as amostras de triatomíneos do campo, nós testamos a eficiência dos iniciadores H1 e H2 para o gene Cyt b em um painel de amostras de DNA de diferentes vertebrados (humano, gambá, morcego, gato, cão e rato), seguindo o protocolo de extração de DNA descrito no item 3.2. Para evitar erros na análise de identificação de fonte alimentar, buscamos confirmar que esses iniciadores não se anelariam em regiões do DNA de tripanosomatídeos que poderiam estar presentes nos insetos infectados. Assim, a região correspondente à 383 pb (Cyt b) foi amplificada pela PCR nos vertebrados examinados, mas não foi observada para DNA de *T. cruzi*, *T. rangeli*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi*, demonstrando a especificidade dos iniciadores para o Cyt b. Neste ensaio, também incluímos espécimes de *R. prolixus* alimentados por meio de um aparato artificial (“mamadeira”) com sangue de coelho e de galinha e foi observada a amplificação da região de interesse (383 pb), mostrando uma boa eficiência dos iniciadores na detecção de fonte alimentar diretamente dos intestinos médio posterior e posterior de triatomíneos alimentados (Figura 16).



**Figura 16:** Teste de eficiência dos iniciadores H1 e H2 (Cyt b).

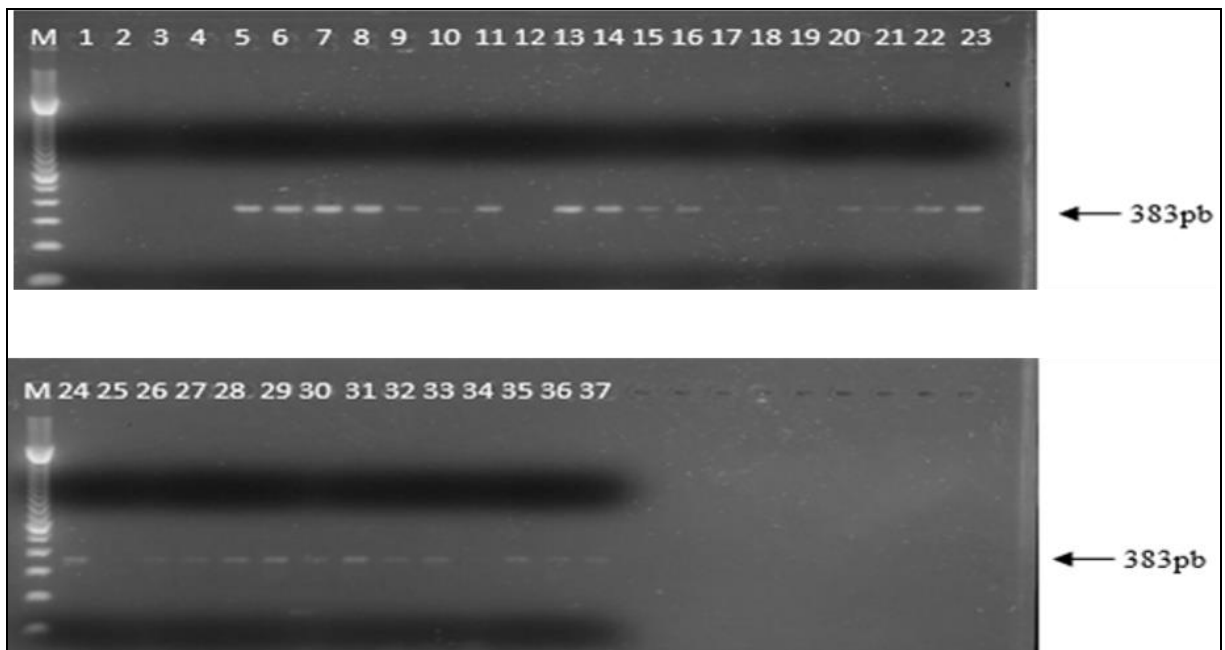
Gel de agarose a 2% corado com Nancy. M: Marcador de peso molecular (100 pb); 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA); 2: Controle negativo da extração (tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo); 3: sangue de gambá; 4: sangue de morcego; 5: sangue de gato; 6: sangue de humano; 7: sangue de cão; 8: sangue de rato; 9: triatomíneo alimentado artificialmente de coelho; 10: triatomíneo alimentado artificialmente de galinha; 11: DNA de *T. cruzi*; 12: DNA de *T. rangeli*; 13: DNA de *L. braziliensis*; 14: DNA de *L. chagasi*.

As sequências geradas foram analisadas e a confirmação das espécies das fontes alimentares foi feita a partir da análise de similaridade entre sequências de DNA no algoritmo BLAST, comparando com as sequências disponíveis no GenBank (Tabela 6).

**Tabela 6:** Análise de similaridade das fontes alimentares testadas pelos iniciadores H1 e H2 (Cyt b).

Alvo	Amostra	Fonte alimentar	Identidade (%)	Nº de acesso
	Triatomíneo alimentado com sangue de coelho	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	89	emb HG810791.1
	Triatomíneo alimentado com sangue de galinha	<i>Gallus gallus</i>	94	DQ236093.1
Cyt b	Sangue de humano	<i>Homo sapiens</i>	97	gb KJ801974.1
	Sangue de gambá	<i>Didelphis aurita</i>	89	gb JF280994.1
	Sangue de cão	<i>Canis lupus familiaris</i>	85	gb JX849655.1

Analisamos a cinética de amplificação do alvo Cyt b em diferentes dias pós-alimentação (dpa) sanguínea, para a detecção do conteúdo alimentar no trato digestório de triatomíneos engurgitados. Deste modo, 50 espécimes de *R. prolixus* foram submetidos ao repasto sanguíneo em coelho utilizando um aparato artificial, dos quais 34 indivíduos se alimentaram. Este ensaio experimental foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, IOC, Fiocruz. Nos pontos (dpa) equivalentes à 8, 15, 22, 29, 37, 43, 49, 52, 55, 62, 72 e 80, os insetos foram dissecados e os seus intestinos médio posterior e posterior foram processados para extração de DNA e posterior amplificação pela PCR para detecção do gene Cyt b. O produto referente ao fragmento de 383 pb foi observado até 80 dias após a alimentação em quase todas as amostras analisadas (Figura 17). É importante ressaltar que o último ponto de observação foi em 80 dpa por não termos mais insetos alimentados disponíveis para a análise.

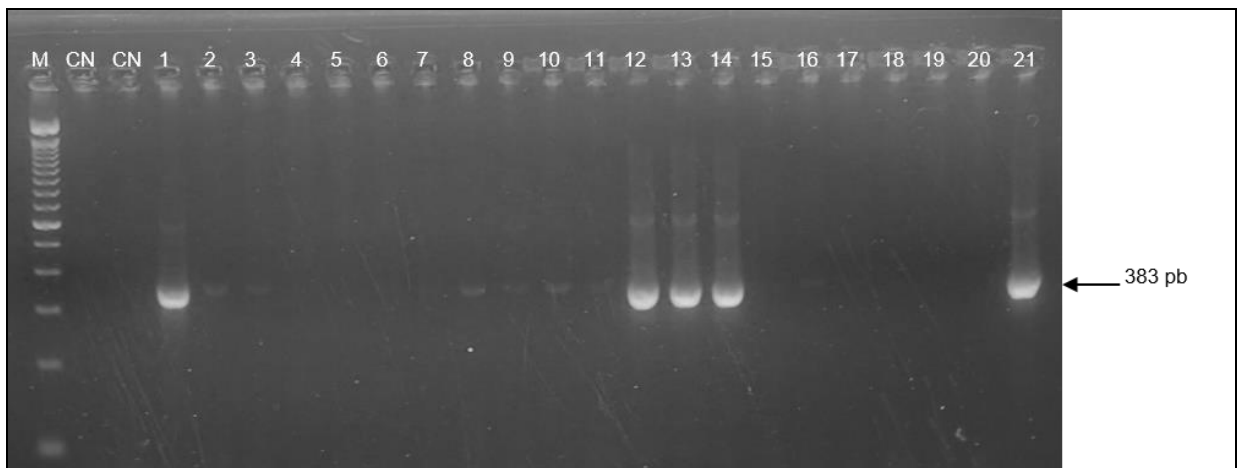


**Figura 17:** Cinética de detecção do conteúdo alimentar no trato digestório de *R. prolixus* alimentados com sangue de coelho.

Gel de agarose a 2% corado com Nancy. M: Marcador de peso molecular (100 pb); 1 e 2: Controles negativos da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA e um tubo contendo apenas água estéril); 3: Controle negativo da extração (tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo); 4-5: 8 dpa; 6-8: 15 dpa; 9-11: 22 dpa; 12-14: 29 dpa; 15-17: 37 dpa; 18-20: 43 dpa; 21-23: 49 dpa 24-26: 52 dpa; 27-29: 55 dpa; 30-32: 62 dpa; 33-35: 72 dpa; 36-37: 80 dpa.

Das 934 amostras analisadas, 7 não amplificaram o gene constitutivo do triatomíneo, que é o nosso controle interno, na PCR convencional multiplex e, por este motivo, estas amostras não foram incluídas nas análises moleculares posteriores (carga parasitária, genotipagem do parasito e hábito alimentar).

Após os testes de eficiência dos iniciadores e da cinética de detecção do DNA de fontes alimentares em diferentes dias após o repasto sanguíneo artificial, submetemos todas as 927 amostras de triatomíneos coletados no campo à PCR convencional com o objetivo de identificar potenciais reservatórios que participam do(s) ciclo(s) de transmissão do *T. cruzi* nas áreas estudadas. Destes, foi possível amplificar o fragmento de Cyt b em 577 insetos (62,3%; 577/927) (Figura 18).



**Figura 18:** Detecção do fragmento do gene Cyt b nos triatomíneos coletados no RS. Gel de agarose a 2% corado com Nancy. M: Marcador de peso molecular (100 pb); CN: Controles negativos da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA) e da extração (tubo contendo todos os reagentes na ausência de intestino de triatomíneo), respectivamente; 1-21: triatomíneos de campo.

Das 577 amostras amplificadas, 341 (59,1%; 341/577) apresentaram resultados mais consistentes quando suas sequências foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank. As demais amostras ficaram sem identificação da fonte alimentar devido à falta de similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados ou por gerar sequências de baixa qualidade. Assim, consideramos somente as amostras que obtiveram identidades entre 80% e 100% e cobertura acima de 70% (Anexo 1).

Dezenove espécies foram observadas nos triatomíneos analisados, demonstrando o ecletismo alimentar destes vetores (Tabela 7). Doze espécies de mamíferos foram identificadas em 238 das 341 amostras (69,5%), sendo 73,5% (175/238) destas sequências correspondentes a *Homo sapiens*; 6,3% (15/238) a *Ovis aries*; 5,9% (14/238) a *Mus musculus*; 4,2% (10/238) a *Canis lupus familiaris*; 2,9% (7/238) a *Capra hircus*; 2,1% (5/238) a *Planigale maculata*; 1,7% (4/238) a *Bos taurus*; 1,3% (3/238) a *Conepatus semistriatus*; e menos de 1% para as espécies *Neacomys sp.* (2/238), *Leopardus tigrinus* (1/238), *Oryctolagus cuniculus* (1/238) e *Coendou prehensilis* (1/238). A espécie *Gallus gallus* foi a única representante de Aves detectada em 113 insetos (33,1%; 113/341), sendo a segunda espécie com maior prevalência (depois de *Homo sapiens*). Também foi possível detectar 3 espécies da Classe Insecta em 8 triatomíneos (2,3%; 8/341): *Gryllus assimilis* (1,2%; 4/341), *Blaptica dubia* (0,9%; 3/341) e *Blattella germanica* (0,3%; 1/341). Por fim, 3 espécies de répteis em 7 espécimes (2,1%; 7/341) foram observadas: *Tupinambis*

*merianae* (1,5%; 5/341), *Acanthodactylus cf. cantoris* (0,3%; 1/341) e *Varanus griseus* (0,3%; 1/341).

No anexo 1 listamos todos os insetos cuja a identificação da fonte alimentar foi realizada, a maioria proveniente do ambiente silvestre, com exceção de uma ninfa (N5) de *T. rubrovaria* alimentada com sangue humano, coletada no peridomicílio em Lavras do Sul. Podemos observar possíveis alimentações mistas em 19 insetos (5,6%; 19/341), que foram: *Homo sapiens* + *Canis lupus familiaris* (31,6%, 6/19), *Homo sapiens* + *Canis lupus familiaris* + *Planigale maculata* (21,1%, 4/19), *Homo sapiens* + *Planigale maculata* (5,3%, 1/19), *Homo sapiens* + *Gallus gallus* (5,3%, 1/19), *Homo sapiens* + *Varanus griseus* (5,3%, 1/19), *Homo sapiens* + *Acanthodactylus cf. cantoris* (5,3%, 1/19), *Homo sapiens* + *Conepatus semistriatus* (5,3%, 1/19), *Homo sapiens* + *Conepatus semistriatus* + *Leopardus tigrinus* (5,3%, 1/19), *Homo sapiens* + *Tupinambis merianae* (5,3%, 1/19), *Homo sapiens* + *Blaptica dubia* (5,3%, 1/19) e *Blaptica dubia* + *Blattella germanica* (5,3%, 1/19).

Quando analisamos a diversidade de espécies por municípios onde os insetos foram coletados, observamos que *Homo sapiens* foi a fonte alimentar encontrada com maior frequência em 4 dos 6 municípios (N=175), seguido de *Gallus gallus* (N=113), *Ovis aries* (N=15), *Mus musculus* (N=14), *Canis lupus familiaris* (N=10), *Capra hircus* (N=7), *Planigale maculata* e *Tupinambis merianae* (N=5), *Gryllus assimilis* e *Bos taurus* (N=4), *Conepatus semistriatus* e *Blaptica dubia* (N=3), *Neacomys sp.* (N=2), entre outras. A proporção de espécie de fonte alimentar por inseto analisado não foi 1:1 devido às alimentações mistas identificadas nos vetores. Deste modo, a mesma espécie de fonte alimentar foi observada em mais de um indivíduo analisado, totalizando 366 espécimes (Tabela 7).

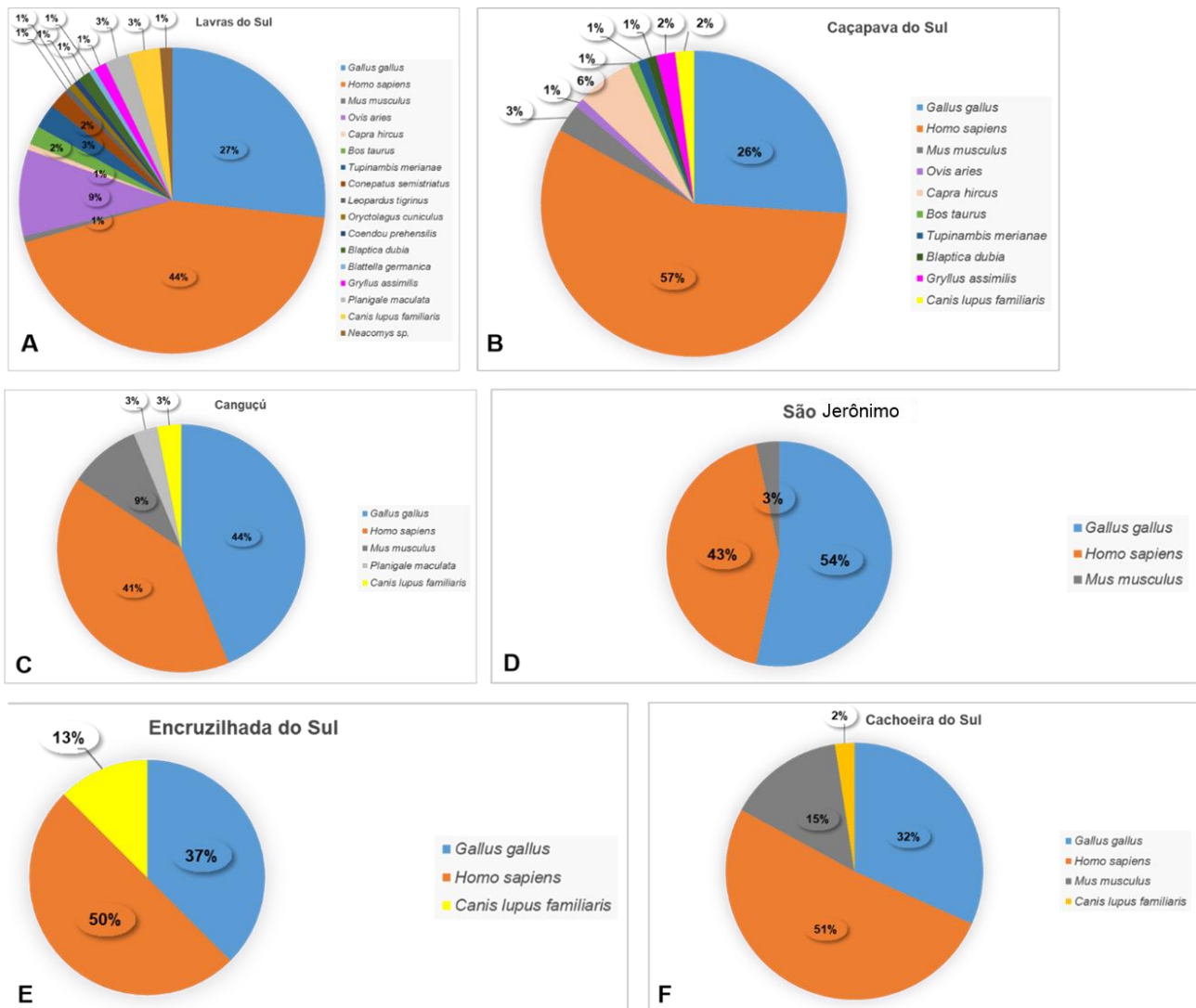
**Tabela 7:** Frequência de espécies identificadas como fonte alimentar por município em que os triatomíneos foram coletados.

Municípios	São Jerônimo	Encruzilhada do Sul	Caçapava do Sul	Cachoeira do Sul	Canguçu	Lavras do Sul	Total
<i>Homo sapiens</i>	13	4	57	21	13	67	175
<i>Gallus gallus</i>	16	3	26	13	14	41	113
<i>Ovis aries</i>	0	0	1	0	0	14	15
<i>Mus musculus</i>	1	0	3	6	3	1	14
<i>Canis lupus familiaris</i>	0	1	2	1	1	5	10
<i>Capra hircus</i>	0	0	6	0	0	1	7
<i>Tupinambis merianae</i>	0	0	1	0	0	4	5
<i>Planigale maculata</i>	0	0	0	0	1	4	5



<i>Gryllus assimilis</i>	0	0	2	0	0	2	4
<i>Bos taurus</i>	0	0	1	0	0	3	4
<i>Conepatus semistriatus</i>	0	0	0	0	0	3	3
<i>Blaptica dubia</i>	0	0	1	0	0	2	3
<i>Neacomys sp.</i>	0	0	0	0	0	2	2
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Blattella germanica</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Varanus griseus</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Acanthodactylus cf. cantoris</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Leopardus tigrinus</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>Coendou prehensilis</i>	0	0	0	0	0	1	1
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>100</b>	<b>41</b>	<b>32</b>	<b>366</b>

O município Lavras do Sul apresentou a maior diversidade de fontes alimentares em triatomíneos (393 insetos analisados; 89,5% das espécies de fontes alimentares), ao passo que o município Encruzilhada do Sul apresentou a menor diversidade (3 fontes alimentares em 38 triatomíneos analisados). São Jerônimo e Canguçu (54% e 44%, respectivamente) foram os únicos municípios em que a galinha foi a fonte alimentar mais frequente do que *H. sapiens*, ainda que os humanos tenham sido a segunda maior fonte (43% e 41%, respectivamente) (Figura 19).



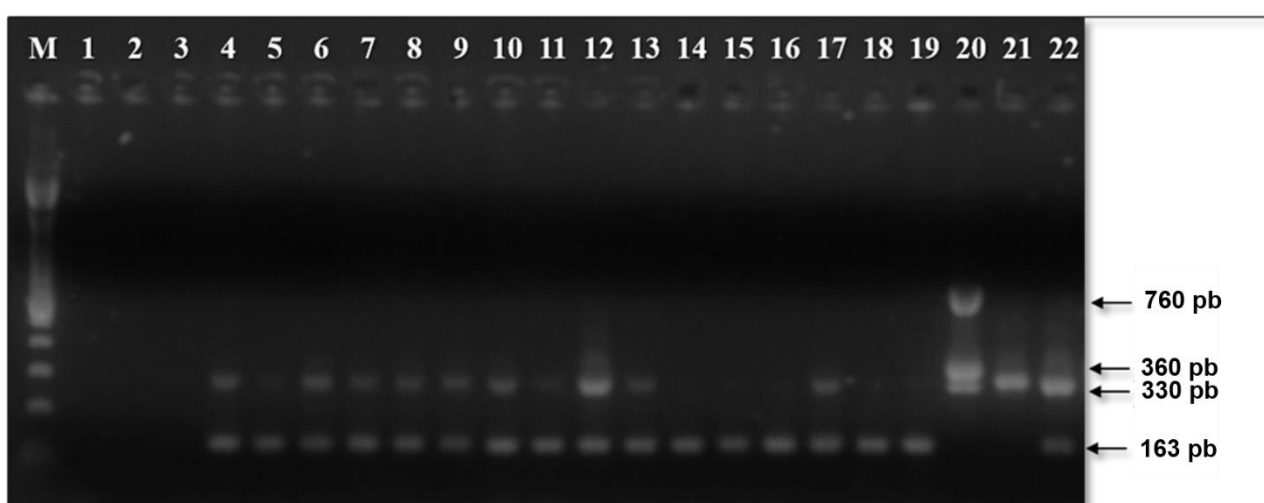
**Figura 19:** Espécies identificadas com maiores frequências no conteúdo intestinal de triatomíneos por município. (A) Lavras do Sul. (B) Caçapava do Sul. (C) Canguçu. (D) São Jerônimo. (E) Encruzilhada do Sul. (F) Cachoeira do Sul.

### 4.2.3 Infecção natural

A análise de detecção de kDNA de *T. cruzi* em triatomíneos de campo foi realizada para rastrear possíveis infecções naturais e melhor compreender a dinâmica de transmissão do parasito nas regiões de estudo.

Do total de 927 amostras, 26 tiveram resultados positivos para PCR-kDNA (26/927; 2,8%). A razão entre o número de exemplares naturalmente infectados pelo protozoário e o número de espécimes coletados de uma determinada espécie foi superior para *T. rubrovaria* (6/27; 22,2%), seguido de *T. circummaculata* (3/29; 10,3%) e *T. carvalhoi* (2/52; 3,8%). As demais 15 amostras positivas para kDNA de *T. cruzi* pertencem ao grupo dos 826 espécimes não identificados (NI) que foram submetidos à taxonomia molecular, perfazendo uma taxa de 1,8% de positividade.

Como dito anteriormente, o fragmento de 163 pb correspondente a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos foi utilizado para validar as amostras kDNA-negativas, livres de infecção pelo *T. cruzi* (as quais não amplificaram o fragmento de 330 pb) e para indicar que não houve inibição da reação de PCR ou falhas na etapa de extração de DNA do conteúdo intestinal do triatomíneo (com exceção das 7 amostras mencionadas anteriormente). Nos nossos resultados não foi detectada a presença de kDNA de *T. rangeli* em nenhum dos exemplares, considerando o perfil de bandas (300 pb, 360 pb e 760 pb) observado no controle positivo para este tripanossomatídeo (cepa Macias) (Figura 20).



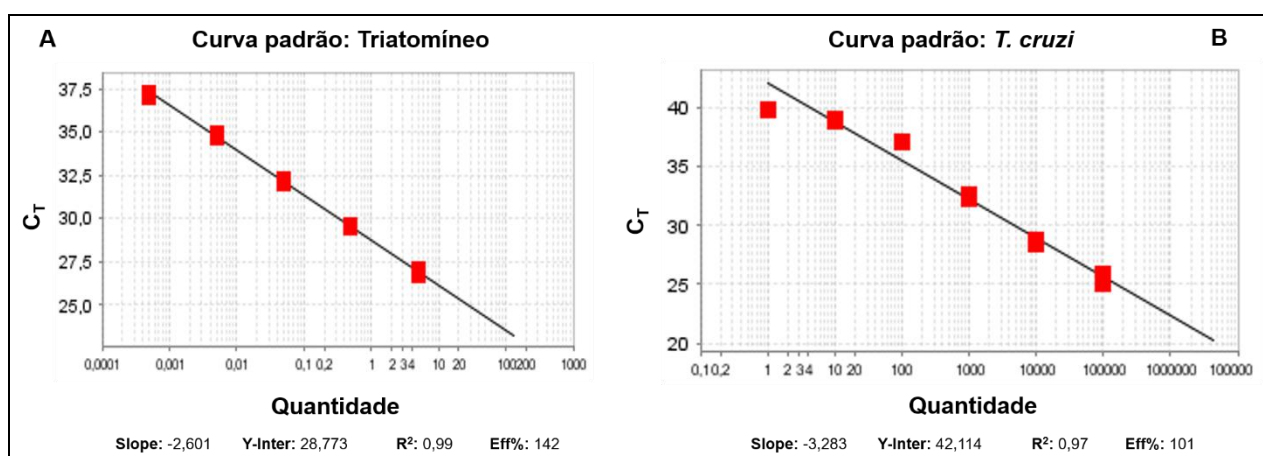
**Figura 20:** Exemplo de revelação dos resultados da PCR convencional multiplex para avaliar infecção natural em triatomíneos.

Gel de agarose 2% corado com Nancy. M: Marcador de peso molecular (100 pb); 1 e 2: Controles negativos da PCR (tubo contendo todos os reagentes do mix de PCR na ausência de DNA e um tubo contendo apenas água estéril); 3: Controle negativo da extração (tubo contendo todos os reagentes do kit para extração de DNA na ausência de intestino de triatomíneo); 4-13, 17: Insetos kDNA-positivos; 14-16, 18, 19: Insetos não infectados; 20: Controle positivo de *T. rangeli* (DNA extraído de epimastigotas Cepa Macias,  $10^5$  parasitos/mL); 21: Controle positivo de *T. cruzi* (DNA extraído de epimastigotas CL-Brener,  $10^5$  parasitos/mL); 22: Controle positivo de infecção (DNA de lisado de *R. prolixus* não infectado misturado a DNA de *T. cruzi* CL-Brener,  $10^5$  parasitos/mL).

As espécies de triatomíneos naturalmente infectadas por *T. cruzi* foram encontradas em quatro dos seis municípios estudados: Caçapava do Sul (*T. carvalhoi*, N=1; *Triatoma* sp., N=3), Canguçu (*T. carvalhoi*, N=1; *Triatoma* sp., N=3), Lavras do Sul (*T. rubrovaria*, N=6; *Triatoma* sp., N=9) e São Jerônimo (*T. circummaculata*, N=3). Cachoeira do Sul e Encruzilhada do Sul foram os únicos municípios em que nenhum inseto kDNA-positivo foi encontrado. Todos os insetos infectados estavam presentes no ambiente silvestre (sob rochas).

#### 4.2.4 Carga parasitária

Para quantificar a carga parasitária de amostras de triatomíneos considerados positivos a partir da detecção de kDNA de *T. cruzi* por PCRc, foi utilizado um ensaio de qPCR multiplex com base no sistema TaqMan®, tendo como alvo o gene que codifica a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos e o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*. A Figura 21 mostra um exemplo de curva padrão de calibração construída a partir de DNA diluído em série, extraído de um *pool* de cinco intestinos de triatomíneos (*R. prolixus* livres de infecção) contaminado artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* CL-Brener. A detecção de DNA de triatomíneos foi linear, na faixa de 5 a 0,001 equivalentes de triatomíneo. A equação da reta foi  $Y = -2,60X + 28,77$ , o que resultou em eficiência (Eff%) de 142% e coeficiente de linearidade ( $R^2$ ) de 0,99 (Figura 21A). A faixa de detecção de DNA de *T. cruzi* também foi linear, variando de  $10^5$  a 10 equivalentes de parasito ( $Y = -3,28X + 42,11$ , Eff%= 101,  $R^2 = 0,97$ ) a partir de amostras reconstituídas de intestinos de triatomíneos contendo o parasito (Figura 21B). Nestes ensaios, a detecção de até 1 equivalente de parasito foi possível com valor de  $C_T = 40$ .

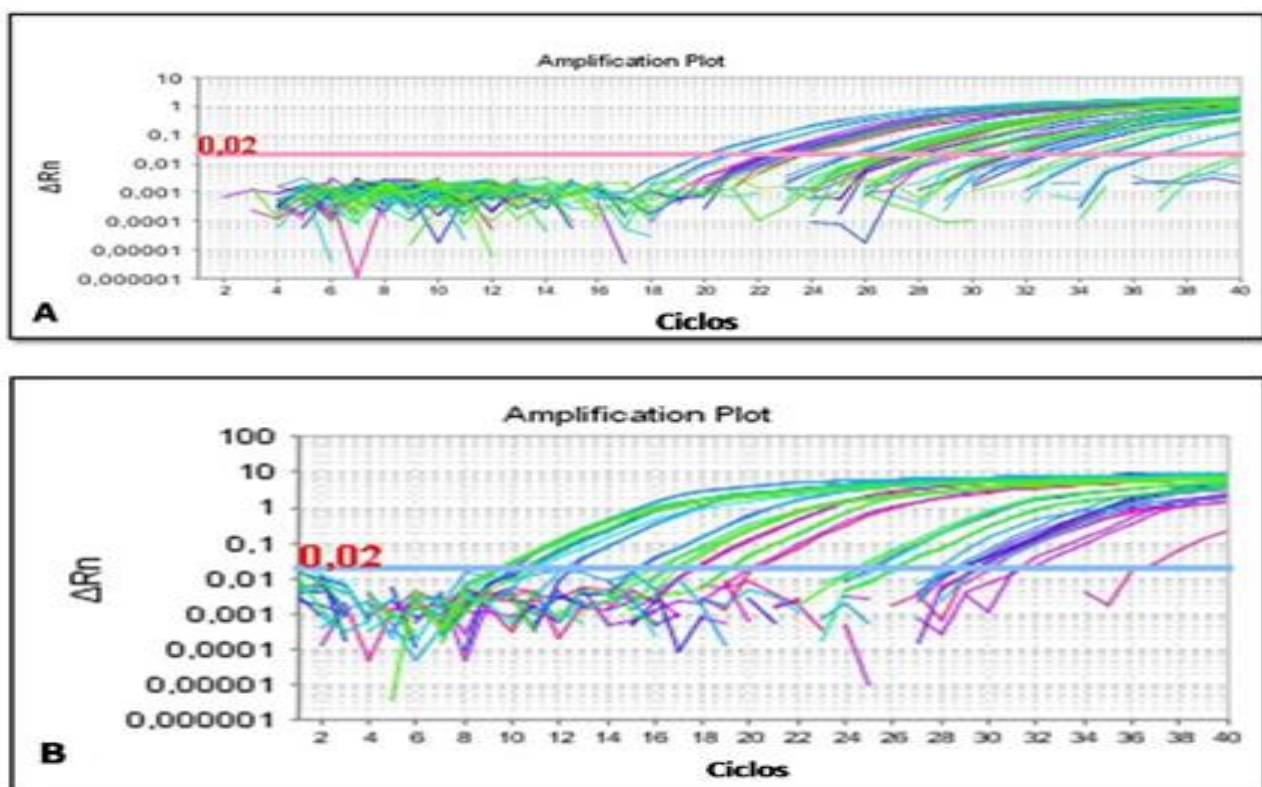


**Figura 21:** Ensaio de qPCR TaqMan.

Curvas padrões representativas para as quantificações absolutas de DNA de triatomíneos e de DNA de *T. cruzi* construída a partir de DNA diluído em série, extraído de um pool de cinco intestinos de triatomíneos não infectados e contaminados artificialmente com epimastigotas de *T. cruzi* CL-Brener. Eixo X: Quantidade (Intestino de triamíneo / Equivalentes de parasito). Eixo Y: Número de ciclos ( $C_T$ ). A inclinação (slope), coeficiente de regressão ( $R^2$ ) e a eficiência de amplificação (Eff%) estão indicados nos gráficos A: Curva padrão de DNA de triatomíneo, B: Curva padrão de DNA de *T. cruzi*.

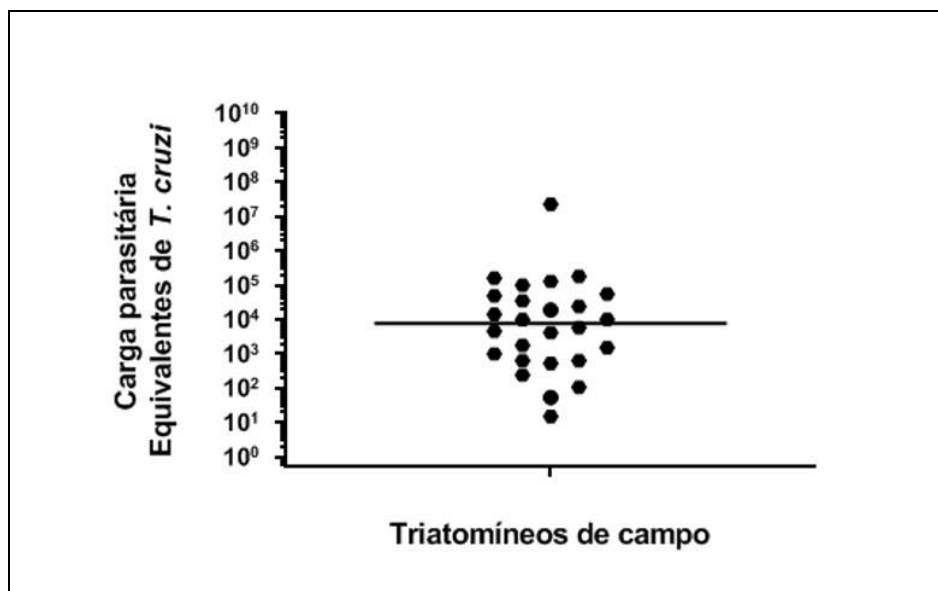
A seguir estão representadas as curvas de amplificação (*amplification plot*) geradas pelo equipamento ABI Prism 7500 Fast durante os ensaios de quantificação. Pode-se observar uma expressiva variação dos valores de  $C_T$  (eixo X) para o alvo em triatomíneo ( $C_T = 20$  a  $C_T = 36$ ), considerando a heterogeneidade do conteúdo de DNA de intestino dos triatomíneos capturados, que está

relacionada aos distintos estádios evolutivos dos espécimes (Figura 22A). Ressalta-se que as amostras de triatomíneos que foram quantificadas foram aquelas que deram resultados positivos para a presença de DNA de *T. cruzi* pela PCR convencional multiplex e que revelaram o fragmento de 163 pb correspondente a região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos, confirmando assim a qualidade do DNA extraído e ausência de inibidores nas amostras. Da mesma forma, pode ser observada a variação dos valores de  $C_T$  para o alvo em *T. cruzi* ( $C_T = 10$  a  $C_T = 37$ ), demonstrando a ampla variação de carga parasitária entre as diferentes amostras de triatomíneos (Figura 22B).



**Figura 22:** Curvas de amplificação representativas do ensaio de qPCR – sistema TaqMan. A: Alvo triatomíneo. B: Alvo *T. cruzi*. Eixo X: Número de ciclos. Eixo Y: Variação de fluorescência normalizada gerada pela clivagem da sonda TaqMan ( $\Delta Rn$ ). A linha horizontal nos gráficos (em rosa/azul) corresponde ao Threshold selecionado no software, o que permite indicar o ciclo ( $C_T$ ) no qual a fluorescência de cada amostra ultrapassa a linha Threshold, estipulada em 0,02 em todos os ensaios.

Todos os 26 insetos positivos para kDNA de *T. cruzi* por PCRc foram quantificados pela qPCR. A carga parasitária variou entre  $2,3 \times 10^7$  (um único exemplar, *T. rubrovaria*) a  $1,5 \times 10^1$  equivalentes de parasito (*Triatoma* sp.), com uma mediana de  $10^4$  equivalentes de parasito (Figura 23, Tabela 8).



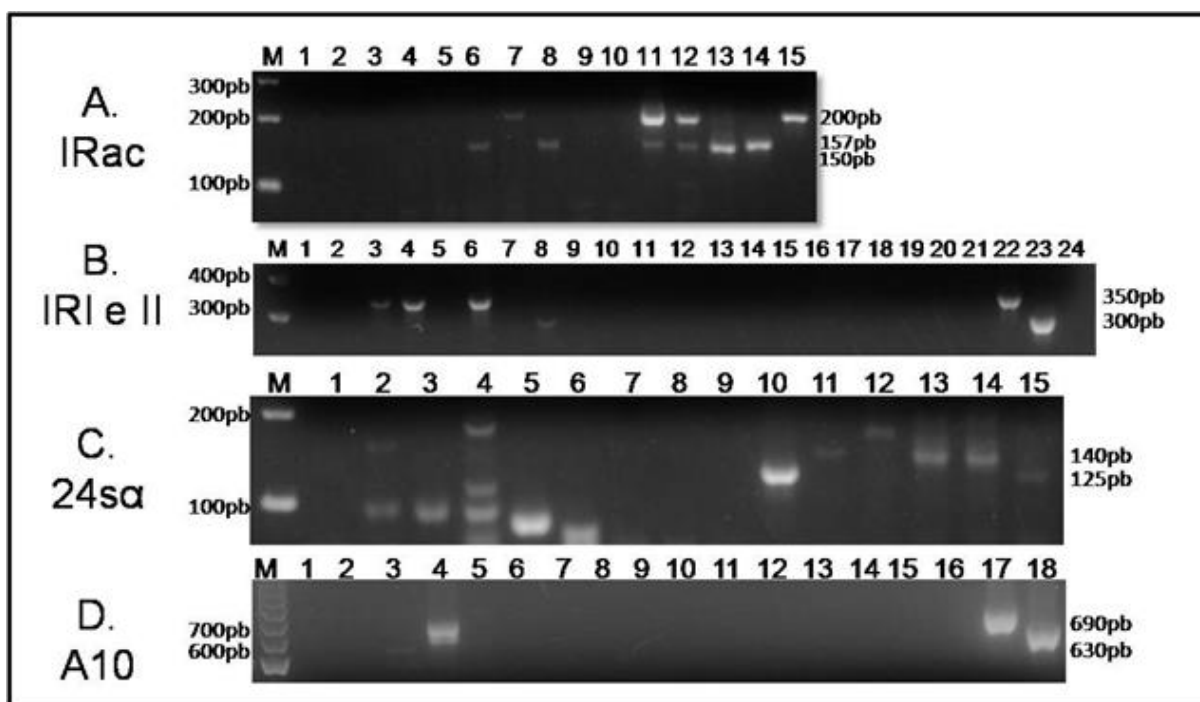
**Figura 23:** Quantificação absoluta da carga parasitária de *T. cruzi* por PCR em Tempo Real multiplex de 26 triatomíneos kDNA-positivos coletados no RS. A mediana (linha horizontal) foi de 10<sup>4</sup> equivalentes de parasito.

#### 4.2.5 Genotipagem de *T. cruzi* em DTUs

A caracterização molecular de *T. cruzi* em triatomíneos naturalmente infectados foi baseada em reações de PCR convencional multilocus. Como demonstrado na figura 12, utilizamos quatro marcadores moleculares: (i) Spliced Leader (SL) ou mini-exon a partir de três regiões intergênicas (IRac, IRI e II). IRac diferencia TcI (150 pb) de TcII/V/VI (157 pb) e TcIII/IV (200 pb); (ii) IRI e II diferenciam as mesmas DTUs de IRac, mas com um padrão de pares de bases diferenciado (350 pb para TcI, 300 pb para TcII/V/VI, e sem amplificação para TcIII/IV). (iii) 24S- $\alpha$  diferencia TcII/VI (140 pb) de TcV (125/140 pb), mas não separa as DTUs TcII e TcVI. Para isso, utilizamos a (iv) região correspondente ao fragmento nuclear A10 gerando uma amplificação de 580 pb ou 690 pb para TcII e de 525 pb ou 630 pb para TcVI. A confirmação da DTU só foi realizada quando os três primeiros alvos do algoritmo (IRac, IRI e IRII e 24S- $\alpha$ ) foram amplificados. As DTUs puderam ser distinguidas através da análise do perfil eletroforético dos fragmentos obtidos, visualizados em gel de agarose a 3% (Figura 24).

Conseguimos identificar o genótipo de *T. cruzi* em apenas **23,1% (6/26)** das amostras kDNA-positivas coletadas no Rio Grande do Sul (Tabela 8). A DTU mais abundante foi TcI (**5/6; 83,3%**), sendo que em uma destas amostras foi identificada coinfeção por TcI + IV (1/6; 16,7%). A ocorrência de TcV foi verificada em um exemplar (**1/6; 16,7%**). A DTU TcI foi encontrada na espécie *T. rubrovaria* (N=3,

duas fêmeas e um macho) no município de Lavras do Sul, e em *Triatoma* sp. (N=1, ninfa N2) de Caçapava do Sul. A DTU TcV foi detectada em um exemplar de *T. carcavallo* (ninha N2) de Canguçu; e a coinfeção por TcI + IV em uma fêmea da espécie *T. circummaculata*, de São Jerônimo (Tabela 8).



**Figura 24:** Géis representativos da tipagem molecular de *T. cruzi* em amostras de triatomíneos naturalmente infectados.

A. Região intergênica do Spliced Leader (SL) ou mini-exon (SL-IRac). M: Marcador de peso molecular de 100 pb; 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes do mix da PCR na ausência de DNA); 2: Controle negativo da extração (tubo contendo todos os reagentes do kit para extração de DNA na ausência de intestino de triatomíneo); 3-12: Amostras de triatomíneos kDNA-positivos; 13: Controle positivo TcI (Cepa Dm28c, 150 pb), 14: Controle positivo TcII/V/VI (Cepa Y, 157 pb); 15: Controle positivo TcIII/IV (Cepa 4167, 200 pb). B. Região Intergênica do Spliced Leader (SL-IRI e II). M: Marcador de peso molecular de 100 pb; 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA); 2: Controle negativo de triatomíneo (inseto não infectado mantido em laboratório - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC); 3-21: Amostras de triatomíneos kDNA-positivos; 22: Controle positivo TcI (Cepa Dm28c, 350 pb); 23: Controle positivo TcII/V/VI (Cepa Y, 300 pb); 24: Controle positivo TcIII/IV (Cepa 4167, não amplifica esse alvo). C. Região do gene ribossomal subunidade 24S- $\alpha$ . M: Marcador de peso molecular de 100 pb, 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA); 2-12: Amostras de triatomíneos kDNA-positivos; 13: Controle positivo TcII/VI (Cepa Y, 140 pb); 14: Controle positivo TcV (Cepa LL014, 125/140 pb); 15: Controle positivo TcIII (Cepa 3663, 125 pb). D. Região correspondente ao fragmento nuclear A10. M: marcador de peso molecular de 100 pb; 1: Controle negativo da PCR (tubo contendo todos os reagentes na ausência de DNA); 2: Controle negativo de triatomíneo (inseto não infectado mantido em laboratório - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC); 3-16: Amostras de triatomíneos kDNA-positivos; 17: Controle positivo TcII (Cepa Y, 580/690 pb); 18: Controle positivo TcVI (Clone CL-Brener, 525/630 pb).

A tabela abaixo apresenta todos os 26 insetos que continham DNA de *T. cruzi*. Neste estudo detectamos, pela primeira vez, a infecção por *T. cruzi* na espécie

*T. carcavalloii* (em 2 exemplares), sendo que um dos espécimes havia se alimentado de sangue humano. Também observamos alimentação mista (*Conepatus semistriatus* + *Homo sapiens*) em *T. rubrovaria* infectado e coinfecção (Tc I+IV) em uma fêmea de *T. circummaculata*, mesmo com a identificação de *Gallus gallus* como fonte alimentar nesse espécime, considerando que aves são refratárias à infecção por *T. cruzi*. Entre os 15 triatomíneos kDNA-positivos cujas fontes alimentares puderam ser identificadas, a maioria (86,7%; 13/15) se alimentou de sangue de galinha. É importante mencionar que encontramos estádios evolutivos mais jovens, como o de 2º estágio, infectados por *T. cruzi*, sendo estes os que apresentaram menor carga parasitária.

**Tabela 8:** Correlação entre espécie, estágio evolutivo, carga parasitária, DTU, fonte alimentar e município em que os triatomíneos kDNA-positivos foram coletados.

Espécie	Estádio evolutivo	Carga parasitária (Equivalentes de parasito)	DTU	Fonte alimentar	Município
<i>T. rubrovaria</i>	N4	$1,7 \times 10^3$	-	-	Lavras do Sul
<i>T. rubrovaria</i>	N5	$1,5 \times 10^3$	-	<i>Conepatus semistriatus</i> + <i>Homo sapiens</i>	Lavras do Sul
<i>T. rubrovaria</i>	MACHO	$1,0 \times 10^3$	-	-	Lavras do Sul
<i>T. rubrovaria</i>	MACHO	$6,4 \times 10^2$	I	<i>Gallus gallus</i>	Lavras do Sul
<i>T. rubrovaria</i>	FÊMEA	$1,3 \times 10^5$	I	-	Lavras do Sul
<i>T. rubrovaria</i>	FÊMEA	$2,3 \times 10^7$	I	<i>Gallus gallus</i>	Lavras do Sul
<i>T. circummaculata</i>	FÊMEA	$2,4 \times 10^2$	I+IV	<i>Gallus gallus</i>	São Jerônimo
<i>T. circummaculata</i>	FÊMEA	$1,6 \times 10^5$	-	<i>Gallus gallus</i>	São Jerônimo
<i>T. circummaculata</i>	MACHO	$1,0 \times 10^5$	-	<i>Gallus gallus</i>	São Jerônimo
<i>T. carcavalloii</i>	N5	$1,9 \times 10^4$	-	<i>Homo sapiens</i>	Canguçu
<i>T. carcavalloii</i>	N2	$1,5 \times 10^1$	V	<i>Gallus gallus</i>	Canguçu
<i>Triatoma sp.</i>	N4	$1,0 \times 10^4$	-	<i>Gallus gallus</i>	Canguçu
<i>Triatoma sp.</i>	N4	$4,6 \times 10^3$	-	-	Lavras do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N4	$2,4 \times 10^4$	-	<i>Gallus gallus</i>	Caçapava do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N4	$3,5 \times 10^4$	-	-	Canguçu
<i>Triatoma sp.</i>	N4	$4,9 \times 10^4$	-	<i>Gallus gallus</i>	Lavras do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N5	$1,4 \times 10^4$	-	-	Lavras do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N2	$5,4 \times 10^1$	I	<i>Gallus gallus</i>	Caçapava do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	MACHO	$5,8 \times 10^3$	-	-	Caçapava do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N4	$1,8 \times 10^5$	-	<i>Gallus gallus</i>	Caçapava do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N5	$9,9 \times 10^3$	-	<i>Gallus gallus</i>	Lavras do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N5	$5,5 \times 10^4$	-	<i>Gallus gallus</i>	Lavras do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N5	$4,1 \times 10^3$	-	-	Lavras do Sul



<i>Triatoma sp.</i>	N4	$6,3 \times 10^2$	-	-	Lavras do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N5	$5,3 \times 10^2$	-	-	Lavras do Sul
<i>Triatoma sp.</i>	N2	$1,0 \times 10^2$	-	-	Lavras do Sul

### 4.3 Competência vetorial de *T. rubrovaria*

#### Infecção experimental por *T. cruzi*

Os resultados da infecção revelaram que tanto *T. rubrovaria* quanto *T. infestans* apresentaram taxas semelhantes de infecção por *T. cruzi* TcVI, independente de dpi ou forma evolutiva do parasito ( $X^2 = 3,5 \times 10^{-31}$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0,05$ ). Vinte de 24 espécimes (20/24; 83,3%) de *T. rubrovaria* alimentados em camundongos infectados excretaram o parasito, assim como 22 de 27 *T. infestans* (22/27; 81,5%). O número de triatomíneos infectados e a carga parasitária nas fezes/urina foram semelhantes entre as espécies quando tripomastigotas e formas transitórias de *T. cruzi* TcVI foram considerados (formas tripomastigotas:  $X^2 = 0,09$ ,  $p = 0,77$ ,  $eW = 0,03$ ,  $p = 0,86$ ; formas transitórias:  $X^2 = 3,27$ ,  $p = 0,051$ ,  $eW = 3,08$ ,  $p = 0,054$ ). No entanto, o número de insetos com tripomastigotas metacíclicos aumentou nos últimos dias após a infecção, independentemente da espécie do vetor (GLM: Tripomastigota ~ dpi, AICc = -91,57, com 72% de probabilidade de ser o melhor modelo). O número crescente de tripomastigotas nas excretas contaminadas apresentou uma forte associação positiva em relação ao tempo, em 60 e 90 dpi (OR = 4,73 e 9,73, respectivamente; Tabela 9). As cargas mais altas de formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes/urina dos triatomíneos foram também encontradas nestes pontos de tempo (H = 18,66,  $p < 0,0001$ ; Post-hoc de Dunn 30-60 dpi com  $p = 0,021$  e 30-90 dpi com  $p < 0,0001$ ; Figura 25A).

**Tabela 9:** Modelo Linear Generalizado para a presença de formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* TcVI nas fezes/urina de *T. rubrovaria* e de *T. infestans* em diferentes dias após a infecção (dpi).

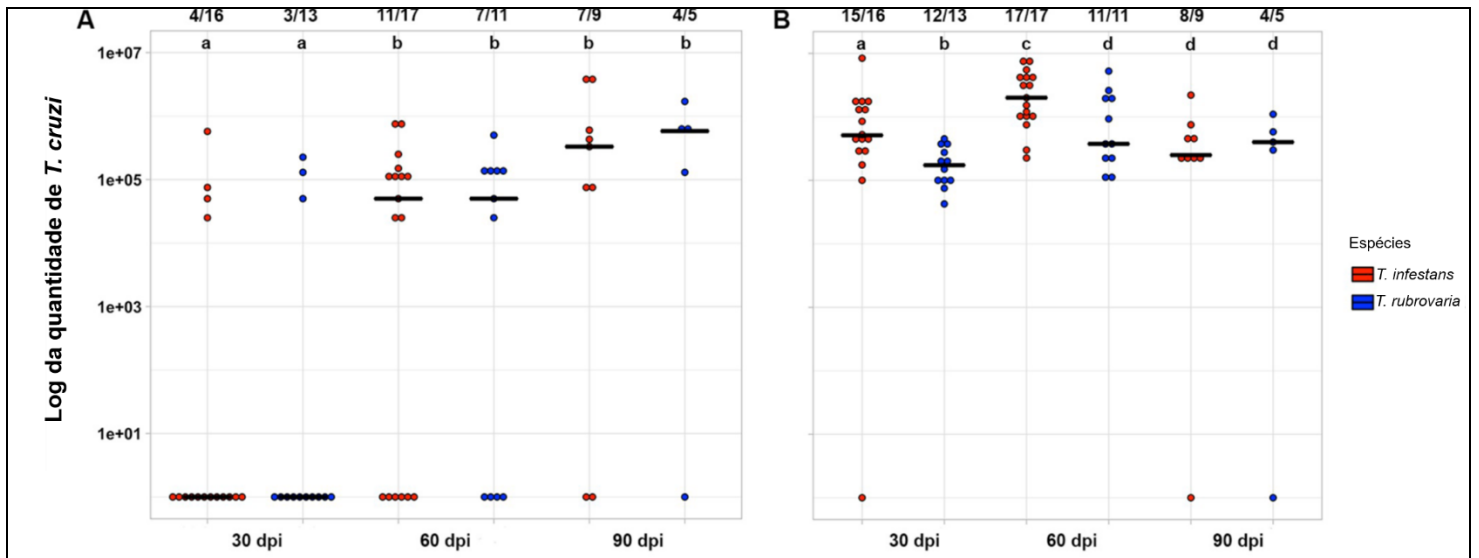
Parâmetros	OR	Estimativa	SE	IC 95%		P-value
(Intercepto)	-	-0,97	0,41	-1,78	-0,15	0,02*
60dpi	4,73	1,55	0,41	0,43	2,68	0,006**
90dpi	9,73	2,26	2,26	0,75	3,78	0,003**

Observe que 30 dpi não é mostrado, pois foi usado como Intercepto. IC: Intervalo de Confiança;

OR: Razão de Chances (do inglês *Odds Ratio*); SE: Erro Padrão.

\*  $0,01 < p < 0,05$ ;

\*\*  $0,001 \leq p \leq 0,01$ .



**Figura 25:** Cargas de *T. cruzi* TcVI tripomastigotas metacíclicos (A) e epimastigotas (B) nas fezes/urina de *T. infestans* (em vermelho) e *T. rubrovaria* (em azul). O número de infectados e o número total de espécimes analisados para cada condição são apresentados acima de cada coluna do gráfico de pontos. As diferentes letras na parte superior indicam diferenças estatisticamente significativas (teste de Kruskal-Wallis; A:  $p$  (a, b)  $< 0,05$ ; testes  $W$  de Wilcoxon-Mann-Whitney B:  $p$  (a, b) = 0,002 ep (c, d) = 0,02). dpi = dias após infecção.

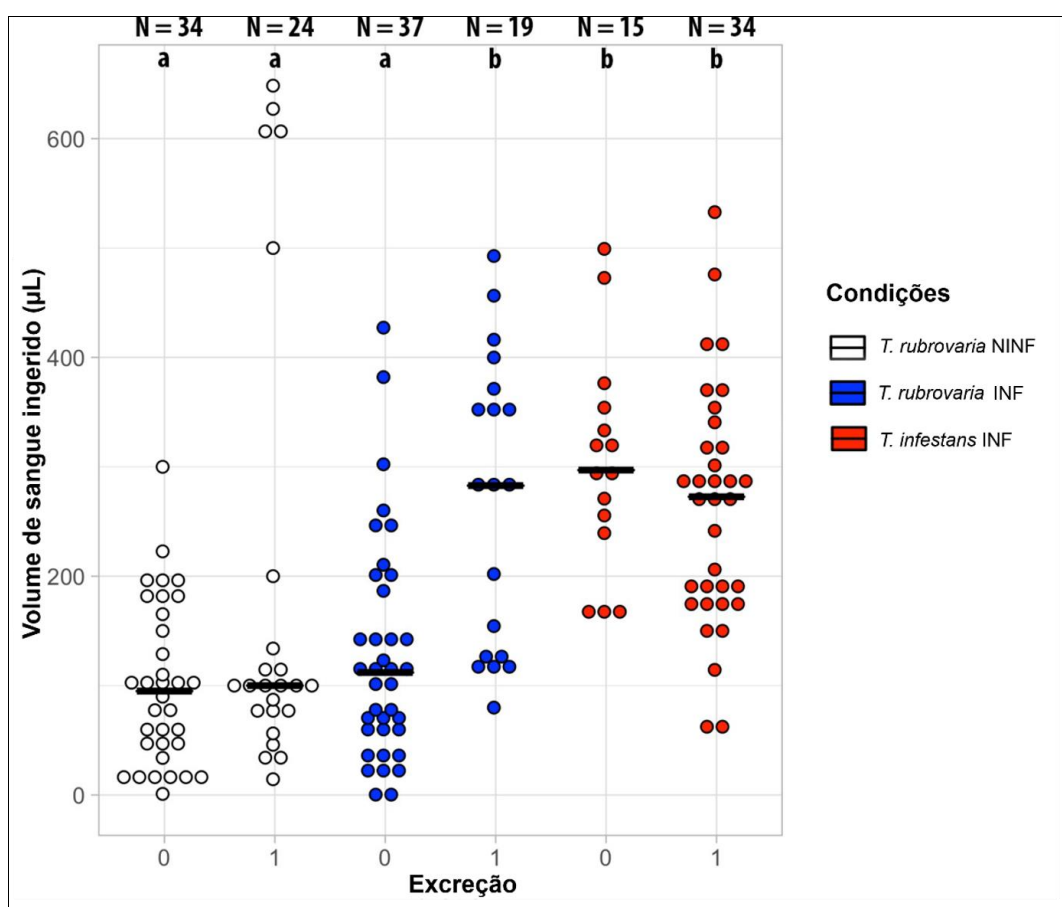
Em relação às formas epimastigotas, embora o GLM não tenha indicado diferenças entre as espécies ou dpi para taxa de infecção das excretas, a quantidade de parasitos *T. cruzi* TcVI em *T. infestans* foi maior do que a observada em *T. rubrovaria* em 30 e 60 dpi ( $W = 173$  e  $106$ ,  $r = 0,56$  e  $0,41$ , com  $p = 0,002$  e  $p = 0,02$ , respectivamente) (Figura 25B).

### Comportamento do vetor

**Comparações por pares:** Os pesos dos espécimes antes dos experimentos não tiveram diferença significativa quando o *status* de infecção (*T. rubrovaria* não infectado e infectado) e espécie (*T. rubrovaria* e *T. infestans*) foram comparados (Rank-sum test  $W$ ,  $p > 0,1$ ). Portanto, não houve necessidade de normalizar os dados de volume de sangue ingerido (mediana  $\pm$  erro padrão  $84,0 \pm 24,2$ ,  $102,5 \pm 14,7$  e  $109 \pm 16,39$  mg, para *T. rubrovaria* infectado e não infectado e *T. infestans* infectado, respectivamente).

O número de indivíduos de *T. infestans* que excretou durante os experimentos de comportamento foi proporcionalmente maior do que o observado para ninfas de *T. rubrovaria* ( $34/49 = 69,4\%$  e  $43/114 = 37,7\%$ , respectivamente;  $\chi^2 = 12,55$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$ ). O *status* de infecção não influenciou na proporção de indivíduos de *T.*

*rubrovaria* que excretaram até 10 minutos após a ingestão de sangue (24/58 = 41,4% e 19/56 = 33,9% para amostras não infectadas e infectadas, respectivamente;  $\chi^2 = 0,39$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,53$ ). Para *T. infestans* infectado com *T. cruzi* e *T. rubrovaria* não infectado, não houve diferença no volume de sangue ingerido entre indivíduos da mesma espécie que excretou ou não após o repasto sanguíneo ( $W = 304,5$ ,  $p = 0,29$  e  $W = 332,5$ ,  $p = 0,24$ ); contudo, indivíduos de *T. rubrovaria* infectados por *T. cruzi* que excretaram após a ingestão de sangue ingeriram mais sangue do que aqueles que não excretaram ( $W = 133$ ,  $p < 0,001$ ; Figura 26).



**Figura 26:** Volume de sangue ingerido e *status* de excreção. (0: Não excretado, 1: Excretado) de *T. rubrovaria* não infectado (NINF), *T. rubrovaria* infectado (INF) e *T. infestans* infectado (INF). O número de amostras analisadas para cada condição está apresentado acima de cada coluna do gráfico de pontos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Wilcoxon-Mann-Whitney W-test  $< 0,001$ ).

O número de tentativas de alimentação não foi significativo quando as espécies ( $\chi^2 = 2,49$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,11$ ) ou estado de infecção ( $\chi^2 = 4,25$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,12$ ) foram comparados, uma vez que a grande maioria das ninfas realizou uma única tentativa de se alimentar de sangue de camundongos (98,3%, 89,9% e 92,3% para *T. rubrovaria* não infectado, *T. rubrovaria* infectado e *T. infestans* infectado,

respectivamente). Os seis parâmetros de excreção e de alimentação foram usados para avaliar possíveis diferenças comportamentais entre *T. rubrovaria* e *T. infestans* e definir quais aspectos do comportamento mudaram devido à infecção por *T. cruzi* TcVI em *T. rubrovaria* (Tabela 10).

**Tabela 10:** Estatísticas resumidas e testes de Wilcoxon-Mann-Whitney (W) entre *T. rubrovaria* não infectado e infectado e *T. infestans* infectado por *T. cruzi* TcVI.

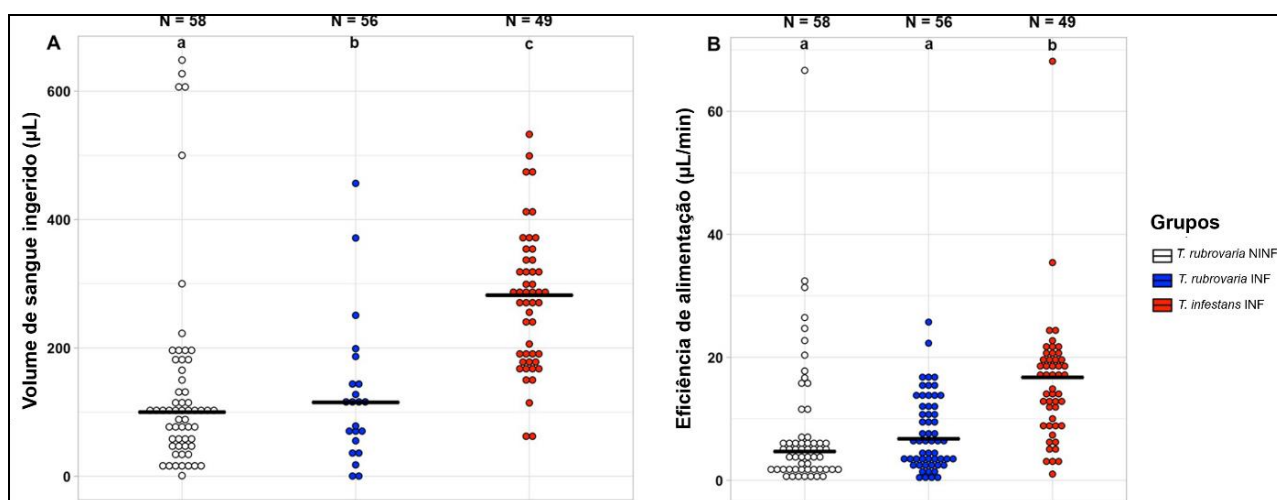
Parâmetros de comportamento	N	Mediana (IC 95%)	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>
Tempo de alimentação (min)	N <sub>NR</sub> = 58	20,5 (17,0–24,0)	1531	1850
	N <sub>IR</sub> = 69	23,9 (18,0–28,0)		
	N <sub>II</sub> = 52	19,0 (15,0–22,0)		
Volume de sangue ingerido (µL)	N <sub>NR</sub> = 58	100,0 (75,0–105,3)	<b>733,5***</b>	<b>1208*</b>
	N <sub>IR</sub> = 56	126,5 (113,8–198,8)		
	N <sub>II</sub> = 49	282,2 (239,4–301,3)		
Distância das fezes/urina (cm)	N <sub>NR</sub> = 24	3,3 (1,5–6,0)	283,5	225,5
	N <sub>IR</sub> = 21	3,0 (1,0–5,5)		
	N <sub>II</sub> = 28	2,0 (2,0–3,5)		
Tempo de excreção (min)	N <sub>NR</sub> = 27	5,0 (1,0–8,0)	268	281,5
	N <sub>IR</sub> = 21	3,0 (1,0–6,0)		
	N <sub>II</sub> = 36	6,0 (4,0–13,0)		
Eficiência de alimentação (µL/min)	N <sub>NR</sub> = 58	4,7 (3,3–5,8)	<b>595***</b>	1388
	N <sub>IR</sub> = 56	6,8 (3,9–9,8)		
	N <sub>II</sub> = 49	16,7 (12,8–18,8)		
Eficiência de excreção (min/cm)	N <sub>NR</sub> = 24	1,2 (0,5–8,8)	291	184,5
	N <sub>IR</sub> = 21	0,8 (0,3–2,0)		
	N <sub>II</sub> = 28	0,7 (0,4–2,0)		

Os resultados estatisticamente significativos são destacados em negrito. N: número de amostras; N<sub>NR</sub>: número de *T. rubrovaria* não infectados; N<sub>IR</sub>: número de *T. rubrovaria* infectados; N<sub>II</sub>: número de *T. infestans* infectados; W<sub>1</sub>: Testes-W entre *T. rubrovaria* e *T. infestans* infectados; W<sub>2</sub>: Testes-W entre *T. rubrovaria* infectado e não infectado.

*Triatoma rubrovaria* infectados e não infectados, e também *T. infestans* infectados tiveram tempo de alimentação semelhantes (mediana IC 95%: 15-28 min; testes W,  $p > 0,05$ ), realizaram a excreção em um período semelhante após a alimentação de sangue (mediana IC 95%: 1-13 min; testes W,  $p > 0,05$ ) e a distância das fezes/urina em relação ao local da picada também foi semelhante (mediana IC

95%: 1-6cm; testes W,  $p > 0,05$ ), resultando em eficiência de excreção similares (mediana IC 95%: 0,3–8,8 min/cm).

Dois parâmetros comportamentais foram diferentes para as duas espécies de triatomíneos (Figura 27 e Tabela 11). Espécimes de *T. infestans* infectados ingeriram mais sangue do que os espécimes de *T. rubrovaria* infectados (mediana ICs 95%: 239,4–301,3  $\mu\text{L}$  e 113,8–198,8  $\mu\text{L}$ , respectivamente;  $W = 733,5$ ,  $p < 0,0001$ ) e, portanto, tiveram maior eficiência de alimentação (mediana ICs 95%: 12,8–18,8  $\mu\text{L}/\text{min}$  e 3,9–9,8  $\mu\text{L}/\text{min}$ , respectivamente;  $W = 595$ ,  $p < 0,0001$ ). Embora a mediana da eficiência de alimentação para *T. rubrovaria* infectado tenha sido ligeiramente maior do que aquela observada em indivíduos de *T. rubrovaria* não infectados (6,8 contra 4,7  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $W = 1388$ ,  $p = 0,18$ ). Curiosamente, a ingestão de sangue parece ser influenciada pela infecção por *T. cruzi* TcVI, com maior ingestão de sangue por espécimes *T. rubrovaria* infectados do que para não infectados (mediana ICs 95%: 113,8–198,8  $\mu\text{L}$  e 75,0–105,3  $\mu\text{L}$ , respectivamente;  $W = 1208$ ,  $p = 0,016$ ).



**Figura 27:** Parâmetros de alimentação de *T. rubrovaria* não infectado (NINF), e *T. rubrovaria* (INF) e *T. infestans* (INF) infectados - volume de sangue ingerido (A) e eficiência de alimentação (B). O número de amostras analisadas para cada condição é apresentado acima de cada coluna do gráfico de pontos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (testes-W de Wilcoxon-Mann-Whitney; A:  $p$  (ab)  $< 0,05$ ,  $p$  (bc, ac)  $< 0,0001$ ; B:  $p$  (ab)  $< 0,0001$ ).

**Modelos Lineares Generalizados:** Construímos 96 GLMs para avaliar quais variáveis de excreção e de alimentação explicam melhor os fenótipos de comportamento observados em *T. infestans* e *T. rubrovaria*. Três a quatro modelos diferentes foram comparáveis ( $\Delta\text{AICc} < 2$ ;  $W_t$  cumulativo = 0,53–0,91) para explicar a maioria das variáveis dependentes, com exceção de "eficiência de excreção", em que dois modelos foram escolhidos ("espécie + volume de sangue" e "espécie"

apenas, como variáveis independentes;  $\Delta AICc = 0,62$ ;  $Wt$  cumulativo = 0,53), e "eficiência de alimentação", para a qual um único modelo foi selecionado ("espécie + distância das fezes/urina" como variáveis independentes;  $\Delta AICc = 2,33$ , quando comparado ao segundo melhor modelo;  $Wt = 0,73$ ). Portanto, por uma questão de clareza, nós decidimos mostrar apenas os resultados de GLM para o modelo com a maior probabilidade relativa ( $Wt$ ).

A variável resposta "tempo de alimentação" pôde ser explicada por três GLMs diferentes usando como variáveis explicativas "espécie", "infecção" e "volume de sangue ingerido"; no entanto, nenhum dos coeficientes de GLM foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). Quando a variável dependente "tempo de excreção" foi analisada, a variável independente "distância das fezes/urina" apareceu em três dos quatro GLMs com maior  $Wt$  e foi positivamente correlacionada (GLM IC 95%: 0,03, 0,21;  $p = 0,009$ ) com influência causal leve (OR = 1,13; Figura 28 e Tabela 11). O oposto também foi observado, com correlação significativa entre a variável independente "tempo de excreção" e a variável dependente "distância das fezes/urina" (GLM IC 95%: -0,02, -0,002;  $p = 0,017$ ). No entanto, uma vez que o coeficiente de GLM foi próximo de zero (ou seja, entre -0,1 e 0,1), não houve influência causal aparente na variável dependente (OR = 0,99) (Figura 28 e Tabela 11).

*Triatoma rubrovaria* ingeriu menos sangue do que *T. infestans* (GLM IC 95%: -0,83, -0,19;  $p = 0,001$ ; OR = 0,59) e, conseqüentemente, teve menor eficiência na alimentação de sangue (coeficiente de GLM IC 95%: -1,04, -0,23;  $p = 0,002$ ; OR = 0,52), além de ter menor eficiência na excreção (coeficiente de GLM IC 95%: -1,23, -0,05;  $p = 0,037$ ; OR = 0,53). Na verdade, um impacto negativo da "espécie" (*T. rubrovaria*) no "tempo de excreção" foi observado (OR = 0,71), mas o coeficiente de GLM não foi significativo (IC 95%: -0,85, 0,17;  $p = 0,194$ ) (Figura 28 e Tabela 11).

Um impacto positivo de infecção em *T. rubrovaria* em relação ao volume sanguíneo foi observado (OR = 1,20), o que significaria que os espécimes infectados desta espécie ingeriram mais sangue do que os não infectados. Vale ressaltar, no entanto, que o coeficiente de GLM também não foi significativo (IC 95%: -0,12, 0,49,  $p = 0,238$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11:** Resultados dos parâmetros comportamentais dos melhores Modelos Lineares Generalizados com diferentes variáveis dependentes.

Variáveis	OR	Coefficiente	SE	IC 95%	P-value	
<b>Tempo de excreção ~ espécie + distância das fezes/urina + volume de sangue (N = 69)</b>						
Espécie ( <i>T. rubrovaria</i> )	<b>0,71</b>	-0,34	0,26	-0,85	0,17	0,194
Distância das fezes/urina	<b>1,13</b>	0,12	0,05	0,03	0,21	0,009**
Volume de sangue	1,00	6,02E-04	7,78E-04	-9E-04	2E-03	0,438
Intercepto	NA	1,24	0,34	0,58	1,90	4,5E-04***
<b>Distância das fezes/urina ~ infecção + tempo de excreção + volume de sangue (N = 69)</b>						
Infecção	1,08	7,75E-02	5,82E-02	-0,04	0,19	0,188
Tempo de excreção	0,99	-9,7E-03	3,93E-03	-0,02	-2E-03	0,017*
Volume de sangue	1,00	1,67E-05	1,60E-04	-3E-04	3E-03	0,917
Intercepto	NA	3,04E-01	5,68E-02	0,19	0,42	1,2E-06***
<b>Volume de sangue ~ espécie + infecção + tempo de alimentação (N = 163)</b>						
Espécie ( <i>T. rubrovaria</i> )	<b>0,59</b>	-0,51	0,16	-0,83	-0,19	0,001**
Infecção	<b>1,20</b>	0,18	0,15	-0,12	0,49	0,238
Tempo de alimentação	1,01	6,75E-03	3,43E-03	3,2E-05	1,3E-02	0,051
Intercepto	NA	5,28	0,21	4,87	5,68	2,0E-16***
<b>Eficiência de alimentação ~ espécie + distância das fezes/urina (N = 69)</b>						
Espécie ( <i>T. rubrovaria</i> )	<b>0,52</b>	-0,64	0,21	-1,04	-0,23	0,002**
Distância das fezes/urina	1,02	0,02	0,04	-0,05	0,09	0,566
Intercepto	NA	2,83	0,20	2,43	3,22	2,0E-16***
<b>Eficiência de excreção ~ espécie + volume de sangue (N = 80)</b>						
Espécie ( <i>T. rubrovaria</i> )	<b>0,53</b>	-0,64	0,30	-1,23	-0,05	0,037*
Volume de sangue	0,99	-1,03E-03	9,62E-04	-3E-03	8E-04	0,287
Intercepto	NA	-0,49	0,34	-1,15	0,17	0,153

IC: Intervalo de Confiança; SE: Erro Padrão; OR: Razão de Chances (do inglês *Odds Ratio*); NA:

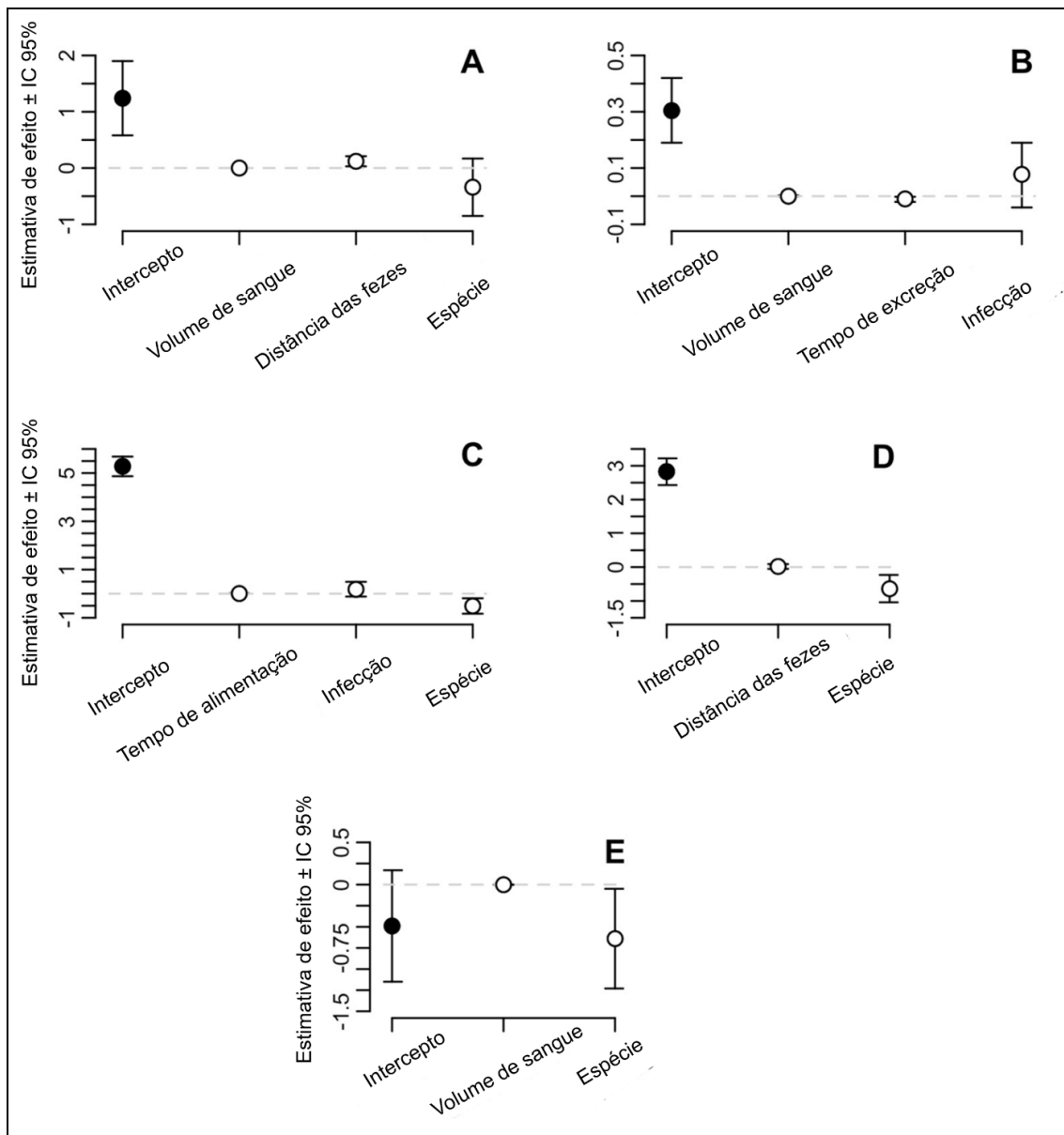
Não analisado.

\*  $0,01 < p < 0,05$ ;

\*\*  $0,001 \leq p \leq 0,01$ ;

\*\*\*  $p < 0,001$ . O til (-) entre os nomes das variáveis significa "interagir com". OR > 1,1 ou

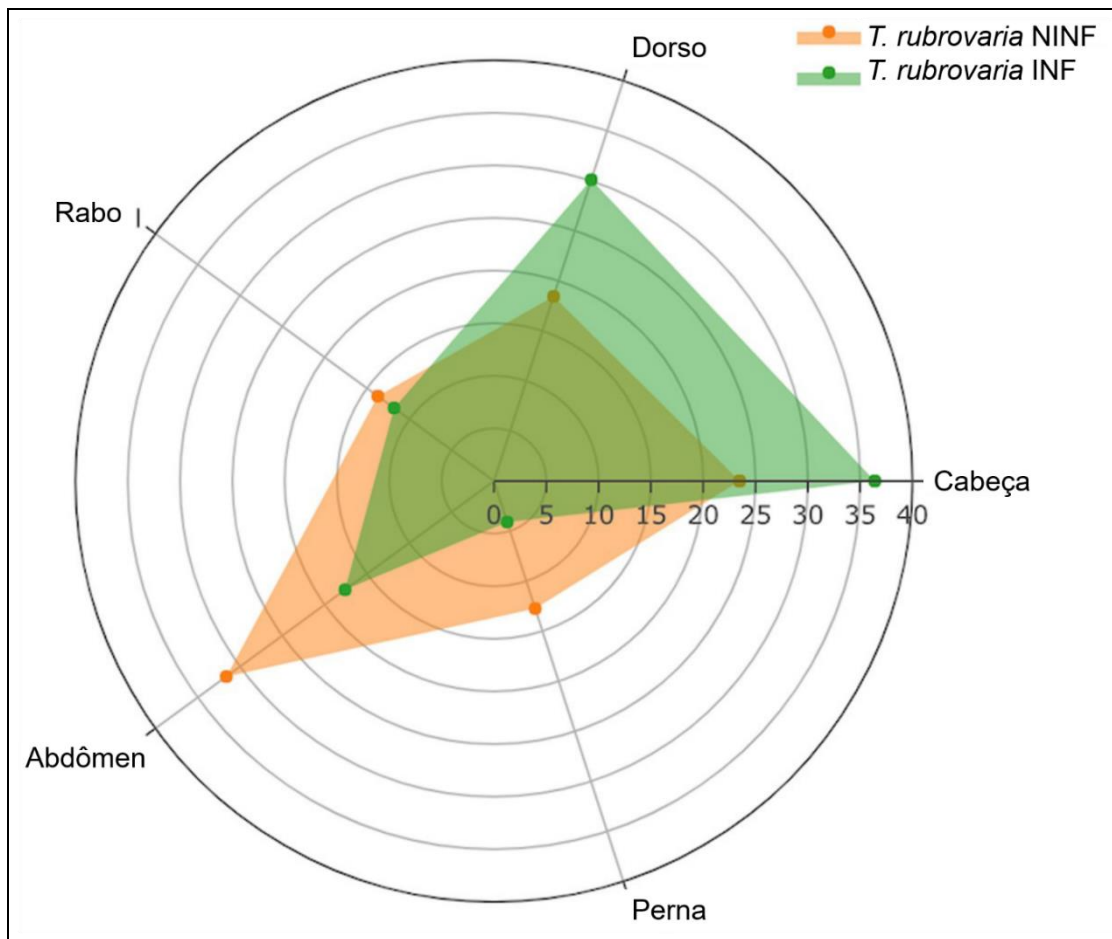
OR < 0,9 são destacados em negrito.



**Figura 28:** Coeficientes da média ( $\pm$  IC 95%) das variáveis independentes (pontos brancos) e os interceptos (pontos pretos) de Modelos Lineares Generalizados. Tempo de excreção após alimentação de sangue (A), distância das fezes/urina do local de picada (B), volume de sangue ingerido (C), eficiência de alimentação (D) e eficiência de excreção (E). A linha tracejada mostra o eixo  $y = 0$ .

**Regressão Logística Multinomial:** *Triatoma rubrovaria* não infectados ( $N = 58$ ) picaram mais frequentemente o abdômen do camundongo (31,6%), seguido pela cabeça (23,5%) e dorso (18,4%). *Triatoma rubrovaria* infectados ( $N = 69$ ) tiveram um comportamento diferente, picando mais a cabeça (36,4%) do que o dorso (30,1%) ou o abdômen (17,6%) (Figura 29).





**Figura 29:** Gráfico de radar exibindo a porcentagem de picadas de *T. rubrovaria* não infectado (NINF) e infectado (INF) em diferentes partes do corpo do camundongo (cabeça, dorso, rabo, abdômen e pernas).

As variáveis "espécie" e "infecção" foram testadas em quatro modelos MLRs diferentes com o objetivo de explicar a variável dependente "local da picada". O melhor modelo considerou apenas a infecção como um preditor importante (MLR: local da picada ~ infecção;  $\Delta AIC = 5,93$  quando comparado com o segundo modelo;  $Wt = 90\%$ ). Foi observada uma associação forte e positiva entre a infecção por *T. cruzi* e o comportamento do triatomíneo de picar a cabeça ( $OR = 2,94$ ) e o dorso ( $OR = 2,80$ ), mas apenas o primeiro foi considerado estatisticamente significativo no modelo (coeficiente MLR  $1,08 \pm 0,55$ ,  $p = 0,03$ ; Tabela 12). Esses resultados sugerem que o comportamento de picada de espécimes de *T. rubrovaria* mudou devido à infecção por *T. cruzi* TcVI.

Destaca-se, em duas ocasiões, a cleptohematofagia (indivíduo não alimentado ingeriu 100,2 uL de sangue e, possivelmente, hemolinfa de outro indivíduo alimentado de camundongo); e comportamentos de coprofagia observados em ninfas de quinto estágio de *T. rubrovaria*.

**Tabela 12:** Coeficientes de Parâmetros para Regressão Logística Multinomial de locais de picada.

Local de picada	Coeficiente de interceptação	Intercepto SE	Coeficiente de infecção	Infecção SE	P-value	OR
Dorso	-0,55	0,68	1,03	0,50	0,05	<b>2,80</b>
Cabeça	-0,56	0,64	1,08	0,55	0,03*	<b>2,94</b>
Pernas	-1,06	1,10	-0,55	0,78	0,48	0,58
Rabo	-0,79	0,82	0,44	0,66	0,51	1,55

Observe o local de picada “abdômen” não é mostrado, pois foi usado como Intercepto. SE: Erro padrão; OR: Razão de Chances (do inglês *Odds Ratio*).

\*  $0,01 < p < 0,05$ . Em negrito,  $OR > 2$ .

## 5 DISCUSSÃO

Para ocorrer a transmissão vetorial do *T. cruzi* ao homem, no intradomicílio, é necessário que o triatomíneo invada ou colonize a habitação vulnerável, que esteja infectado e que elimine nas fezes o *T. cruzi*, e que este penetre na corrente sanguínea do homem. A colonização do vetor pode estar relacionada ao baixo efeito residual de inseticidas, somado às alterações nos biomas induzidas pela devastação do ecótopo natural por ação antrópica, além de atribuições intrínsecas do inseto vetor, como fatores genéticos e comportamentais (FERREIRA & SILVA, 2006). Ademais, atenção especial deve ser dada às espécies de triatomíneos autóctones de importância secundária, que podem reinvasir e recolonizar domicílios submetidos a tratamento químico com inseticidas, não sendo possível sua eliminação definitiva do ambiente silvestre (SILVEIRA, 2000). É importante ressaltar que diversos fatores influenciam positivamente na capacidade vetorial de uma determinada espécie de triatomíneo, tais como: alto grau de antropofilia, ingestão de volume sanguíneo expressivo e apresentar um curto período de repasto, elevada suscetibilidade ao parasito e este dispor de ampla capacidade de metaciclogênese, além do tempo reduzido entre o repasto e a dejeção (FORATTINI, 1980; SILVA et al., 1993; ARGOLO et al., 2008; DIAS et al., 2013).

A campanha no Brasil de controle de triatomíneos (1983-1988) e o sucesso da Iniciativa do Cone Sul envolvendo outros países da América do Sul (1991-2000) tiveram como objetivo a eliminação de *T. infestans* por meio de mapeamento e pulverização de inseticidas em peridomicílios e habitações infestadas (SCHOFIELD & DIAS, 1999; DIAS et al., 2002). No sul do Brasil, essas estratégias juntamente com a vigilância baseada na melhoria das residências, alcançaram um declínio acentuado nas populações domésticas desta espécie, porém, também seguido por um aumento na captura de ninfas e adultos de *T. rubrovaria* em ecótopos antrópicos, sugerindo que esta espécie passasse a estabelecer populações peridomésticas e domésticas somente após a redução de populações de *T. infestans* (ALMEIDA et al., 2000; SILVEIRA & MARTINS, 2014). Portanto, é de suma importância entender a biologia de *T. rubrovaria* e a sua participação nos ciclos de transmissão de *T. cruzi* na natureza.

## 5.1 Taxonomia molecular do subcomplexo *T. rubrovaria*

Marcadores moleculares mitocondriais vêm sendo utilizados em insetos, incluindo triatomíneos, para resolver questões taxonômicas envolvendo espécies filogeneticamente próximas (FERRIS et al., 1983). Entre as vantagens da utilização do gene mitocondrial Cyt b estão: é um gene de cópia única (i.e. não há necessidade de etapas de clonagem), está presente em abundância nos tecidos, e possui alta quantidade de sequências disponíveis no GenBank, permitindo comparação extensa entre as espécies (PERKINS & SCHALL, 2002). No entanto, algumas limitações são observadas quando somente marcadores mitocondriais são utilizados em estudos de sistemática molecular, como a alta taxa de substituição nucleotídica, podendo levar à homoplasia; identificação errônea de espécies pela presença no genoma nuclear de pseudogenes mitocondriais; a possibilidade de introgressão do material genético mitocondrial de uma espécie em outra (MASCOMA & BARGUES, 2009), além de se definir uma espécie com base em poucas centenas de pares de base. Trabalhos utilizando alguns genes mitocondriais (Cyt b, COI e COII) para separação filogenética de espécies proximamente relacionadas, já foram realizados com *R. prolixus* e *R. robustus* s.l. (MONTEIRO et al., 2003; MÁRQUEZ et al., 2011), *T. rubida* e *T. recurva* (PFEILER et al., 2006), espécies dos complexos *T. brasiliensis* (MONTEIRO et al., 2004; MENDONÇA et al., 2009), *R. pictipes* (PAVAN, 2009) e espécies do gênero *Mepraia* (CALLEROS et al., 2010). Estes genes também já foram empregados em análises populacionais de *T. sanguisuga* (DE LA RUA et al., 2011) e *T. infestans* (GIORDANO et al., 2005; CEBALLOS et al., 2011).

Alguns estudos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar taxonomicamente as espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*. Estas espécies podem apresentar características fenotípicas muito semelhantes entre si ou apresentarem variações morfológicas e/ou cromáticas mesmo quando consideradas um único morfotipo. Assim, a definição de uma espécie não pode estar baseada unicamente na morfologia, tornando necessário o entendimento acerca do polimorfismo intrapopulacional, com a associação de diferentes abordagens taxonômicas (NOIREAU et al., 1998).

A plasticidade fenotípica de *T. rubrovaria* e *T. circummaculata* já foi observada por alguns autores (LENT, 1942; DI PRIMIO, 1962; LENT & WYGODZINSKY, 1979; COUTINHO, 2017). Até o momento já foram encontrados 16 polimorfismos

cromáticos em *T. rubrovaria*. Sua coloração geral pode ainda variar em amarela, laranja, vermelha ou rosada, ou ainda haver uma mistura de cores como asas alaranjadas, pronoto totalmente negro e conexivos amarelos (LENT, 1942; LENT & WYGODZINSKY, 1979; COUTINHO, 2017). *Triatoma pintodiasi* apresenta semelhança morfológica com a *T. circummaculata* (JURBERG et al., 2013), de acordo com os padrões cromáticos (DI PRIMIO, 1962). Além disso, os ovos destas espécies compartilham similaridades estruturais na configuração exocorial (LAMAS JR et al., 2018). Suas principais diferenças, em relação à *T. circummaculata* e à *T. carcavalloi*, estão na pigmentação do lobo posterior do pronoto, na morfologia da genitália do macho, nas proporções morfométricas da cabeça e na dosagem de proteínas presentes na hemolinfa (JURBERG et al., 2013; LAMAS JR et al., 2018). *Triatoma circummaculata*, por sua vez, apresenta pelo menos 4 padrões cromáticos do lobo posterior do pronoto, variando do totalmente negro ao vermelho, de modo similar a *T. rubrovaria* (JURBERG et al., 2013), além de quatro padrões cromáticos distintos de conexivo, variando do laranja ao amarelo. *Triatoma carcavalloi* foi descrita como espécie afim de *T. rubrovaria* e *T. circummaculata*, tendo como base aspectos cromáticos e distribuição geográfica, mas se difere pelo tamanho reduzido e coloração (JURBERG et al., 2008; SANTOS-MALLET et al., 2008). Já *T. pintodiasi* apresenta pelo menos dois padrões distintos de pronoto (COUTINHO, 2017), distinguindo-se pela cor laranja do lobo posterior do pronoto, do cório e do ângulo anterior do pronoto, do comprimento e da largura da cabeça, do rostro, do tamanho dos olhos e do abdomen menor (JURBERG et al., 2013).

Em nosso trabalho aqui apresentado, lançamos mão da taxonomia molecular, tendo como alvo o mtDNA, para tentar elucidar a problemática de identificação taxonômica das espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*. Das 310 amostras analisadas por PCR convencional, 92 apresentaram sequências de qualidade e puderam ser identificadas. Possivelmente, o fato de termos utilizado os intestinos, e não a perna dos insetos, pode ter influenciado na qualidade das sequências. A partir da reconstrução filogenética bayesiana com o modelo *Birth-Death* as amostras de campo foram agrupadas em 9 clados, sendo possível separar *T. circummaculata*, *T. carcavalloi*, *T. klugi* e *T. rubrovaria*. As amostras que agruparam com a sequência-referência de *T. rubrovaria* formaram um clado mais distante das demais sequências-referência, e *T. circummaculata* e *T. carcavalloi* foram as espécies mais proximamente relacionadas. Adicionalmente, foram observados ainda outros cinco clados sem a presença de uma sequência referência.

A partir do cálculo das divergências par-a-par utilizando o modelo de substituição nucleotídica K2P, as divergências entre as sequências-referência foram baixas. Houve a sobreposição de valores de divergências para comparações entre sequências intra (0,0-2,6%) e interclados (0,7-5,0%), assim como COUTINHO (2017), que observou que a divergência intraespecífica variou de 0-6% e a interespecífica de 2 a 6%. Em nosso estudo, a maior divergência encontrada entre as sequências-referência foi na comparação entre *T. klugi* e *T. rubrovaria*. Além disso, a divergência intraespecífica dentro do clado de *T. circummaculata* foi maior que a divergência entre as sequências dos clados de *T. circummaculata* e *T. carcavalloi*, colocando em cheque a validade taxonômica dessas espécies – é claro, com base apenas em Cyt b. Considerando ainda as sequências dos demais clados sem sequência-referência, a maior divergência média encontrada foi entre o clado de *T. rubrovaria* e o clado 4 (Tabela 5). É importante ressaltar que três espécies pertencentes ao subcomplexo (*T. pintodiasi*, *T. oliveirai* e *T. limai*) não foram incluídas nas análises.

A relação entre padrões fenotípicos e genéticos em *T. rubrovaria* foi observada pela primeira vez por Almeida e colaboradores (2002b). O estudo analisou padrões de cores e isoenzimas e mostrou a existência de, pelo menos, duas populações distintas de *T. rubrovaria* no RS com diferentes padrões fenotípicos e genéticos. Mais tarde, em 2007, Pacheco e colaboradores utilizaram análises de sequência de DNA ribossomal e RAPD (do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*) para avaliar a estrutura genética das populações de *T. rubrovaria* do Brasil, da Argentina e do Uruguai. As análises genéticas inferidas pela observação dos perfis de bandas provaram que as populações estudadas são facilmente diferenciáveis e que ocorre heterogeneidade dentro de cada população. Os autores concluíram que a variabilidade intraespecífica reflete as amplas plasticidades genética e fenotípica observadas nas populações de *T. rubrovaria* (PACHECO et al., 2007).

Rocha (2012) observou em seu estudo resultados diferentes daqueles obtidos aqui, no qual a partir da análise filogenética de sequências de COI e Cyt b concatenadas de espécimes de *T. rubrovaria* com três padrões cromáticos (distintos no pronoto) e provenientes de sete localidades, pôde concluir que essa espécie é parafilética com relação a *T. circummaculata*, apresentando baixa divergência genética entre as sequências. Apesar de *T. klugi* e *T. carcavalloi* terem formado clados distintos, essas sequências divergiram pouco entre si e entre *T. rubrovaria* e

*T. circummaculata* (< 3,0%). Já as análises filogenéticas com ITS-1 e ITS-2 não separaram as quatro espécies do subcomplexo analisadas em clados monofiléticos.

Outros estudos mais recentes utilizaram a taxonomia integrativa na tentativa de validar as espécies do subcomplexo. Análises morfométricas não diferenciaram as espécies *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii*, *T. circummaculata* e *T. pintodiasi* e resultados de análises de hidrocarbonetos de cutícula foram insuficientes para resolver o relacionamento evolutivo das espécies do subcomplexo (COUTINHO, 2017). Ao sequenciar um fragmento menor de Cyt b (400pb), Coutinho (2017) observou resultados similares aos nossos, com espécimes morfologicamente identificados como *T. rubrovaria* agrupando em cinco clados distintos, sem que houvesse um padrão fenotípico associado a cada clado. Ademais, *T. pintodiasi* agrupou com *T. circummaculata* e *T. klugi* em um único clado.

Silva (2018) utilizou a microscopia eletrônica de varredura para a distinção de *T. carcavalloii*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*. As análises morfométricas de 14 parâmetros da cabeça, tórax e abdomen possibilitaram a distinção de *T. carcavalloii*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria*; e as de dois caracteres da cabeça de fêmeas e de dois caracteres da cabeça de machos permitiram distinguir *T. circummaculata* de *T. pintodiasi*. Já a partir da análise de morfometria geométrica do tamanho do centroide, da análise discriminante e do dendograma de similaridade morfométrica, assim como em Coutinho (2017), foi possível observar que *T. carcavalloii*, *T. circummaculata*, *T. klugi*, *T. pintodiasi* e *T. rubrovaria* formam um único agrupamento. Por fim, a partir das análises dos genes mitocondriais COI, Cyt b e do gene ribossomal 16S, Silva observou uma baixa divergência genética entre as espécies do subcomplexo, evidenciada pelos tamanhos pequenos dos ramos e, assim como observado nesse presente estudo, *T. rubrovaria* foi a espécie mais distante em relação as demais (SILVA, 2018).

Diante dos nossos resultados, temos a possibilidade das amostras que agruparam em outros clados sem sequência-referência serem as três espécies que não amostramos (*T. oliveirai*, *T. pintodiasi* e *T. lima*). No entanto, apesar de *T. oliveirai* e *T. klugi* serem consideradas as espécies do subcomplexo morfologicamente mais próximas (CARCAVALLO et al., 2001; NOIREAU et al., 2002), nenhuma de nossas amostras foram agrupadas no clado de *T. klugi* (clado que tínhamos sequência-referência). Coutinho (2017) observou que as sequências de *T. pintodiasi* se agrupavam mais proximamente de *T. klugi* e *T. circummaculata*

do que de *T. rubrovaria*. Como nesse estudo a autora identificou morfologicamente todos os espécimes utilizados e obteve cinco clados distintos de *T. rubrovaria*, existe uma grande chance de que nossos espécimes também sejam morfologicamente semelhantes à essa espécie.

Nossos resultados poderiam ainda refletir cruzamentos interespecíficos evolutivamente recentes, com a presença de híbridos e assim o gene Cyt b não seria o melhor marcador para analisar o subcomplexo, por ser exclusivamente de linhagem matrilinear. Entretanto, marcadores moleculares de evolução mais lenta que mtCytb, como 16S e ainda marcadores nucleares como ITS-1 e ITS-2 também falharam em separar as espécies do subcomplexo (ROCHA 2009, 2012).

Outra possível explicação para os nossos dados seria a de que o subcomplexo *T. rubrovaria* é um complexo de espécies em *status nascendi*, ou seja, ainda em processo de especiação, sendo composta por mais membros. Outro exemplo de espécies de triatomíneo em processo de *status nascendi* são *R. robustus* II, III, IV e sp. nov. (PAVAN, 2013). Os trabalhos que demonstram a variabilidade fenotípica e genética das populações de *T. rubrovaria* corroboram em parte com essa hipótese (ALMEIDA et al., 2002b; PACHECO et al., 2007; ROCHA, 2009, 2012), ainda que Coutinho (2017) não tenha observado esse padrão. O uso de ferramentas genômicas se faz necessário para corroborar essa hipótese e nos fazer entender melhor os processos evolutivos por detrás do subcomplexo *T. rubrovaria* (ROCHA, 2009, 2012; ALEVI et al., 2017).

## 5.2 Hábito alimentar

Investigações sobre a biologia e o comportamento de insetos vetores são importantes para o maior entendimento da interação hospedeiro-vetor e dos riscos epidemiológicos que uma espécie representa (FORATTINI, 1973). Conhecendo as fontes alimentares dos triatomíneos pode-se ter indícios dos possíveis reservatórios que estariam atuando na manutenção do ciclo zoonótico, além de melhor avaliar a capacidade de dispersão e o grau de antropofilia da espécie vetora e quais os riscos de transmissão do parasito aos seres humanos (OLIVEIRA et al., 2008; AFONSO et al., 2012).

Métodos imunológicos para a detecção de sangue ingerido por artrópodes são utilizados desde 1900 quando a técnica de precipitina foi adaptada para a



determinação da fonte alimentar em mosquitos e outros insetos (EDRISSIAN & HAFIZI, 1982). O Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) foi posteriormente adaptado ao estudo do hábito alimentar em culicídeos, tornando-se uma alternativa para identificação da origem do sangue ingerido (EDRISSIAN & HAFIZI, 1982). Os ensaios imunológicos (teste de precipitação, difusão em gel e ELISA) são comumente utilizados para identificar ao nível de espécie a fonte alimentar dos insetos, mas por possuírem baixa especificidade, muitas vezes reagem de forma cruzada com espécies de uma mesma família. Adicionalmente, esses procedimentos são demorados e dispendiosos devido à preparação prévia de anticorpos específicos para cada hospedeiro vertebrado envolvido no ciclo de transmissão, e ainda são incapazes de apontar reservatórios não esperados (CHOW et al., 1993; HAOUAS et al., 2007).

Técnicas moleculares tem sido usadas para a detecção de fontes alimentares de diversos artrópodes vetores, incluindo carrapatos (ESTRADA-PEÑA et al., 2005), triatomíneos (BOSSENO et al., 2006), flebotomíneos (HAOUAS et al., 2007), culicídeos, entre outros (KENT & NORRIS, 2005; MOLAEI et al., 2008). A PCR é um método mais específico e, geralmente, mais fácil de executar, embora seja necessário o desenho de iniciadores para os hospedeiros envolvidos nos cenários de transmissão do parasito. Vários grupos utilizam sequências de fragmentos de genes mitocondriais, tais como o Cyt b, para a detecção da fonte alimentar de vários insetos vetores (COULSON et al., 1990; KIRSTEIN & GRAY, 1996; BOAKYE et al., 1999; KENT & NORRIS, 2005; MOLAEI, et al., 2008), possibilitando a identificação de diferenças nas sequências de DNA entre as distintas espécies que possam estar atuando como fontes alimentares na natureza.

Em triatomíneos, os métodos utilizados para a investigação de suas fontes alimentares incluem os sorológicos, as técnicas moleculares baseadas na PCR e, mais recentemente, o “High Resolution Melting” (PEÑA et al., 2012), sendo o ELISA o exame mais utilizado na investigação da alimentação sanguínea dos vetores de *T. cruzi* (ZELEDÓN et al., 1973; JIRÓN & ZELEDÓN, 1982; GURTLER et al., 1997; SASAKI et al., 2003; PINEDA et al., 2008; LIMA, 2017).

Almeida et al. (2002a) submeteram o conteúdo fecal de *T. rubrovaria* às análises de precipitina e observaram o ecletismo alimentar dessa espécie, apesar de o soro anti-roedor ter apresentado a maior positividade na maioria das localidades estudadas (Santana do Livramento, Santiago, Canguçu e Encruzilhada do Sul). Apenas foi observado 1,3% de positividade para sangue humano em amostras

coletadas em Santiago. Os autores sugerem que essa reatividade ao sangue humano pode estar associada às atividades de pastagem no campo (ALMEIDA et al., 2002a). Entretanto, cabe ressaltar que 17,5% das amostras foram não reativas aos oito tipos de anti-soros usados no estudo, evidenciando a necessidade de um painel de anti-soros extenso como comparação (controles) ao que pode ser encontrado no campo, o que muitas vezes não é possível de se obter. Em 2006, Martins e colaboradores realizaram o teste de precipitina do conteúdo intestinal de *T. rubrovaria* positivos para *T. cruzi* e demonstraram que 30,8% reagiram para ambos os soros anti-roedor e anti-cabra em amostras independentes, 7,7% foram reativos para os anticorpos contra humanos e contra porcos (alimentação mista) e 30,8% não reagiram para nenhum dos anti-soros testados (MARTINS et al., 2006). É importante destacar que na ausência da oferta de sangue os triatomíneos podem utilizar a hemolinfa como fonte de alimento (SALVATELLA et al., 1994; ALMEIDA et al., 2002a). Em 2000, Lorosa e colaboradores observaram que *T. rubrovaria* é capaz de completar o seu ciclo de vida alimentando-se apenas de *B. dubia*, experimentalmente (LOROSA et al., 2000a; ALMEIDA et al., 2002a).

Os nossos resultados, utilizando um par de iniciadores que flanqueia uma região conservada do cytb para vertebrados, mostraram que as espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* são generalistas e se alimentam de uma ampla variedade de vertebrados e invertebrados corroborando com os estudos em *T. rubrovaria* de Salvatella et al. (1994) no Uruguai e Almeida et al. (2002a) no Brasil. Sabe-se que ninfas de 1º estágio de *T. circummaculata* podem realizar a hemolinfagia em baratas silvestres para seguir o seu desenvolvimento até a fase adulta (RUAS-NETO & CORSEUIL, 2002) e até então, não há estudos demonstrando o seu potencial como vetor de *T. cruzi*. No entanto, observamos que entre as espécies identificadas, *T. circummaculata* teve como a principal fonte alimentar o homem, seguido de galinha, rato-doméstico e porco-espinho. Este comportamento antropofílico nos alerta sobre a importância dessa espécie como possível vetor de *T. cruzi*, juntamente com *T. rubrovaria* e *T. carcavalloei*. Em *T. carcavalloei*, fragmentos do gene Cyt b de humanos e de galinhas foram igualmente os mais detectados, seguidos de rato-doméstico. Já em *T. rubrovaria*, a maior prevalência foi o encontro de sangue humano em alimentações únicas e em duas alimentações mistas, uma com cão e outra com gambá. Além disso, também observamos a presença de galinha e de lagarto. Os roedores são apontados por Salvatella e colaboradores (1994, 1995), possivelmente, como os principais reservatórios silvestres de *T. cruzi*. Observamos alimentação

mista em 5,6% das amostras, muito semelhante ao que foi identificado em estudo anterior no RS - 5,8% (ALMEIDA et al., 2002). No entanto, no Uruguai, *T. rubrovaria* apresentou positividade de 63% para mais de uma fonte de sangue (SALVATELLA et al., 1994).

Obtivemos uma maior identificação de espécies de mamíferos provavelmente por serem os hospedeiros mais disponíveis nos ecótopos estudados. O sangue humano foi a fonte alimentar mais observada nas amostras analisadas, tanto em alimentação única quanto em alimentação mista (Tabela 7, Anexo 1). Este resultado foi discordante com o estudo de Almeida e colaboradores (2002) que observaram somente uma amostra com a presença de sangue humano + sangue de carneiro. O nosso achado sugere que os humanos estão sendo picados fora de suas casas, em atividades de pastoreio ou atividades recreativas ao ar livre (já que não foram encontradas colônias e nem vestígios da presença destes triatomíneos no domicílio). É provável que haja grande quantidade de atividades ao ar livre dada a grande quantidade de insetos com sangue humano, o que aumentariam as chances de encontro com vetores silvestres autóctones, como os do subcomplexo *T. rubrovaria*. Também encontramos em alguns municípios, como Lavras do Sul, vestígios da presença humana nos ambientes silvestres onde os insetos foram coletados (sob as rochas). Havia a presença de garrafas de bebidas vazias, sacolas de biscoitos e outros utensílios. Portanto, não podemos descartar a possibilidade destes triatomíneos terem se alimentado no momento de lazer da população local. Importante lembrar que apenas o município de Lavras do Sul foi positivo para ninfas de *Triatoma sp.* no peridomicílio, dentro da casinha de cachorro e em rochas próximas às residências, demonstrando a presença de espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* no ambiente antrópico e proximidade do homem e animais domésticos.

### **5.3 Infecção natural**

A análise de infecção natural pelo *T. cruzi* nos triatomíneos por meio da microscopia óptica de suspensão do conteúdo intestinal a fresco, pode subestimar as verdadeiras taxas de infecção (CECERE et al., 1999). Metodologias baseadas na PCR para a detecção de kDNA de *T. cruzi* em triatomíneos de campo têm se mostrado bastante eficazes e sensíveis para o rastreamento de possíveis infecções naturais e para a compreensão da dinâmica de transmissão do parasito. Diferentes estudos têm mostrado taxas variáveis de infecção do triatomíneo por *T. cruzi*. A

prevalência de infecção estimada através de exame a fresco das fezes de uma amostra mista de *Triatoma guasayana* e *T. sordida* foi de 0,6%. Esse valor atingiu 10,9% quando os grupos de insetos foram examinados por PCR (SCHWEIGMANN et al., 1995). Em 1995, Breniere e colaboradores testaram a aplicabilidade da PCR para o alvo kDNA de *T. cruzi* em *T. infestans*, *Rhodnius pictipes*, *Eratyrus mucronatus* e *T. sordida*, espécies autóctones da Bolívia, e observaram uma concordância de 85,3% na positividade entre a PCR e microscopia para as análises em *T. infestans*. Porém, nas espécies *R. pictipes*, *E. mucronatus* e *T. sordida*, cujos conteúdos intestinais foram todos negativos ao exame microscópico, foram obtidos 52,8%, 19,1% e 12,5% de positividade, respectivamente, pela PCR (BRENIERE et al., 1995). No ano seguinte, outro estudo utilizou a técnica molecular para detectar a presença de DNA do protozoário em fezes secas de *T. infestans* coletadas em papel filtro, após a infecção artificial destes triatomíneos com sangue de macacos na fase crônica da doença (parasitemia baixa) e prosseguiram com a avaliação de infecção em triatomíneos coletados em áreas endêmicas do Paraguai (RUSSOMANDO et al., 1996). Os resultados sugeriram que a avaliação por PCR pode reduzir o tempo necessário para o exame de insetos utilizados em xenodiagnóstico, e relataram uma positividade de 84% pela PCR e 26% pela microscopia óptica em triatomíneos de campo. Isso pode ser explicado pela falta de mobilidade dos protozoários flagelados presentes nas fezes secas depositadas em papel filtro, e que também pode ocorrer quando o inseto se encontra morto, sendo este um viés do método clássico de microscopia para a pesquisa direta de parasitos (RUSSOMANDO et al., 1996).

Dorn et al. (1999) compararam as sensibilidades da PCR e microscopia óptica em diversos compartimentos do tubo digestório de *T. dimidiata* e *R. prolixus*, os dois principais vetores da Guatemala. Amostras que tiveram o intestino posterior (reto) dissecado apresentaram as maiores taxas de infecção, seguidas por amostras de intestino médio posterior e intestino médio anterior. Para as amostras do intestino posterior de *T. dimidiata* e de *R. prolixus*, as positivities por PCR foram de 39.1% e 57.6% e por microscopia foram de 24.6% e 22.7%, respectivamente. As infecções em *R. prolixus* não teriam sido detectadas, se apenas a amostra retal tivesse sido analisada, enfatizando a necessidade de se analisar o conteúdo de diferentes sítios anatômicos do tubo digestório do inseto como forma de aumentar a sensibilidade dos ensaios diagnósticos (DORN et al., 1999). Nos ensaios de comparação das técnicas de PCR e exame microscópico em lisados fecais obtidos de *T. infestans* coletados em área rural da Argentina, foi possível detectar o kDNA do parasito em

91% das amostras positivas e em 7,5% das amostras negativas ao exame microscópico direto (MARCET et al., 2006). Um estudo realizado por Pinho (2012) demonstrou uma sensibilidade de 100% para a PCR e de apenas 28,6% para a microscopia óptica, a partir do conteúdo intestinal de triatomíneos capturados em dois municípios do estado do Ceará. Villacis et al. (2015), avaliaram a taxa de infecção natural em *Panstrongylus howardi* coletados em dez municípios do Equador. A presença de *T. cruzi* foi confirmada em 29,8% e 61,7% dos insetos analisados por microscopia e por PCR, respectivamente. Em 2017, o nosso grupo publicou um artigo de desenvolvimento e aplicação da técnica de PCR multiplex para a detecção de kDNA de *T. cruzi* (o mesmo protocolo que aplicamos no presente estudo), em triatomíneos coletados em áreas rurais de 26 municípios, abrangendo três biomas brasileiros distintos: Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Observamos uma positividade por PCR de 21% e por microscopia óptica de 7,0%. A maior taxa de infecção foi observada em *P. lutzi* (85,7%), seguido por *T. pseudomaculata* (57,7%), *T. brasiliensis* (54,5%), *T. vitticeps* (28,6%), *T. wygodzinskyi* (6,3%) e *T. sordida* (5,3%) (MOREIRA et al., 2017). Mais recentemente, em 2020, um estudo utilizou como alvo o kDNA de *T. cruzi* para monitorar a infecção em pequenos mamíferos e em triatomíneos presentes em três ilhas do Chile, os autores detectaram 28,9% e 10,2% de taxas de infecção em triatomíneos das Ilhas de Santa Maria e de Pan de Azúcar, respectivamente (CAMPOS-SOTO et al., 2020).

A estimativa da taxa de infecção natural de espécimes do subcomplexo *T. rubrovaria* foi realizada em alguns estudos. Em 1957, Di Primio estudou os índices de infecção pelo *T. cruzi* em triatomíneos no RS por exame a fresco, tendo como resultados: 40,4% para *T. infestans*, 25,5% para *T. rubrovaria* e zero para *T. circummaculata* (DI PRIMIO, 1957). Espécimes de *T. rubrovaria* coletados em 2003 em Quaraí, RS, também foram submetidos à microscopia óptica de seu conteúdo fecal. A taxa de infecção natural observada foi de 4,2 % (MARTINS et al., 2006). Posteriormente, Martins et al. (2008) realizaram a caracterização molecular e biológica de cinco isolados obtidos de *T. rubrovaria* coletados em Quaraí em que 1,6% das amostras foram positivas para *T. cruzi*. Já em 2014, após a compressão abdominal dos insetos, Ribeiro e colaboradores isolaram cepas de *T. cruzi* a partir de espécimes de *T. rubrovaria* capturados nos municípios de Quaraí e Santana do Livramento, perfazendo uma taxa de 17,4% de infecção (RIBEIRO et al., 2014).

Em nosso estudo, por meio da PCR usando os intestinos médio posterior e posterior de espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*, observamos uma taxa de

infecção natural por *T. cruzi* de 2,8% (Figura 20), sendo a maior taxa detectada em *T. rubrovaria* (22,2%), seguido por *T. circummaculata* (10,3%) e *T. carvalhoi* (3,8%). Porém, esses dados devem ser interpretados com cautela, já que não foi possível identificar diversos espécimes coletados. Quinze amostras kDNA-positivas não tiveram a sua espécie identificada, perfazendo uma taxa de 1,8% de positividade. As taxas de infecção natural dos triatomíneos por *T. cruzi* variam enormemente entre as espécies de vetores. Esta variabilidade é diretamente influenciada por fatores, tais como, taxas de prevalência de infecção nos possíveis hospedeiros vertebrados e quão frequentes estes hospedeiros estão em contato com o inseto vetor atuando como fontes alimentares; grau de associação do inseto vetor com animais refratários ao *T. cruzi*, como as aves; local de captura dos insetos e ecótopos onde estão inseridos e a competência vetorial da espécie de vetor (SARQUIS et al., 2004). Adicionalmente, como já mencionado, o tipo de abordagem usada para o rastreamento da infecção por *T. cruzi* em espécimes de campo, pode gerar resultados variáveis nos índices de detecção do parasito nos triatomíneos.

Segundo Coura & Borges-Pereira não passa de 5% o índice de triatomíneos domésticos infectados (COURA & BORGES-PEREIRA, 2010). O baixo índice de infecção por *T. cruzi* que encontramos nos triatomíneos coletados no campo pode ter sido influenciado pelo tipo de fonte alimentar identificada em algumas espécies do subcomplexo, como exemplos: baratas silvestres, nas quais o *T. cruzi* não se desenvolve, como *T. circummaculata* que parece depender destes para que ninfas de 1º estágio possam se desenvolver (RUAS-NETO & CORSEUIL, 2002; LOROSA et al., 2000b); galinhas, que são refratárias ao *T. cruzi*. Como vimos no item anterior, *Gallus gallus* foi a segunda fonte alimentar mais detectada nos insetos examinados (33,1%) (Tabela 7). As aves, apesar de serem refratárias à infecção pelo protozoário, exercem um importante papel na manutenção populacional (fontes de nutrientes) e na dispersão dos insetos vetores por meio da plumagem de aves silvestres (SCHOFIELD et al., 1994). Interessantemente, 13 das 15 amostras kDNA-positivas que tivemos resultados de fonte alimentar, continham o fragmento de Cyt b de galinha em seu conteúdo intestinal (Anexo 1). No entanto, isso não impede que esses insetos possam ter adquirido a infecção por fontes alimentares anteriores, se considerarmos os nossos ensaios preliminares de detecção de fonte alimentar em triatomíneos alimentados artificialmente, onde a detecção de sangue foi possível até o 80º dia pós-alimentação; e de humanos. A fonte alimentar mais detectada entre os triatomíneos foi o *Homo sapiens* (73,5%) e duas amostras kDNA-positivas

apresentaram sangue humano como fonte de alimentação (Tabela 7 e Anexo 1). Apesar da antropofilia representar um alto risco de transmissão do parasito ao homem, o contrário, ou seja, o risco de um inseto se infectar a partir de *Homo sapiens* pode ser baixo em nossa área de estudo. O último registro de DCh aguda no RS foi em 2014, de um único indivíduo (SINAN, 2020). Assim, boa parte da população que está infectada por *T. cruzi* corresponde à indivíduos portadores da fase crônica da doença, e por apresentarem parasitemias baixas e intermitentes, o risco de transmitirem o parasito pode ser reduzido.

#### 5.4 Carga parasitária

Vários aspectos podem influenciar a carga parasitária no inseto vetor, como a suscetibilidade da infecção dependente da espécie de vetor e DTU do parasito, origem e a quantidade de sangue ingerido, os fatores hemolíticos, a presença de membrana perimicrovilar, a ação de aglutininas e lectinas e a imunidade inata do triatomíneo (PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ et al., 1990; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & MOREIRA, 1994; CARVALHO-MOREIRA et al., 2003; AZAMBUJA et al., 2005; GARCIA et al., 2007). Sabe-se que a cepa Y (TcII) é lisada por fatores hemolíticos presentes no intestino médio anterior de *R. prolixus*, ao passo que outras cepas se desenvolvem com sucesso neste vetor, como a Dm28c (TcI) (MELLO et al., 1996; CORTEZ et al., 2002). A DTU TcI é capaz de modular a resposta imune no intestino do inseto, reduzindo a microbiota, sendo uma forma de escape crucial para o desenvolvimento do parasito no trato digestório do vetor (CASTRO et al., 2012). A manutenção do parasito no hospedeiro invertebrado também é determinada pelas características específicas das diferentes cepas de *T. cruzi*, desenvolvimento do parasito no inseto vetor e o número total de flagelados inoculados (DVORAK et al., 1980; ZELEDÓN & RABINOVICH, 1981; GARCIA & AZAMBUJA, 1991; GARCIA et al., 1993). Ademais, o estado nutricional do inseto vetor pode influenciar no desenvolvimento e na multiplicação do parasito, além da metaciclogênese (MELO et al., 2020).

A qPCR é uma técnica promissora em termos de avaliação de competência de infectividade do *T. cruzi* e poderá auxiliar ainda mais em pesquisas futuras sobre a viabilidade do parasito no trato digestório do inseto vetor (UEHARA et al., 2012; MELO et al., 2015). O monitoramento da colonização do trato digestório de *R. prolixus* por *T. cruzi* usando uma estimativa acurada da carga parasitária por qPCR

juntamente com fluorescência e imagem de bioluminescência, foi realizado por Dias et al. (2016). A combinação destas técnicas revelou que há um controle dinâmico da população de *T. cruzi* no intestino do inseto para manter um equilíbrio entre as formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do parasito, o que é crucial para a competência do vetor (DIAS et al., 2016).

O xenodiagnóstico (XD) é uma ferramenta parasitológica na qual os insetos vetores atuam como meio de cultura biológica para amplificar e detectar a infecção por *T. cruzi* em mamíferos. Alguns estudos quantificaram por PCR em Tempo Real (qPCR-XD) a carga de *T. cruzi* em triatomíneos alimentados por XD em indivíduos com DCh crônica. Em estudo realizado por Enriquez et al. (2014), cães e gatos infectados foram expostos ao XD com *T. infestans* criados em laboratório, não infectados, que foram posteriormente examinados individualmente para infecção por microscopia óptica. A concentração do parasito também foi estimada por qPCR-XD, obtendo uma carga média de 8,1 equivalentes de parasito/mL em cães e 9,7 equivalentes de parasito/mL em gatos (ENRIQUEZ et al., 2014). Saavedra e colaboradores (2016), verificaram que em casos de XD positivos, a qPCR-XD permitiu estimar que em 42,9% dos casos, cargas parasitárias variaram entre 100 e 1.000 equivalentes de parasito/mL. No entanto, em 40,5% dos casos de XD negativos, as cargas parasitárias foram bem menores, entre 1 e 10 equivalentes de parasito/mL. Em 2019, Apt e colaboradores demonstraram o potencial uso da qPCR para estimar a carga de *T. cruzi* em dejeções de triatomíneos alimentados por XD em indivíduos com DCh crônica não tratados. A carga parasitária variou entre 0,1 e 9,9 equivalentes de parasito/mL (APT et al., 2019).

Em um estudo do nosso grupo, desenvolvemos um ensaio de qPCR, para medir a carga parasitária diretamente do intestino médio posterior e reto de triatomíneos coletados em campo, de diferentes procedências geográficas. Uma ampla distribuição de carga parasitária foi observada, variando de  $8,05 \times 10^{-2}$  a  $6,31 \times 10^{10}$  equivalentes de parasito, com mediana de  $2,29 \times 10^3$ . Quando a carga do parasito foi analisada por espécies de triatomíneos, uma mediana significativamente maior foi encontrada para *P. lutzii* em comparação com *T. brasiliensis* (MOREIRA et al., 2017). No presente estudo, utilizando o mesmo protocolo de Moreira et al. (2017), observamos uma variação de carga parasitária entre  $1,5 \times 10^1$  equivalentes de parasito a  $2,3 \times 10^7$ , com mediana de  $10^4$  equivalentes de parasito, nas espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* (Figura 23). A maior quantidade de parasitos foi detectada em *T. rubrovaria*. A concentração de DNA de parasitos expressa como



“equivalentes de parasito” corresponde à quantidade representativa de parasitos detectados já que, na verdade, estamos detectando o kDNA deste protozoário e não o parasito viável. Para inferir a viabilidade do parasito no inseto vetor, torna-se necessária a detecção do RNA parasitário, que por ser menos estável e com tempo de duração menor do que o DNA, possibilita a identificação de parasitos vivos.

## 5.5 Genotipagem de *T. cruzi* em DTUs

A maior parte dos insetos examinados provenientes do RS foram coletados no ambiente silvestre. Lorosa et al. (2008) relatam a importância do estudo de triatomíneos silvestres para o maior conhecimento acerca dos seus ecótopos naturais, dos mecanismos de interação entre os ecótopos natural e artificial, e da associação destes vetores com hospedeiros vertebrados. Assim, o conjunto de dados gerados fornece uma maior compreensão sobre a circulação do parasito *T. cruzi* nestes ambientes e do eventual estabelecimento ou restabelecimento do ciclo doméstico de transmissão (LOROSA et al., 2008). A identificação dos genótipos de *T. cruzi* mais frequentes de uma determinada área, possibilita uma maior compreensão sobre o envolvimento destes em infecções humanas e o potencial de causar danos orgânicos, o que representa condições fundamentais para incrementar o manejo destes pacientes (NIELEBOCK et al., 2020). Estudos acerca da distribuição atual das linhagens ou DTUs do *T. cruzi* ao longo do país, prevalência das linhagens por área geográfica e a possível associação entre genótipos do parasito e formas clínicas da DCh em indivíduos residentes em áreas endêmicas são necessários (IBÁÑEZ-CERVANTES et al., 2013). Neste estudo aplicamos uma metodologia baseada em quatro alvos moleculares que permite identificar o genótipo do parasito diretamente do conteúdo intestinal do vetor, sem a necessidade do isolamento prévio de *T. cruzi* em meio de cultura. É reconhecido, que o método de hemocultivo para isolamento de parasitos pode selecionar uma subpopulação específica, mais adaptada ao meio de cultura, não permitindo assim a identificação de infecções mistas (VOLPATO ET AL., 2017; D'ÁVILA ET AL., 2018; NIELEBOCK ET AL., 2020). Em 2020, publicamos um artigo em colaboração com a Fiocruz-Piauí e identificamos as DTUs TcI e TcII em insetos coletados em comunidades rurais de São João do Piauí (DOS SANTOS et al., 2020).

No RS alguns estudos de identificação de genótipos de *T. cruzi* foram conduzidos. Martins (2005) caracterizou geneticamente cinco isolados de *T. cruzi* obtidos de *T. rubrovaria* coletados no ambiente silvestre de Quaraí. A análise do DNA que codifica a fração 24S $\alpha$  do rRNA apresentou fragmentos de 110 pb, agrupando-os em TcI (MARTINS, 2005). Trabalhos anteriores com duas cepas isoladas de *T. rubrovaria* da mesma região, também foram classificadas como TcI (MARTINEZ & ROSA, 2003; MARTINEZ, 2004). Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho em que a DTU mais predominante foi TcI, sendo a maioria observada em *T. rubrovaria* (Lavras do Sul), mas também foi encontrada em *Triatoma* sp. (Caçapava do Sul), além de coinfeção por TcI + TcIV em *T. circummaculata* (São Jerônimo). A ocorrência de TcV foi verificada em um único exemplar de espécie não identificada de Canguçu. A TcI é a mais abundante e a mais dispersa geograficamente entre todas as DTUs de *T. cruzi* nas Américas. Pode ser encontrada em uma ampla variedade de mamíferos e triatomíneos associados aos ciclos silvestres (ZINGALES et al., 2012). Para Martinez (2004), o encontro de TcI em *T. rubrovaria* já era esperado, por este ser considerado um triatomíneo silvestre; embora alguns estudos terem demonstrado um aumento da frequência dessa espécie de triatomíneo no domicílio (ALMEIDA et al., 2002; MARTINEZ, 2004). A presença de infecções mistas é mais comum em ecótopos que apresentam elevadas taxas de infecção ou uma maior diversidade de mamíferos que abrigam diferentes linhagens de *T. cruzi* (CAMPOS-SOTO et al., 2016). Apesar do nosso estudo revelar uma taxa de infecção reduzida (cf. item 5.3) entre as espécies do subcomplexo, detectamos a coinfeção de TcI + TcIV. Sabemos que estas espécies possuem hábito alimentar eclético, se alimentando de diversas espécies de hospedeiros, apesar de termos detectado apenas o fragmento de Cyt b de galinha em *T. circummaculata* coinfectada (TcI + TcIV). Até o presente momento, a DTU TcIV nunca havia sido identificada em espécies do subcomplexo *T. rubrovaria*, no entanto ocorre com bastante frequência em humanos (ZINGALES et al., 2012) e tem sido identificada em surtos de transmissão oral na Venezuela (RAMÍREZ et al., 2010), além de ser encontrada em *R. robustus* na Amazônia Brasileira Ocidental (MONTEIRO et al., 2012).

Curiosamente, identificamos o genótipo TcV em um dos insetos analisados. A distribuição desta DTU no ciclo de transmissão doméstico é muito conhecida em outros países do Cone Sul (ZINGALES et al., 2012). ARAUJO et al. (2011) observaram a presença de TcV em hospedeiros vertebrados nos biomas brasileiros

Cerrado e Caatinga. Os autores sugerem que o padrão de distribuição deste genótipo é mais abrangente do que se conhece, e ainda relatam a identificação de TcV em *T. infestans* na Argentina, Bolívia e Paraguai (ARAUJO et al., 2011). Pode-se supor que a dispersão desta linhagem do parasito esteja ocorrendo destes países para a região Sul do Brasil, pela proximidade com os territórios em que circula. Como o triatomíneo coletado no presente estudo (sem a identificação de espécie) tem hábitos silvestres, capturado sob rochas, possivelmente a TcV aqui identificada, já esteja circulando nesse ambiente.

Não identificamos a DTU TcIII em nenhum espécime analisado, no entanto, a partir da análise do domínio variável D7 do gene da subunidade 24S $\alpha$  do rRNA e do espaçador não transcrito de genes de mini-exon de *T. cruzi*, Martins et al. realizaram a primeira descrição da linhagem TcIIIc (TcIII) em *T. rubrovaria* presente no ciclo silvestre, na região sul do Brasil (MARTINS et al., 2008). Esses dados corroboram o estudo de Gaunt e Miles (2002), onde os autores sugerem que tenha evoluído em um habitat terrestre (tocas) e em ambientes rochosos, na presença de triatomíneos dos gêneros *Panstrongylus* e *Triatoma*, e em associação com mamíferos edentados e/ou marsupiais (GAUNT & MILES, 2002), o que está de acordo com os aspectos ecológicos comportamentais de *T. rubrovaria*.

## 5.6 Competência vetorial de *T. rubrovaria*

Nós avaliamos alguns parâmetros relacionados à competência vetorial de *T. rubrovaria* e identificamos características comportamentais que podem ser influenciadas pela infecção pelo *T. cruzi*. Os resultados foram comparados com *T. infestans*, um dos principais vetores do *T. cruzi* no Cone sul da América do Sul (SCHOFIELD et al., 2006). A infecção por *T. cruzi* (TcVI isolado de *T. infestans* no Rio Grande do Sul) e as taxas de metaciclogênese, e também parâmetros de excreção e de alimentação foram avaliados em ninfas de quinto instar. Encontramos evidências convincentes de que *T. infestans* e *T. rubrovaria* tiveram taxas de infecção por *T. cruzi* semelhantes, e também diferenças não significativas na maioria dos parâmetros de alimentação e de excreção (tempo de alimentação, tempo de excreção após o repasto sanguíneo, distância das fezes e urina do local de picada e, portanto, eficiência de excreção). Espécimes de *T. infestans*, no entanto, ingeriram mais do que o dobro da quantidade de sangue que *T. rubrovaria* ingeriu,

confirmando assim uma maior eficiência de alimentação, bem como taxas de excreção mais elevadas após se alimentar de sangue. Nossas descobertas também sugeriram que os indivíduos *T. rubrovaria* infectados com *T. cruzi* TcVI ingeriram mais sangue do que os não infectados (~ 25%) e também mudaram seu comportamento de picada.

A metaciclogênese é uma diferenciação adaptativa do *T. cruzi* devido a fatores nutricionais e estresse oxidativo no intestino do triatomíneo (FIGUEIREDO et al., 2000). Portanto, não é surpreendente que vetores e parasitos circulando em um mesmo biótopo possam ter uma melhor interação devido à coevolução (LAMBRECHTS et al., 2006), incluindo maiores taxas de metaciclogênese (DWORAK et al., 2017). Para triatomíneos e *T. cruzi*, esta coevolução resulta em infecções e ciclos de transmissão bem-sucedidos (por exemplo, presença de formas tripomastigotas nas excretas dos insetos). Infecções experimentais de *Mepraia pallidipennis* de Morelos, México, com duas diferentes cepas de TcI - uma de Morelos e outra de Chilpancingo, Guerrero, México, revelou que o parasito da área geográfica diferente (Chilpancingo) causou mais efeitos debilitantes sobre o vetor, tais como alteração do seu tamanho, aumento na parasitemia e diminuição da taxa de sobrevivência (CORDERO-MONTOYA et al., 2019), evidenciando assim o possível papel das interações genótipo-por-genótipo (LAMBRECHTS et al., 2006) em populações de triatomíneos e cepas de *T. cruzi* na mesma área geográfica. Portanto, aqui nós usamos um parasito (cepa CL, TcVI) isolado da excreta de *T. infestans* capturado no campo no Rio Grande do Sul, mesmo local onde *T. infestans* e *T. rubrovaria* foram coletados, para garantir que os desfechos aqui observados não fossem causados por deficiências genotípicas entre a população de vetores e a cepa do parasito.

Neste estudo, as infecções experimentais de *T. rubrovaria* e *T. infestans* com *T. cruzi* TcVI revelaram diferenças interespecíficas não significativas no número de triatomíneos infectados ou na carga parasitária nas excretas quando consideradas as formas tripomastigota e transitória (Figura 27A). O número de triatomíneos com tripomastigotas metacíclicos foi significativamente maior, assim como as cargas de tripomastigotas nas excretas nos dias posteriores à infecção (60 e 90 dpi), independentemente da espécie do vetor (Figura 27A e Tabela 9). Portanto, os nossos resultados alertam sobre o grande potencial de *T. rubrovaria* para transmitir *T. cruzi* TcVI. Diferenças interespecíficas foram observadas na Bolívia para três diferentes espécies vetoradas infectadas com *T. cruzi* TcVI (cepa Tulahuén). Embora a

porcentagem de excreta com formas tripomastigotas foi semelhante para *T. infestans*, *T. sordida* e *Triatoma guasayana* (espécie silvestre/peridoméstica na Bolívia), *T. infestans* apresentou maiores cargas de tripomastigotas (LOZAMURGUÍA & NOIREAU, 2010). Em relação à forma epimastigota, *T. infestans* apresentou aqui um maior número desta forma evolutiva em 30 e 60 dpi (Figura 27B). Este resultado, possivelmente, foi porque o *T. infestans* ingeriu mais sangue do que *T. rubrovaria* (Tabelas 10 e 11, Figura 28) e o heme (uma molécula pró-oxidante liberado em grandes quantidades após a degradação da hemoglobina durante a digestão do sangue) parece ser responsável pela proliferação de epimastigotas de forma dose-dependente (LARA et al., 2007).

Os efeitos da infecção pelo *T. cruzi* no comportamento dos triatomíneos são pouco investigados e poucos os estudos disponíveis focaram no *fitness* do vetor, no comportamento de excreção e de alimentação, agregação/geotaxia e dispersão/locomoção (GUARNERI & LORENZO, 2017; DEPICKÈRE et al., 2019; CORDERO-MONTOYA et al., 2019; PEREYRA et al., 2020). Os parâmetros comportamentais de excreção e de alimentação são de suma importância, uma vez que determinam a eficiência de transmissão de *T. cruzi* para hospedeiros vertebrados (LENT & WYGODZINSKY, 1979). Em nosso estudo, *T. rubrovaria* infectado e não infectado, e também *T. infestans* infectado, tiveram o tempo de alimentação e de excreção após a alimentação de sangue semelhante, e também excretaram a uma distância semelhante do local de picada. Anteriormente, não foi observada diferença nos dois primeiros parâmetros entre *R. prolixus* não infectado e infectado coletado na Venezuela com uma cepa de *T. cruzi* TcI da Bacia Amazônica. Não obstante, resultados discrepantes foram observados para *T. infestans* não infectados e infectados do Chaco, Argentina, com uma cepa de *T. cruzi* TcVI de Tulahuén, Chile. Espécimes infectados excretaram mais rápido e em maior quantidade do que os não infectados (PEREYRA et al., 2020). Excreção mais rápida também foi observada para *Mepraia spinolai* (espécie responsável pela transmissão do *T. cruzi* no árido e semi-árido do Chile) da Reserva Nacional Las Chinchillas, Chile, infectado com isolado de *T. cruzi* da mesma localidade (BOTTO-MAHAN et al., 2006).

A quantidade de sangue ingerido parece ser positivamente influenciada pela infecção por *T. cruzi* TcVI, com um maior volume ingerido por *T. rubrovaria* infectado (mediana 126,5 µL) do que por amostras não infectadas (mediana de 100 µL) (Tabela 10). Além disso, espécimes de *T. rubrovaria* infectados com *T. cruzi* que

excretaram durante os experimentos ingeriram o dobro do volume de sangue quando comparado à *T. rubrovaria* infectado ou não infectado que não defecou (Figura 26). O efeito de infecção no volume de sangue ingerido foi marginalmente observado no GLM, que embora o coeficiente de infecção não foi significativo, o odds ratio revelou um efeito moderado (Tabela 11). *Trypanosoma cruzi* não afetou o tempo de alimentação e procura pelo hospedeiro em *R. prolixus* (TAKANO-LEE & EDMAN, 2002). Botto-Mahan et al. (BOTTO-MAHAN et al., 2006) observaram um aumento da taxa de picadas em *M. spinolai* infectado com *T. cruzi* em comparação com espécimes não infectados, embora o parasito não tenha interferido no intervalo de tempo até a primeira tentativa de alimentação (BOTTO-MAHAN et al., 2006), ou no volume de sangue ingerido (BOTTO-MAHAN, 2009). Estay-Olea et al. (ESTAY-OLEA et al., 2020) observaram para as mesmas espécies de triatomíneos que o estado nutricional de triatomíneos não infectados foi superior ao de infectados, reforçando a hipótese de que os triatomíneos infectados com *T. cruzi* precisam de mais sangue para realizar a muda e a excreção durante/após o repasto sanguíneo do que os indivíduos não infectados, provavelmente para compensar os nutrientes consumidos pelos tripanossomos (ESTAY-OLEA et al., 2020).

Os triatomíneos são capazes de reconhecer e serem atraídos por diferentes sinais do hospedeiro, como odores do hospedeiro e dióxido de carbono, além de sua extrema sensibilidade ao calor devido à percepção de calor e radiação infravermelha emitida pelo hospedeiro (LAZZARI et al., 2013). Em um estudo recente, *T. pallidipennis* e *T. longipennis* de terceiro instar infectados com isolado de *T. cruzi* Chilpancingo (Tcl) foram mais atraídos por compostos que imitam o odor liberado pelo rosto humano do que por insetos não infectados (RAMÍREZ-GONZÁLEZ et al., 2019). Esses dados estão de acordo com os nossos achados de que *T. rubrovaria* infectado picou com mais frequência na cabeça (36,4%) do que em outras regiões do corpo dos camundongos, enquanto as picadas dos espécimes não infectados foram mais frequentes no abdômen (31,6%) (Figura 29). Diferentes modelos multinomiais foram testados para avaliar as variáveis "espécie" e "infecção" como preditores do local da picada e o modelo que considera apenas a infecção como um preditor importante foi o mais informativo. Apesar da regressão logística multinomial ter mostrado uma forte associação entre infecção por *T. cruzi* e comportamento do triatomíneo de picar a cabeça (OR = 2,93) e o dorso (OR = 2,80), apenas o primeiro foi estatisticamente significativo no modelo (Tabela 12). As análises resultantes

sugerem uma mudança no comportamento de picada de *T. rubrovaria* causada pela infecção por *T. cruzi* TcVI.

Diferenças interespecíficas foram observadas em relação à proporção de indivíduos que excretaram durante o experimento, para o qual foi maior para *T. infestans* (Figura 26), e o volume de sangue ingerido, em que esta espécie ingeriu mais de duas vezes o volume de sangue daquele observado para *T. rubrovaria* (Figura 27A). Conseqüentemente, a primeira espécie revelou maior eficiência de alimentação (Figura 27B). Na verdade, as correlações negativas entre *T. rubrovaria* e a quantidade de sangue ingerido e a eficiência de ingestão de sangue foram consideráveis (Tabela 11 e Figura 28). Características estruturais e fisiológicas já estavam associadas à eficiência alimentar dos triatomíneos. A sucção de sangue, por exemplo, depende da bomba cibarial (uma estrutura de câmara com músculos na cabeça) que promove uma pressão negativa, puxando o sangue de dentro do vaso. Já foi observado que *T. infestans* é capaz de ingerir maiores quantidades de sangue por contração da bomba cibárica quando comparado a *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* (GUARNERI et al., 2000). Além disso, diferenças na atividade vasodilatadora e na enzima apirase (inibidor da agregação plaquetária) presente nas glândulas salivares (RIBEIRO et al., 1998; ARAUJO et al., 2009) e na hemaglutinação e atividades anticoagulantes no conteúdo intestinal durante a alimentação (ARAUJO et al., 2009; PAIM et al., 2011) também influenciam o volume de sangue ingerido e, portanto, a eficiência de alimentação de triatomíneos em hospedeiros vertebrados. A maior taxa de ingestão de sangue provavelmente explica o menor tempo de muda de ninfas de quinto estágio de *T. infestans* sobre *T. rubrovaria* (64-83 e 110-131 dias, respectivamente) (DAMBORSKY et al., 2005; DURÁN et al., 2016) e também uma alta densidade populacional de *T. infestans* dentro de habitações humanas (PEREIRA et al., 2006). Uma vez que a quantidade de sangue ingerido está positivamente correlacionada com o volume da excreta (PIESMAN & SHERLOCK, 1983), também é altamente provável que o *T. infestans* libere mais parasitos do que *T. rubrovaria* durante a excreção.

A associação positiva observada no GLM entre a distância da excreção e o local de picada e tempo de excreção após a alimentação de sangue (Tabela 11) é uma comportamento de excreção e de alimentação de senso comum dos triatomíneos, mas raramente testado. Nossos resultados aqui confirmam que a tendência do triatomíneo é de se afastar da região da picada após uma refeição de sangue, provavelmente para evitar ser notado/predado pelo hospedeiro vertebrado,

o que reforça as estimativas de baixa probabilidade de transmissão direta de *T. cruzi* de triatomíneos para humanos (NOUVELLET et al., 2013). *Triatoma rubrovaria* tendeu a excretar mais tardiamente do que *T. infestans*; no entanto, o coeficiente GLM não foi estatisticamente significativo, provavelmente devido à grande variação de medidas para este parâmetro comportamental. Outro resultado discrepante entre as espécies foi observado para o parâmetro de eficiência de excreção, em que os resultados do GLM mostraram que *T. rubrovaria* é significativamente menos eficiente (OR = 0,53), mas os testes *W* não foram significativos (Tabelas 10 e 11). Nossos resultados diferiram de um trabalho anterior (LOZA-MURGUÍA & NOIREAU, 2010) que mostrou que *T. infestans* excretou durante o repasto sanguíneo cerca de cinco minutos antes de terminar a ingestão de sangue. No entanto, algumas diferenças nas configurações experimentais devem ser destacadas, da seguinte forma: (i) analisamos *T. infestans* infectado com *T. cruzi*, enquanto Loza-Murguia e Noireau (LOZA-MURGUÍA & NOIREAU, 2010) analisaram apenas amostras não infectadas; e (ii) cinco triatomíneos foram alimentados ao mesmo tempo em um único hospedeiro neste estudo (levando a algumas interrupções na alimentação de sangue), enquanto no outro trabalho eles individualizaram os vetores para se alimentarem do camundongo. Portanto, enfatizamos a importância de incluir uma espécie epidemiologicamente relevante em experimentos ao analisar uma espécie não-modelo para fins de comparação.

Os triatomíneos requerem numerosas alimentações de sangue para completar o seu ciclo de vida. Apesar de ser raro (DURÁN et al., 2016; RYCKMAN, 1951), coprofagia (ingestão de fezes), cleptohematofagia (sangue retirado do intestino de outro triatomíneo) e hemolinfagia (para ingerir hemolinfa de outros artrópodes) têm há muito tempo sido relatados por vários autores (JURBERG & GALVÃO, 2006). Já foi observado *T. circummaculata* e *T. rubrovaria* sugando a hemolinfa de baratas selvagens (*Blaptia dubia*) em pilhas de rochas naturais (LOROSA et al., 2000; RUAS-NETO et al., 2001). Ainda não está claro, no entanto, se a hemolinfa como a única fonte de alimento disponível é o suficiente para completar o seu ciclo de desenvolvimento. É importante destacar que em nosso estudo, em duas ocasiões, uma ninfa não alimentada perfurou o intestino para obter sangue de uma ninfa recentemente alimentada, além de ter sido observada em uma única vez uma ninfa se alimentando dos excrementos de outro indivíduo. Esses comportamentos foram observados enquanto a fonte de alimento (camundongos *Swiss webster*) estava sendo oferecida aos insetos. Pelo que sabemos, esses são



os primeiros relatos de coprofagia e cleptohematofagia em *T. rubrovaria*. Mesmo com a disponibilidade de fonte de alimento, as ninfas de quinto estágio se alimentaram do sangue presente em uma ninfa ingurgitada. Uma hipótese recente para este comportamento canibal é que a rápida ingestão de sangue quente do hospedeiro vertebrado pelo triatomíneo aumenta a temperatura corporal do inseto e, conseqüentemente, levando à atração de indivíduos não alimentados para obtenção de sangue (LAZZARI et al., 2018). Em um contexto epidemiológico, o canibalismo pode aumentar a possibilidade de ingestão do parasito e a sua posterior transmissão de inseto a inseto (SCHAUB, 1988).

Este trabalho contém algumas ressalvas que devem ser levadas em consideração ao interpretar nossos resultados. Primeiro, sempre haverá limitações no que os dados gerados em condições de laboratório podem revelar sobre o comportamento dos insetos no campo. Os insetos são submetidos em campo às oscilações ambientais diárias de luz, umidade e temperatura, bem como à agregação de vetores que pode moldar padrões de atividade diferentes daqueles observados em ambientes de laboratório (RIVAS et al., 2018; DEPICKÈRE et al., 2019; VANIN et al., 2012). Além disso, os insetos criados em laboratório podem perder a variabilidade genética observada no campo, provavelmente devido a endogamia e processos estocásticos, como efeitos fundadores e, portanto, não representam completamente as populações de campo (GÓMEZ-SUCERQUIA et al., 2009). Evidências convincentes com dados experimentais que suportam os impactos sobre o comportamento de insetos criados em condições de laboratório para muitas gerações são escassas. Embora haja uma redução no tamanho corporal e dimorfismo sexual de triatomíneos criados em laboratório, que pode refletir no aumento de densidade de vetores em pequenos recipientes e suprimento limitado de sangue (DUJARDIN et al., 1999), populações de insetos criadas em laboratório parecem exibir desempenho semelhante às populações de campo. Ross et al. (ROSS et al., 2019) observaram apenas mudanças insignificantes no tempo de desenvolvimento, sobrevivência até a idade adulta, fecundidade e proporção de eclosão dos ovos ao comparar populações de *Aedes aegypti* de 2ª e 22ª gerações. Em triatomíneos, Ortiz et al. (ORTIZ et al., 2011) observaram que espécimes de *R. prolixus* mantidos por mais de 30 anos alimentados com sangue de galinha foram atraídos por extratos de pele humana de forma semelhante que os insetos F1 fizeram. Experimentos envolvendo *T. rubrovaria* de campo (ou recentemente capturado em campo) em condições naturais ou semi-naturais devem ser

conduzidas para avaliar o impacto das condições de laboratório nos dados comportamentais.

Segundo, as infecções foram confirmadas e quantificadas por meio de observações diretas de tripanossomas nas excretas, e não por meio de ferramentas sensíveis como qPCR. Portanto, é possível que tenhamos detectado como positivos apenas triatomíneos com altas infecções. Apesar disso, acreditamos que esta limitação não interferiu nas comparações entre *T. rubrovaria* e *T. infestans*, provavelmente excluímos das análises os indivíduos com infecções baixas que podem ter resultados comportamentais diferentes. Terceiro, embora tenhamos usado uma cepa de *T. cruzi* isolado de um indivíduo de *T. infestans* coletado na mesma localidade dos espécimes de *T. rubrovaria* utilizados neste estudo, não há evidências de que a linhagem *T. cruzi* TcVI esteja infectando *T. rubrovaria* no campo. Até o momento, apenas indivíduos de *T. rubrovaria* infectados com *T. cruzi* TcI e TcIII foram capturados na região (MARTINEZ & ROSA, 2003; MARTINEZ, 2004; MARTINS, 2005; MARTINS et al., 2008; BRENIÈRE et al., 2016). Estudos de vigilância entomológica juntamente com infecções experimentais de *T. rubrovaria* com *T. cruzi* TcI e TcIII são necessárias para identificar as cepas de *T. cruzi* que circulam nesta espécie de vetor e os possíveis efeitos desta cepa do parasito sobre o comportamento de alimentação-excreção.

Quarto, analisamos os parâmetros de alimentação e de excreção em triatomíneos apenas em 30 dpi, quando o número de vetores com formas tripomastigotas em seus excrementos foi significativamente menor do que observada em 60 e 90 dpi. Portanto, se as mudanças comportamentais observadas aqui fossem resultado fenotípicos da infecção ou uma manipulação de triatomíneos pelo *T. cruzi* (RAMÍREZ-GONZÁLEZ et al., 2019), esperaríamos observar mudanças de comportamento mais significativas em 60 ou 90 dpi. Estudos moleculares e histológicos são abordagens úteis e necessárias para compreender os mecanismos subjacentes de possível manipulação comportamental (HUGHES & LIBERSAT, 2019). Por fim, resultados contraditórios quanto à influência da infecção do parasito no comportamento dos triatomíneos provavelmente estão associados à variação da cepa de *T. cruzi* ou linhagem genética usada em ensaios de infecção e em espécies de vetores testadas (GARCIA & AZAMBUJA, 1991). Além disso, diferenças nos ensaios experimentais também podem ter uma contribuição importante (PEREYRA et al., 2020). Portanto, existe uma necessidade urgente de padronizar as condições metodológicas em estudos futuros sobre aspectos comportamentais de insetos

parasitados para entender melhor o papel de cada tipo de *T. cruzi* nas alterações dos parâmetros comportamentais do vetor.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo Jansen e colaboradores (2015), os sistemas de interação parasito-hospedeiro e as estratégias de transmissão de *T. cruzi* na natureza são altamente complexos e multivariáveis. Existem numerosas espécies de triatomíneos que, por sua vez, são insetos generalistas, se nutrindo de diversas espécies de animais, formando uma rede de interação (JANSEN et al., 2018). Assim, os insetos e os mamíferos estão expostos constantemente à múltiplas infecções por *T. cruzi*, possibilitando a circulação das seis DTUs e aumentando as chances de coinfeções em uma escala espaço-temporal (JANSEN et al., 2015, 2018, 2020). O estudo da presença do parasito em reservatórios e vetores em seu habitat tem demonstrado que o nosso conhecimento acerca da ecologia de *T. cruzi* ainda é muito limitado (JANSEN et al., 2015).

Lent e Wygodzinsky (LENT & WYGODZINSKY, 1979) destacaram que embora a maioria dos triatomíneos seja vetores potenciais de *T. cruzi*, algumas condições devem ser cumpridas para incriminar uma espécie como "vetor efetivo" para humanos, tais como: (i) ampla distribuição geográfica, (ii) ser capaz de viver em habitações humanas, (iii) comportamento antropofílico e (iv) curto intervalo entre alimentação e excreção. *Triatoma rubrovaria* está restrito ao norte da Argentina, Uruguai e sul do Brasil (LENT & WYGODZINSKY, 1979) e embora haja uma invasão domiciliar e peridomiciliar crescente de *T. rubrovaria* (ALMEIDA et al., 2000; SILVEIRA & MARTINS, 2014), não há evidência consistente de colonização intradomiciliar, uma vez que apenas algumas ninfas foram capturadas dentro de habitações (ALMEIDA et al., 2000). Juntos, esses aspectos bionômicos enfatizam os achados epidemiológicos de que *T. infestans* estabeleceu colônias maiores no sul do Brasil e provavelmente deslocou *T. rubrovaria* dos peridomicílios. No entanto, a semelhança entre essas espécies quanto às taxas de infecção e metaciclogênese por *T. cruzi* TcVI em condições de laboratório e quanto ao comportamento de alimentação-excreção suscitam preocupações epidemiológicas. A eliminação "virtual" de *T. infestans* provavelmente desencadeou um processo de recolonização de habitats modificados por humanos, pelas espécies nativas (SILVEIRA & MARTINS, 2014), como observado para outras espécies autóctones, como *T. brasiliensis* e *P. megistus* no nordeste e sudeste do Brasil (PEREIRA et al., 2006); e,

portanto, *T. rubrovaria* deve ser mantido sob constante vigilância entomológica no Rio Grande do Sul.

## 7 CONCLUSÕES

- A taxonomia molecular baseada no alvo Cyt b possibilitou agrupar amostras do subcomplexo *T. rubrovaria* nos clados correspondentes às sequências-referência: *T. rubrovaria*, *T. carcavalloii* e *T. circummaculata*.
- Há baixa divergência entre as sequências das espécies do subcomplexo *T. rubrovaria* e muitas sequências formaram clados não identificados.
- Por conta da sobreposição entre os valores de divergência intra e interclados, faz-se necessário analisar no nível genômico das espécies do subcomplexo para definir suas classificações taxonômicas.
- Confirmamos o ecletismo alimentar das espécies pertencentes ao subcomplexo *T. rubrovaria* e observamos alto grau de antropofilia.
- A taxa de infecção natural por *T. cruzi* foi superior em *T. rubrovaria*, seguido de *T. circummaculata*, *T. carcavalloii* e *Triatoma* sp.
- Ampla variação de carga parasitária nas amostras kDNA-positivas foi observada, sendo a maior carga em *T. rubrovaria*.
- A DTU predominante nas amostras analisadas foi a TcI, seguida de TcI + IV e TcV.
- A coinfeção por duas DTUs de *T. cruzi* (TcI + IV) foi observada em uma amostra, demonstrando a complexidade da dinâmica de transmissão do parasito na natureza.
- Sugere-se que a infecção experimental por *T. cruzi* TcVI alterou o comportamento alimentar de *T. rubrovaria*, tendo sido capazes de ingerir mais sangue comparados aos não infectados e picarem com mais frequência a cabeça do camundongo.
- Apesar de uma menor porcentagem de *T. rubrovaria* ter defecado logo após a alimentação de sangue e do menor volume de sangue ingerido quando comparado ao *T. infestans*, essas espécies de vetores apresentaram perfis de infecção e taxas de tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* TcVI semelhantes em seus excrementos, além de compartilharem pontuações semelhantes para a maioria dos parâmetros de excreção e de alimentação analisados em condições de laboratório.
- O encontro de *T. rubrovaria* próximo aos domicílios se alimentando de humanos e os dados obtidos no presente estudo enfatizam a importância epidemiológica desta espécie no território gaúcho, merecendo devida atenção pelas autoridades de saúde.

## 8 PERSPECTIVAS

- Finalizar a taxonomia molecular dos insetos vetores do Rio Grande do Sul que não tiveram as suas espécies identificadas e, quiçá análises no nível genômico.
- Padronizar e validar a metodologia de identificação molecular da microbiota presente em insetos de campo do subcomplexo *T. rubrovaria* e correlacionar com a infecção por *T. cruzi*.
- Notificar à Secretaria de Saúde do Rio Grande do Sul sobre os dados obtidos no presente estudo para que sejam elaborados planos estratégicos de medidas de controle da doença de Chagas.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH F, FERRAZ G, CAMPOS C, PALOMEQUE FS, GRIJALVA MJ, AGUILAR MH, MILES MA. 2010. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. *PLoS Negl Trop Dis.*; 4:e620.

ABAD-FRANCH F, CELESTE VM, RÓLON MS, SANTOS WS, DE ARIAS AR. 2011. Community Participation in Chagas Disease Vector Surveillance: Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.*; 5(6): e1207.

ABAD-FRANCH F, PAVAN MG, JARAMILLO-O N, PALOMEQUE FS, DALE C, CHAVERRA D, MONTEIRO FA. 2013. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108(1):92–9.

ABALOS JW, WYGODZINSKY P. 1951. Las Triatominae argentinas (Reduviidae, Hemiptera). *An Inst Med Reg Monogr* 2.

AFONSO MM, DUARTE R, MIRANDA JC, CARANHA L, RANGEL EF. 2012. Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *J Trop Med.*

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. 2002; Manipulating Proteins, DNA, and RNA. In: *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland Science; 8:469-546.

ALEVI KCC, GUERRA AL, IMPERADOR CHL, JURBERG J, MOREIRA FFF, OLIVEIRA MTV. 2017. Mitochondrial Gene Confirms the Specific Status of *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha, and Rocha, 2013 (Hemiptera, Triatominae), an Endemic Species in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1):200–201.

ALEVI KCC, DE OLIVEIRA J, GARCIA ACC, CRISTAL DC, DELGADO LMG, DE FREITAS BITTINELLI I, DOS REIS YV, RAVAZI A, DE OLIVEIRA ABB, GALVÃO C, DE AZEREDO-OLIVEIRA MTV, MADEIRA FF. 2020. *Triatoma rosai* sp. nov. (Hemiptera, Triatominae): A New Species of Argentinian Chagas Disease Vector Described Based on Integrative Taxonomy. *Insects* 11, 830.

ALMEIDA CE, VINHAES MC, DE ALMEIDA JR, SILVEIRA AC, COSTA J. Monitoring the domiciliary and peridomiciliary invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95(6):761–8.

ALMEIDA CE, DUARTE R, DO NASCIMENTO RG, PACHECO RS, COSTA J. 2002a. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(8):1127–31.

ALMEIDA CE, PACHECO RS, NOIREAU F, COSTA J. 2002b. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) I: Isoenzymatic and Chromatic Patterns of Five Populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.* 97(6): 829-834.

ALMEIDA CE, FRANCISCHETTI CN, PACHECO RS, COSTA J. 2003. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*; 98(3):367–71.



ALMEIDA CE, FOLLY-RAMOS E, AGAPITO-SOUZA R, MAGNO-ESPERANÇA G, PACHECO RS, COSTA J. 2005. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector capacity of nymphs. Mem Inst Oswaldo Cruz.100(3):231–5.

ALMEIDA CE, PACHECO RS, HAAG K, DUPAS S, DOTSON E, COSTA J. 2008. Inferring from the cyt B gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Genetic structure and domiciliary infestation in the state of Paraíba, Brazil. Am J Trop Med Hyg 78: 791-802.

ALMEIDA CE, LIMA MM, COSTA J. Ecologia dos vetores. In: GALVÃO, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, pp. 210- 235. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6.

AMORIM M. 2002. Fundamentos de sistemática filogenética. Holos Editora, Riberão Preto, 136p.

ANDRADE LO, MACHADO CR, CHIARI E, MACEDO AM. 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. Exp Parasitol; 100: 269-275.

ANGULO VM, SANDOVAL CM. 2001. Triatomins y Programa Nacional de Control en Colombia. Serie Enfermedades Transmisibles. Monitoreo de la resistencia a insecticidas en triatomins en América Latina. Fundación Mundo Sano 1: 21-26.

APPLIED BIOSYSTEMS. 2002. Disponível em: <<https://genome.med.harvard.edu/documents/qpcr/TaqManAssayUniversalMixProtocol.pdf>>. Acessado em: 06/01/2021.

APT W, CARRASCO D, FUENTEALBA C, CANALS M, MUÑOZ G, SAAVEDRA M, CASTILLO JP, ZULANTAY I. 2019. Chronic Chagas disease: Quantification of *Trypanosoma cruzi* in peripheral blood and dejections of *Triatoma infestans* fed by xenodiagnosis in patients with and without cardiopathy. Acta Trop. Dec; 200:105167.

ARAUJO CA, WANIEK PJ, JANSEN AM. 2008. Development of a *Trypanosoma cruzi* (TcI) isolate in the digestive tract of an unfamiliar vector, *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae). Acta Trop; 107: 195–199.

ARAUJO RN, SOARES AC, PAIM RM, GONTIJO NF, GONTIJO AF, LEHANE MJ, ET AL. 2009. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). Insect Biochem Mol Biol. 39(2):83–9.

ARAÚJO RN, PEREIRA MH, SOARES AC, PEREIRA ID, DIOTAIUTI L, GONTIJO NF, ET AL. 2009. Effect of intestinal erythrocyte agglutination on the feeding performance of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). J Insect Physiol. 55(9):862–8.

ARAÚJO CAC, WANIEK PJ, XAVIER SCC, JANSEN AM. 2011. Genotype variation of *Trypanosoma cruzi* isolates from different Brazilian biomes. Experimental Parasitology, 127(1):308–312.

ARAÚJO CA, WANIEK PJ, JANSEN AM. 2014. TcI/TcII co-infection can enhance *Trypanosoma cruzi* growth in *Rhodnius prolixus*. Parasit Vectors; 7: 94.

ARGOLO AM, FELIX M, PACHECO R, COSTA J. 2008. Doença de Chagas e seus vetores no Brasil In: Ação comemorativa do centenário de descoberta da doença de chagas. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio.

- ASSIS GFM, AZEREDO BVM, DE LA FUENTE ALC, DIOTAIUTI L, DE LANA M. 2007. Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa e Espínola 1964) in the Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [online]., 40(4):391-396.
- AVILA HA, SIGMAN DS, COHEN LM, MILLIKAN RC, SIMPSON L. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. Mol. Biochem. Parasitol.;48(2):211-221.
- AVILA HA, PEREIRA JB, THIEMANN O, DE PAIVA E, DEGRAVE W, MOREL CM ET AL. 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by Polimerase chain reaction amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparasion with serologic and xenodiagnosis. Journal of Clinical Microbiology; 31(9):2421–26.
- AZAMBUJA P, RATCLIFFE NA, GARCIA ES. 2005. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. Anais Acad. Bras. Ciências, 77:397–404.
- BACIGALUPO A, SEGOVIA V, GARCÍA A, BOTTO-MAHAN C, ORTIZ S, SOLARI A ET AL. 2012. Differential Pattern of Infection of Sylvatic Nymphs and Domiciliary Adults of *Triatoma infestans* with *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Chile. Am. J. Trop. Med. Hyg.; 87(3):473–480.
- BARGUES MD, SCHOFIELD C, DUJARDIN JP. 2017. Classification and Systematics of the Triatominae, in: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research (second edition), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 113-143.
- BARRETT MP, BURCHMORE RJ, STICH A, LAZZARI JO, FRASCH AC, CAZZULO JJ, KRISHNA S. 2003. The trypanosomiasis. Lancet.;362(9394):1469-80.
- BARONA-VILAR C, GIMÉNEZ-MARTÍ M, FRAILE T, GONZÁLEZ-STEINBAUER C, PARADA C, GILBRUSOLA A, BRAVO D, et al. 2012. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant Latin American women and congenital transmission rate in a non-endemic area: The experience of the Valencian Health Programme (Spain). Epidemiology and Infection, 140(10): 1896-1903.
- BENGTSSON M, KARLSSON JH, WESTMAN G, KUBISTA M. 2003. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. Nucleic Acids Research; 31:45.
- BENJAMINI Y, YEKUTIELI D. 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. Ann Statist.; 29:1165–88.
- BENNETT KE, OLSON KE, MUÑOZ ML, FERNANDEZ-SALAS I, FARFAN-ALE JA, HIGGS S, BLACK WC, BEATY BJ. 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. Am. J. Trop. Med. Hyg., 67(1):85-92.
- BIZAI ML, ROMINA P, ANTONELA S, OLIVERA LV, ARIAS EE, JOSEFINA DC, SILVIA M, WALTER S, DIANA F, CRISTINA D. 2020. Geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes detected in chronic infected people from Argentina. Association with climatic variables and clinical manifestations of Chagas disease. Infect Genet Evol. Mar; 78:104128.
- BLANDÓN-NARANJO M, ZURIAGA MA, AZOFEIFA G, ZELEDÓN R, BARGUES MD. 2010. Molecular evidence of intraspecific variability in different habitat-related populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Costa Rica. Parasitol Res.;106(4):895-905.

- BOAKYE DA, TANG J, TRUC P, MERRIWEATHER A, UNNASCH TR. 1999. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Med Vet Entomol* 13:282–287.
- BONNEY KM. 2014. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite*. 21:11.
- BOTTO-MAHAN C, CATTAN PE, MEDEL R. 2006. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Trop*. 98(3):219–23.
- BOTTO-MAHAN C. 2009. *Trypanosoma cruzi* induces life-history trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: implications for parasite transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 9(5):505–10.
- BOUCKAERT R, VAUGHAN TG, BARIDO-SOTTANI J, DUCHÊNE S, FOURMENT M, GAVRYUSHKINA A, HELED J, JONES G, et al. 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput Biol*. 8;15(4):e1006650.
- BRENER Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 4:389–96.
- BRENER Z. 1971. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*; 13: 171–78.
- BRENER Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol*; 27:347-82.
- BRENIERE SF, BOSSENO MF, TELLERIA J, CARRASCO R, VARGAS F, YAKSIC N, ET AL. 1995. Field application of Polymerase Chain Reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg*; 53(2):179-84.
- BRENIÈRE SF, WALECKX E, BARNABÉ C. 2016. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(8):e0004792.
- BRICEÑO-LEÓN R. 1990. La Casa Enferma: Sociología de la Enfermedad de Chagas / The sick house: Sociology of the Chagas Diseases. Caracas; Fondo Editorial Acta Científica de Venezuela; 149 p.
- BRITO CM, LIMA MM, SARQUIS O, PIRES MQ, COUTINHO CF, DUARTE R ET AL. 2008. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer–polymerase chain reaction. *Parasitol Res*; 103:1111–1117.
- BRITTO C, CARDOSO MA, WINCKER P, MOREL CM. 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.; 88:171-172.
- BRITTO C, CARDOSO MA, RAVEL C, SANTORO A, PEREIRA JB, COURA JR ET AL. 1995. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from Northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradiative hybridization. *Exper Parasit*; 81(4):462-71.
- BRITTO C, SILVEIRA C, CARDOSO MA, MARQUES P, LUQUETTI A, MACÊDO V ET AL. 2001. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 96:823-826.

- BRITTO C. 2009. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 104(1):102-135.
- BRUCE P, BRUCE A. *Practical Statistics for Data Scientists*: O'Reilly Media; 2017.
- BUA J, VOLTA BJ, VELAZQUEZ EB, RUIZ AM, RISSIO AM, CARDONI RL. 2012. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 106:623– 628.
- BUEKENS P, CAFFERATA ML, ALGER J, ALTHABE F, BELIZÁN JM, BUSTAMANTE N, CARLIER Y, CIGANDA A, DEL CID JH, DUMONTEIL E, et al. 2018. For The Congenital Chagas Working Group. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: An Observational Prospective Study. *Am J Trop Med Hyg.*; 98(2):478-485.
- BULLERWELL CE, GRAY MW. 2004. Evolution of the mitochondrial genome: Protist connections to animals, fungi and plants. *Curr Opin Microbiol* 7: 528–534
- BURGOS JM, DIEZ M, VIGLIANO C, BISIO M, RISSO M, DUFFY T ET AL. 2010. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. *Clin. Infect.Dis.*; 51(5):485–495.
- BURNHAM KP, ANDERSON DR. *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. 2 ed. New York 2002.
- CAMARGO ME, SILVA GR, CASTILHO E, SILVEIRA AC. 1984. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica, Brasil, 1975/1980. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 26:192-204.
- CAMPOS-SOTO R, DÍAZ-CAMPUSANO G, QUIROGA N, MUÑOZ-SAN MARTÍN C, RIVES-BLANCHARD N, TORRES-PÉREZ F. 2020. *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines and rodents co-occur in a coastal island of northern Chile. *PeerJ*, 8:e9967.
- ČANDEK K, KUNTNER M. 2015. DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. *Mol Ecol Resour.* 15(2):268-77.
- CANTILLO-BARRAZA O, GARCÉS E, GÓMEZ-PALACIO A, CORTÉS LA, PEREIRA A, MARCET PL, ET AL. 2015. Eco-epidemiological study of an endemic Chagas disease region in northern Colombia reveals the importance of *Triatoma maculata* (Hemiptera: Reduviidae), dogs and *Didelphis marsupialis* in *Trypanosoma cruzi* maintenance. *Parasites & Vectors*; 8:482.
- CARRANZA JC, VALADARES HMS, D'ÁVILA DA, BAPTISTA RP, MORENO M, GALVÃO LMC, et al. 2009. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol*; 39:963–973.
- CARCAVALLO RU, JURBERG J, LENT H, GALVÃO C, STEINDEL M, PINTO CJC. 2001. A New Species of the *oliveirai* Complex (New Designation for matogrossensis Complex) from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 96(1):71-79.
- CARDINAL MV, LAURICELLA MA, CEBALLOS LA, LANATI L, MARCET PL, LEVIN MJ, ET AL. 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int. J. Parasitol*; 38:1533–1543.
- CARDOZO-DE-ALMEIDA MAR. Estudos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais em cinco espécies do gênero *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) incluindo a biologia

de *Triatoma carcavalloei*. [Dissertação]. [Rio de Janeiro]: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro 2007; 102 p.

CARDOZO-DE-ALMEIDA M, NEVES SCT, DE ALMEIDA CE, DE LIMA NRC, DE OLIVEIRA MLR, DOS SANTOS-MALLET JR, ET AL. 2014. Biology of *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent, 1998 under laboratory conditions. Rev Soc Bras Med Trop; 47(3):307-312.

CARLIER Y, TRUYENS C. Maternal-Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*. 2017. American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition, First Edition. Elsevier Inc.

CARVALHO-MOREIRA CJ, SPATA MCD, COURA JR, GARCIA ES, AZAMBUJA P, GONZALES MS, ET AL. 2003. In vivo and in vitro metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomine vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short/long-term and comparative study. Exp. Parasitol., 103:102–111.

CASTRO DP, MORAES CS, GONZALEZ MS, RATCLIFFE NA, AZAMBUJA P, GARCIA ES. 2012. *Trypanosoma cruzi* immune response modulation decreases microbiota in *Rhodnius prolixus* gut and is crucial for parasite survival and development. PLoS ONE, 7(5):e36591.

CDC 2018. Disponível: < [https://www.cdc.gov/malaria/malaria\\_worldwide/reduction/dx\\_microscopy.html](https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/dx_microscopy.html)>. Acessado em: 28/01/2021.

CDC 2019. Disponível: < <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>. Acessado em: 28/01/2021.

CEBALLOS LA, PICCINALI RV, MARCET PL, VAZQUEZ-PROKOPEC GM, CARDINAL MV, SCHACHTER-BROIDE J, DUJARDIN JP, DOTSON EM, KITRON U, GÜRTLER RE. 2011. Hidden sylvatic foci of the main vector of Chagas disease *Triatoma infestans*: threats to the vector elimination campaign? PLoS Negl Trop Dis 5, e1365.

CECERE MC, CASTAÑERA MB, CANALE DM, CHUIT R, GÜRTLER RE. 1999. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans* and other triatomines: long-term effects of a control program in a rural area of northwestern Argentina. Pan Am J Publ Health 5:392-399.

CERISOLA JA, ROHWEDDER R, BOZZINI JP, DEL PRADO CE. 1971. *Blastocrithidia triatoma* n. sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. The Journal of Protozoology; 18:503–506.

CHAGAS C. 1909. Nova tripanossomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz; 1:159-218.

CHAPMAN MD, BAGGALEY RC, GODFREYFAUSSET PF, MALPAS TJ, WHITE G, CANESE J, MILES MA. 1984. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco – isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. J. Protozool.; 31:482–486.

CHIURILLO MA, CRISANTE G, ROJAS A, PERALTA A, DIAS M, GUEVARA P, ANEZ N, RAMIREZ JL. 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on the telomeric sequences. Clin. Diagn. Lab. Immunol.; 10(5):775–779.

CHOW E, WIRTZ RA, SCOTT TW. 1993. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J. Am. Mosq. Control. Assoc., 9(2): 196-205.

- CLAYTON C. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J*; 21:1881-8.
- CALLEROS L., PANZERA F, BARGUES MD, MONTEIRO FA, KLISIEWICZ DR, ZURIAGA MA, MASCOMA S, PEREZ R. 2010. Systematics of *Mepraia* (Hemiptera-Reduviidae): cytogenetic and molecular variation. *Infect Genet Evol* 10, 221-228.
- COLLEY DG. 2000. Parasitic diseases: opportunities and challenges in the 21st century. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 95(1):79–87.
- CONNERS EE, VINETZ JM, WEEKS JR, BROUWER KC. 2016. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Trop.*; 156: 68–78.
- CORDERO-MONTOYA G, FLORES-VILLEGAS AL, SALAZAR-SCHETTINO PM, VENCES-BLANCO MO, ROCHA-ORTEGA M, GUTIÉRREZ-CABRERA AE, ROJAS-ORTEGA E, CÓRDOBA-AGUILAR A. 2019. The cost of being a killer's accomplice: *Trypanosoma cruzi* impairs the fitness of kissing bugs. *Parasitol Res*. 118(9):2523–9.
- CORONADO X, ZULANTAY I, REYES EDUARDO, APT W, VENEGAS J, RODRIGUEZ J, ET AL. 2006. Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic Chagas disease *Acta Tropica*; 98:314–317.
- CORTEZ MG, GONZALEZ MS, CABRAL MM, GARCIA ES, AZAMBUJA P. 2002. Dynamic development of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*: role of decapitation and ecdysone therapy. *Parasitol Res*. Jul;88(7):697-703.
- COSTA DE ALBUQUERQUE MA, DIAS DM, VIEIRA LT, LIMA CA, DA SILVA AM. 2017. Mortality Trends for Neglected Tropical Diseases in the State of Sergipe, Brazil, 1980–2013. *Infect Dis Poverty*. 6(1):20.
- COSTA J, ALMEIDA CE, DOTSON EM, LINS A, VINHAES M, SILVEIRA AC, BEARD CB. 2003. The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:443-449.
- COSTA J, LORENZO M. 2009. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 104 (I): 46-51.
- COUTINHO CFS, SOUZA-SANTOS R, TEIXEIRA NFD, GEORG I, GOMES TF, BOIA MN, REIS NB, MAIA AO, LIMA MM. 2014. An entomoepidemiological investigation of Chagas disease in the state of Ceará, Northeast Region of Brazil. *Cad. Saúde Pública*; 30(4):785-793.
- COULSON RM, CURTIS CF, READY PD, HILL N, SMITH DF. 1990. Amplification and analysis of human DNA present in mosquito bloodmeals. *Med. Vet. Entomol*, 4(4):357-66.
- COURA JR, MOREIRA CJC, JUNQUEIRA ACV. 2005. Disponível em <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&view=download&alias=823-curso-capacitacao-para-deteccao-do-trypanossoma-cruzi-modulo-i-3&category\\_slug=capacitacao-deteccao-trypanossoma-cruzi-193&Itemid=965](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=823-curso-capacitacao-para-deteccao-do-trypanossoma-cruzi-modulo-i-3&category_slug=capacitacao-deteccao-trypanossoma-cruzi-193&Itemid=965)>. Acessado em: 03/01/2021.
- COURA JR, BORGES-PEREIRA J. 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.*, 115:5-13.
- COURA JR, VIÑAS PA. 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*; 465: S6–S7.

- COUTINHO CFS, SOUZA-SANTOS R, TEIXEIRA NFD, GEORG I, GOMES TF, BOIA MN, et al. 2014. An entomoepidemiological investigation of Chagas disease in the state of Ceará, Northeast Region of Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 30(4), 785–793.
- COUTINHO CBD. Taxonomia integrada de espécies de *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. 2017. 100 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Saúde). Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.
- DAMBORSKY MP, BAR ME, GORLA D. 2005. Life cycle and reproductive patterns of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) under constant and fluctuating conditions of temperature and humidity. *Rev Soc Bras Med Trop*. 38(5):433–7.
- DANABALAN R, MONAGHAN MT, PONSONBY DJ, LINTON YM. 2014. Occurrence and host preferences of *Anopheles maculipennis* group mosquitoes in England and Wales. *Med.Vet.Entomol*. 28,169–178.
- DARRIBA D, TABOADA GL, DOALLO R, POSADA D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 30;9(8):772.
- DA SILVA VALENTE AS, VALENTE VC, NETO HF. 1999. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 94(1):395-8.
- D’ALESSANDRO-BACIGALUPO A, SARAIVA NG. 1992. *Trypanosoma rangeli*, p. 1–54. In J. P. KREIER AND J. R. BAKER (ed.), *Parasitic protozoa*, vol. 2. Academic Press, New York, N.Y.
- D’ÁVILA DA, GALVÃO LMC, SOUSA GR, BRITTO C, MOREIRA OC, CHIARI E. 2018. Monitoring the parasite load in chronic Chagas disease patients: comparison between blood culture and quantitative real time PCR. *PLoS One*. 13(11):e0208133.
- DEANE MP, LENZI HL, JANSEN AM. 1984. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 79: 513–5.
- DE FREITAS VLT, DA SILVA SCV, SARTORI AM, BEZERRA RC, WESTPHALE EVN, MOLINA TD, TEIXEIRA ARL, IBRAHIM KY, SHIKANAI-YASUDA, M.A. 2011. Real-Time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* Coinfection with and without Chagas Disease Reactivation: Association with HIV Viral Load and CD4+ Level. 8thed. *PLoS Negl. Trop.*; 5:e1277.
- DE GEER C. 1773. *Memoires pour servir a l’histoire des insectes*. Tome III. Pierrer Hesselberg, Stockholm. 696 pp.
- DEGRAVE, W, FRAGOSO SP, BRITTO C, HEUVERSWYN HV, KIDANE GZ, CARDOSO MA, MUELLER RU, SIMPSON L, MOREL CM. 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*; 27:63-70.
- DE LA RUA N, STEVENS L, DORN PL. 2011. High genetic diversity in a single population of *Triatoma sanguisuga* (LeConte, 1855) inferred from two mitochondrial markers: Cytochrome b and 16S ribosomal DNA. *Infect Genet Evol* 11, 671-677.
- DEL PONTE E. 1930. Catálogo descriptivo de los géneros *Triatoma* Lap., *Rhodnius* Stål, e *Eratyrus* Stål. *Revista del Instituto Bacteriologico del Departamento Nacional de Higiene*, Buenos Aires, 5:855-937.
- DEPICKÈRE S, RAMÍREZ-ÁVILA GM, DENEUBOURG JL. 2019. Alteration of the aggregation and spatial organization of the vector of Chagas disease, *Triatoma infestans*, by the parasite *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep*. 9(1):17432.

- DE SOUZA W. 2002. From the Cell Biology to the Development of New Chemotherapeutic Approaches Against Trypanosomatids: Dreams and Reality. *Kinetop Biol Dis*; 1:3-24.
- DE SOUZA W. 2010. *Doenças negligenciadas*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- DIAS JCP. 1991. O controle da doença de Chagas no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 24(2):201-202.
- DIAS JCP, COURA JR. *Clinica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997.
- DIAS JCP. 2000. Vigilância epidemiológica em doença de Chagas. *Cad. Saúde Pública*; 16(2):43-59.
- DIAS JCP, SILVEIRA AC, SCHOFIELD CJ. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97(5):603–12.
- DIAS JCP. 2007. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Oct;102 Suppl 1:11-8.
- DIAS JCP, BASTOS C, ARAÚJO E, MASCARENHNAS AV, MARTINS NE, GRASSI F, SILVA M, TATTO E, MENDONÇA J, ARAÚJO RF, SHIKANAI-YASUDA MA, ARAS R. 2008. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 41(3).
- DIAS JCP, AMATO NETO V. 2011. Prevention concerning the different alternative routes for transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 44(2): 68–72.
- DIAS JCP, BORGES-PEREIRA J, MACEDO VO. *Doenças de Chagas*. In: Coura, J.R. (Ed.), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- DIAS FA, GUERRA B, VIEIRA LR, PERDOMO HD, GANDARA ACP, DO AMARAL RJV, ET AL. 2016. Monitoring the parasite load in the digestive tract of *Rhodnius prolixus* by combined qPCR analysis and imaging techniques provides new insights into trypanosome life cycle. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(10):e0004186.
- DIAZ C, NUSSENZWEIG V, GONZALEZ A. 1992. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg.*; 46(5): 616-623.
- DIAZ S, VILLAVICENCIO B, CORREIA N, COSTA J, HAAG KL. 2016. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & Vectors*, 9:636, 11.
- DÍAZ-ALBITER HM, FERREIRA TN, COSTA SG, RIVAS GB, GUMIEL M, CAVALCANTE DR, PAVAN MG, GONZALEZ MS, ET AL. 2016. Everybody loves sugar: first report of plant feeding in triatomines. *Parasit Vectors*; 9:114.
- DÍAZ S, VILLAVICENCIO B, CORREIA N, COSTA J, HAAG KL. 2016. Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & Vectors*, 9:636, 11p.
- DI PRIMIO R. 1957. Atual distribuição geográfica dos triatomíneos e seus índices de infecção no Rio Grande do Sul. *Anais da Faculdade de Medicina de Porto Alegre* 17:17-37.



- DI PRIMIO R. 1962. Variações cromáticas do *Neotriatoma circummaculata* (Stål, 1859). Rev Fac Med Porto Alegre 21: 16-19.
- DORN PL, ENGELKE D, RODAS A, ROSALES R, MELGAR S, BRAHNEY B. 1999. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. Am J Trop Med Hyg.; 60 (5):740-5.
- DORN PL, JUSTI SA, DALE C, STEVENS L, GALVÃO C, CORDON RL, MONROY C. 2018. Description of *Triatoma mopan* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from a cave in Belize. Zookeys, 775:69-95.
- DOS SANTOS JP, DA SILVA R, RICARDO-SILVA AH, VERLY T, BRITTO C, EVANGELISTA BBC, ET AL. 2020. Assessing the entomo-epidemiological situation of Chagas disease in rural communities in the state of Piauí, Brazilian semi-arid region. Trans R Soc Trop Med Hyg. 114(11):820-829.
- DUFFY T, BISIO M, ALTICHEH J, BURGOS JM, DIEZ M, LEVIN MJ, ET AL. 2009. Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. PLoS Negl Trop Dis; 3(4):e419.
- DUJARDIN JP; PANZERA F, SCHOFIELD CJ. 1999. Triatominae as a model to morphological plasticity under ecological pressure. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94:223-228.
- DURÁN P, SIÑANI E, DEPICKÈRE S. 2016. On triatomines, cockroaches and haemolymphagy under laboratory conditions: new discoveries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 111(10):605–13.
- DVORAK JA, HARTMAN DL, MILES MA. 1980. *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. J. Protozool., 27:472–474.
- DWORAK ES, ARAÚJO SM, GOMES ML, MASSAGO M, FERREIRA E, TOLEDO MJO. 2017. Sympatry influence in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with triatomine. Rev Soc Bras Med Trop. 50(5):629–37.
- EDGAR RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 19;32(5):1792-7.
- EDRISSIAN GH, HAFISI A. 1982. Aplicação de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of *Anopheles* mosquito bloodmeals. Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg,76(1):54-56.
- ELIAS MC, VARGAS N, ZINGALES B, SCHENKMAN S. 2003. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol; 129:1–9.
- ELIAS MC, VARGAS N, TOMAZI L, PEDROSO A, ZINGALES B, SCHENKMAN S, ET AL. 2005. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. Mol Biochem Parasitol; 140:221–227.
- ELLIOT SL, RODRIGUES JEO, LORENZO MG, MARTINS-FILHO OA, GUARNERI AA. 2015. *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease, is virulent to its triatomine vector *Rhodnius prolixus* in a temperature-dependent manner. PLoS Negl Trop Dis. 9(3):e0003646.
- ENRIQUEZ GF, BUA J, OROZCO MM, WIRTH S, SCHIJMAN AG, GÜRTLER RE, CARDINAL MV. 2014. High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. Infection, Genetics and Evolution, 25:36–43.

- ESTAY-OLEA D, CORREA JP, DE BONA S, BACIGALUPO A, QUIROGA N, SAN JUAN E, ET AL. 2020. *Trypanosoma cruzi* could affect wild triatomine approaching behaviour to humans by altering vector nutritional status: A field test. *Acta Trop.* 210:105574.
- ESTRADA-PEÑA A, OSÁCAR JJ, PICHON B, GRAY JS. 2005. Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in north-central Spain. *Exp. Appl. Acarol.*, 37:257-268.
- FERNANDES, CD, TIECHER, FM, BALBINOT, MM, LIARTE, DB, SCHOLL, D, STEINDEL, M, & ROMANHA, A. 2009. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), 27-32.
- FERREIRA ILM, SILVA TPT. 2006. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39(5):507-509.
- FERRIS SD, SAGE RD, PRAGER EM, RITTE U, WILSON AC. 1983. Mitochondrial DNA evolution in mice. *Genetics* 105:681-721.
- FELLET MR, LORENZO MG, ELLIOT SL, CARRASCO D, GUARNERI AA. 2014. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. *PLoS One.* 9(8):e105255.
- FIGUEIREDO RC, ROSA DS, SOARES MJ. 2000. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *The Journal of parasitology.* 86(6):1213–8.
- FIGUEROA AI, SANTOS RHB, OLIVEIRA JL, LOURENÇO-FILHO DD, DIAS RR, OLIVEIRA AS, et al. 2011. Heart transplantation in 107 cases of Chagas' disease. *Transpl Proc.* 43:220–4.
- FITZPATRICK S, FELICIANGELI MD, SANCHEZ-MARTIN MJ, MONTEIRO FA, MILES MA. 2008. Molecular Genetics Reveal That Silvatic *Rhodnius prolixus* Do Colonise Rural Houses. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2(4):1-16.
- FORATTINI O. 1973. *Entomologia Médica São Paulo*: Edgard Blucher, Universidade de São Paulo, 4.
- FORATTINI OP. 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Pública.* 14:265-99.
- FORATTINI OP. 1992. *Ecologia, epidemiologia e sociedade*. Artes Médicas, São Paulo.
- FOX J, WEISBERG S. *An R Companion to Applied Regression*. 3 ed: Sage Publications; 2019.
- FREITAS SPC, FREITAS ALC, PRAZERES SM, GONCALVES TCM. 2004. Influência de hábitos antrópicos na dispersão de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, através de *Mimosa tenuiflora* (Willdenow) (Mimosaceae) no Estado do Ceará, Brasil. *Cad Saude Publ* 20:333-336.
- GALVÃO C. 2003. A sistemática dos triatomíneos (hemiptera, reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomol. Vect.* – ISSN 0328-0381.
- GALVAO, C. 2014. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. 88-170.
- GALVAO C, GURGEL-GONÇALVES R. 2014. Vetores conhecidos no Brasil. In: GALVAO, C. Vetores da doença de Chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. 88-170.

- GARCIA ES, AZAMBUJA P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 7(9):240–4.
- GARCIA ES, GONZALEZ MS, FLAWIA HM, AZAMBUJA P. 1993. Development and interaction of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector: some facts and ideas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88:11–12.
- GARCÍA BA, MANFREDI C, FICHERA L, SEGURA EL. 2003. Short report: variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68:692–694.
- GARCIA ES, RATCLIFFE NA, WHITTEN MM, GONZALEZ MS, AZAMBUJA P. 2007. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* – *Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.*, 53:11–21.
- GAUNT M, MILES M. 2000. The ecotypes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95:557-565.
- GIORDANO R, CORTEZ JCP, PAULK S, STEVENS L. 2005. Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 753-760.
- GRAY MW, LANG BF, BURGER G. 2004. Mitochondria of protists. *Annu. Rev. Genet.* 38, 477-524.
- GRIJALVA MJ, TERÁN D, DANGLES O. 2014. Dynamics of Sylvatic Chagas Disease Vectors in Coastal Ecuador Is Driven by Changes in Land Cover. *PLOS Negl Trop Dis.*; 8(6): e2960.
- GRISARD EC, STEINDEL M, GUARNERI AA, EGER-MANGRICH I, CAMPBELL DA, ROMANHA AJ. 1999. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 94: 203-209.
- GUARNERI AA, DIOTAIUTI L, GONTIJO NF, GONTIJO AF, PEREIRA MH. 2000. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *J Insect Physiol.* 46(7):1121–7.
- GUARNERI AA, LORENZO MG. 2017. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. *J Insect Physiol.* 97:66–76.
- GUHL F, VALLEJO GA. 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(4), 435-442.
- GURGEL-GONÇALVES R, RAMALHO ED, DUARTE MA, PALMA ART, ABAD-FRANCH F, CARRANZA JC, ET AL. 2004. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*; 46(6):323-330.
- GURGEL-GONÇALVES R, GALVÃO C, COSTA J, PETERSON AT. 2012. Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. *Journal of Tropical Medicine*, Article ID 705326, 15p, 2012.
- GODFRAY HCJ. 2002. Challenges for taxonomy. The discipline will have to reinvent itself if it is to survive and flourish. *Nature* 417:17–19.

- GOMES LA, DUARTE R, LIMA DC, DINIZ BS, SERRÃO ML, LABARTHE N. 2001. Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatis* (Lutz) mosquitos experimentally fed on feline, canine and humans hosts. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 96:693-695.
- GÓMEZ-SUCERQUIA LJ, TRIANA-CHA´VEZ O, JARAMILLO-OCAMPO N. 2009. Quantification of the genetic change in the transition of *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Hemiptera: Reduviidae) from field to laboratory. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(6):871–7.
- GONTIJO ED, ANDRADE GMQ, SANTOS SE, GALVÃO LMC, MOREIRA EF, PINTO FS, DIAS JCP, JANUÁRIO JN. 2009. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. Epidemiologia e Serviços de Saúde, 18(3), 243-254.
- GUARNER J. 2019. Chagas disease as example of a reemerging parasite. Semin Diagn Pathol. May; 36(3):164-169.
- GUARNERI AA, LORENZO MG. 2017. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. J Insect Physiol; 97:66–76.
- GURTLER RE, COHEN JE, CECERE MC, CHUIT R. 1997. Shifting Host Choices of the Vector of Chagas Disease, *Triatoma infestans*, in Relation to the Availability of Host in Houses in North-West Argentina. Journal of Applied Ecology 34:699–715.
- GURTLER RE, KITRON U, CECERE MC, SEGURA EL, COHEN JE. 2007. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. Proc Natl Acad Sci U S A.; 104(41):16194–9.
- HAOUAS N, PESSON B, BOUDABOUS R, DEDET JP, BABBA H, RAVEL C. 2007. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir host by blood meal analysis in the vectors. Am. J. Trop. Med. Hyg., 77(6):1054-1059.
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res; 6(10):986-94.
- HERNÁNDEZ C, CUCUNUBÁ Z, FLÓREZ C, OLIVERA M, VALENCIA-HERNANDEZ CA, ET AL. 2016. Correction: Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. PLOS Neglected Tropical Diseases 10(10): e0005112.
- HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, WATSON R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology; 11(9):1026-30.
- HOARE CA. 1972. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph, Blackwell, Oxford, 749 pp.
- HOLLAND PM, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFLAND DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' -> 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA; 88:7276-7280.
- HOTEZ PJ, FUJIWARA RT. 2014. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. Microbes Infect. 16(8):601-6.

- HOWARD EJ, XIONG X, CARLIER Y, SOSA-ESTANI S, BUEKENS P. 2014. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and metaanalysis. *BJOG*. 121:22–33.
- HUGHES DP, LIBERSAT F. 2019. Parasite manipulation of host behavior. *Current Biology*. 29:R45–R7.
- IBÁÑEZ-CERVANTES G, MARTÍNEZ-IBARRA JA, NOGUEDA-TORRES, B, LÓPEZ-ORDUÑA E, ALONSO AL, PEREA C, ET AL. 2013. Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. *Parasitol Int*. 62(1):36-43.
- IENNE S, PEDROSO A, CARMONA E, FERREIRA R, BRIONES MR, ZINGALES B. 2010. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infection, Genetics and Evolution*; 10:601–606.
- JANSEN AM, XAVIER SCC, ROQUE ALR. 2015. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Tropica*, 151:1–15.
- JANSEN AM, XAVIER SCDC, ROQUE ALR. 2018. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit Vectors*. 11(1):502.
- JANSEN AM, XAVIER SCC, ROQUE ALR. 2020. *Trypanosoma cruzi* of the knowledge and *Trypanosoma cruzi* biology in the wild environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(10):1-15.
- JIRÓN LF, ZELEDÓN R. 1982. Feeding preferences in 3 species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in experimental conditions. *Rev Biol Trop* 30:151–159.
- JUNQUEIRA ACV, CHIARI E, WINCKER P. 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 90:129-132.
- JUNQUEIRA ACV, DEGRAVE W, BRANDÃO A. 2005. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends in Parasitology*; 21(6):270-272.
- JURBERG J, GALVÃO C. 2006. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae) vectors of Chagas' disease and implications for human health. *Denisia*. 19:1096–1116.
- JURBERG J, GALVÃO C, DOS SANTOS CM, RANGEL MBA. 2008. Descrição de ovos e estádios ninfais de *Triatoma carcavallo* (Hemiptera, Reduviidae) por meio de microscopia óptica. *Sér. Zool.*, 98(4):441-446.
- JURBERG J, CUNHA V, CAILLEAUX S, RAIGORODSCHII R, LIMA MS; ROCHA DS; MOREIRA FFF. 2013. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua*, 4(1):43-56.
- JURBERG J, RODRIGUES JMS, MOREIRA FFF, DALE C, CORDEIRO IRS, LAMAS JR VD, GALVÃO C, ROCHA DS. 2014. Atlas iconográfico dos triatomíneos do Brasil (vetores da doença de Chagas). Rio de Janeiro: FIOCRUZ.
- JUSTI SA, GALVÃO C. 2017. The Evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. *Trends Parasitol*, 33(1):42-52.

- KENT R, NORRIS DE. 2005. Identification of Mammalian Blood Meal in Mosquitos by a Multiplex Polymerase Chain Reaction Targeting Cytochrome B. *Am. J. Med. Hyg.*, 73(2):336-342.
- KIERAN TJ, GORDON ERL, ZALDÍVAR-RIVERÓN A, IBARRA-CERDEÑA CN, GLENN TC, WEIRAUCH C. 2021. Elementos ultraconservados reconstróem a evolução dos barbeiros vetores da doença de Chagas (Reduviidae: Triatominae). *Systemic Entomology*, 46(3): 725-740.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111–120.
- KIRSTEIN F, GRAY JS. 1996. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Applied and Environmental Microbiol.*, 62(11):4060-4065.
- K MARTINS, ANDRADE CM, BARBOSA-SILVA AN, NASCIMENTO GB, CHIARI E, GALVÃO LMC, CAMARA ACJ. 2015. *Trypanossoma cruzi* III causing indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *International Journal of infectious disease* 39:68-75.
- KLINGBEIL MM, ENGLUND PT. 2004. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *PNAS*; 101(13):4333-4334.
- KOLLIEN AH, SCHAUB GA. 1998. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion by the starved vector. *Am J Trop Med Hyg*; 59: 166–170.
- KOLLIEN AH, SCHAUB GA. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*;16(9):381-7.
- KROPF SP. Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação, 1909 – 1962. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2009.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 1;35(6):1547-1549.
- KUN H, MOORE A, MASCOLA L, STEURER F, LAWRENCE G, KUBAK B, et al. 2009. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 48:1534–40.
- LAMAS JR. VD, PEIXOTO SR, BARBOSA HS, GUIMARÃES HL, JURBERG J. 2018. Análise morfológica de ovos de *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Morphological analysis of the eggs of *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) by scanning electron microscopy. *Rev Pan-Amaz Saude*; 9(2):51-56 – e-ISSN: 2176-6223.
- LAMBRECHTS L, FELLOUS S, KOELLA JC. 2006. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol*. 22(1):12–6.
- LANG BF, GRAY MW, BURGER G. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 33: 351-397.
- LARA FA, SANT'ANNA C, LEMOS D, LARANJA GA, COELHO MG, REIS SALLES I, ET AL. 2007. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun*. 355(1):16–22.

- LAZZARI CR. 1992. Circadian organization of locomotion activity in the haematophagous bug *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol* 38: 895-903.
- LAZZARI CR, PEREIRA MH, LORENZO MG. 2013. Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 108(1):34–47.
- LAZZARI CR, FAUQUET A, LAHONDÈRE C. 2018. Keeping cool: Kissing bugs avoid cannibalism by thermoregulating. *J Insect Physiol*. 107:29–33.
- LENT H. 1942. Estudos sobre os triatomíneos do Estado do Rio Grande do Sul, com descrição de uma espécie nova. *Rev Bras Biol* 2: 219-231.
- LENT H, WYGODZINSKY PW. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 163:125–520.
- LIARTE DB. Desenvolvimento de uma PCR Multiplex capaz de detectar e classificar cepas de *Trypanosoma cruzi* em amostras clínicas e de campo. Dissertação [Mestrado em Biologia Molecular e Celular] – Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz; 2006.
- LIDANI KCF, ANDRADE FA, BAVIA L, DAMASCENO FS, BELTRAME MH, MESSIAS-REASON IJ, SANDRI TL. 2019. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health*.; 2(7):166.
- LIMA L, ESPINOSA-ÁLVAREZ O, ORTIZ PA, TREJO-VARÓN JA, CARRANZA JC, PINTO CM, SERRANO MG, BUCK GA, CAMARGO EP, TEIXEIRA MM. 2015. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.*; 151:166-77.
- LIMA N. Distribuição, infecção natural e fontes alimentares de triatomíneos coletados em municípios do estado do Rio Grande do Sul e ações educativas na prevenção e vigilância da doença de Chagas. Tese [Doutorado em Ciências] – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Fiocruz; 2017.
- LIMA-CORDÓN RA, MONROY MC, STEVENS L, RODAS A, RODAS GA, DORNI PL, JUSTI SA. 2019. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Zookeys*, 820:51-70.
- LIMA MM, SARQUIS O. 2008. Is *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae) changing its habitat as a consequence of human activity?. *Parasitol. Res.*, 102:797-800,.
- LIMA-OLIVEIRA TM, FONTES FVHM, LILIOSO M, PIRES-SILVA D, TEIXEIRA MMG, MEZA JGV, et al. 2020. Molecular eco-epidemiology on the sympatric Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrocchiae*: Ecotopes, genetic variation, natural infection prevalence by trypanosomatids and parasite genotyping. *Acta Trop*. 201:105188.
- LOROSA ES, ANDRADE RE, PEREIRA CA, SANTOS SM, JURBERG J. 1999. Estudo das fontes alimentares do *Triatoma sordida* (Stal, 1859) do estado do Mato Grosso do Sul, através da comparação das técnicas de precipitina e imunodifusão dupla. *Entomol. Vect.* 6: 156-165.
- LOROSA ES, JURBERG J, SOUZA ALA, VINHAES MC, NUNES IM. 2000a. Hemolinfa de *Dyctyoptera* na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal,1859) Hemiptera, Reduviidae, Triatominae. *Entomologia y Vectores*. 7:287–96.

LOROSA ES, NUNES IM, VINHAES MC, ANDRADE RE, JURBERG J. 2000b. Preferência alimentar de algumas espécies de triatomíneos capturados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com auxílio da técnica de precipitina e grau de infectividade. *Entomol Vect* 7:211-225.

LOROSA ES, SANTOS CM, JURBERG J. 2008. Foco de doença de Chagas em São Fidélis, no estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*, 41(4):419-420.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In: J. R. Coura, Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias; Guanabara – Koogan: Rio de Janeiro, 2005.

LOZA-MURGUÍA M, NOIREAU F. 2010. Vectorial capacity of *Triatoma guasayana* (Wygodzinsky & Abalos) (Hemiptera: Reduviidae) compared with two other species of epidemic importance. *Neotrop Entomol*. 39(5):799–809.

LUQUETTI AO, RASSI A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER Z, ANDRADE ZA, BARRAL-NETO M. (Org). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

MACHADO EM, ALVARENGA NJ, ROMANHA AJ, GRISARD EC. 2000. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 95(6):863-866.

MARCET PL, DUFFY T, CARDINAL MV, BURGOS JM, LAURICELLA MA, LEVIN MJ ET AL. 2006. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology*; 132(1):57–65.

MARCILI A, LIMA L, CAVAZZANA M, JUNQUEIRA AC, VELUDO HH, MAIA DA SILVA F, CAMPANER M, PAIVA F, NUNES VLB, TEIXEIRA MMG. 2009. 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. *Parasitology*; 6:641-655.

MARCON, GEB, ALBUQUERQUE DM, BATISTA AM, ANDRADE PD, ALMEIDA EA, GUARIENTO ME, ET AL. 2011. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; 06(1): 85-91.

MARIN-NETO JA, CUNHA-NETO E, MACIEL BC, SIMÕES MV. 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 115:1109–23.

MARLIÉRE NP, LATORRE-ESTIVALIS JM, LORENZO MG, CARRASCO D, ALVES-SILVA J, RODRIGUES JO, FERREIRA LL, LARA LM, LOWENBERGER C, GUARNERI AA. 2015. Trypanosomes Modify the Behavior of Their Insect Hosts: Effects on Locomotion and on the Expression of a Related Gene. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(8):e0003973.

MÁRQUEZ E, JARAMILLO-O N, GÓMEZ-PALACIO A, DUJARDIN JP. 2011. Morphometric and molecular differentiation of a *Rhodnius robustus*-like form from *R. robustus* Larousse, 1927 and *R. prolixus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Acta Trop* 120: 103-109.

MARTINEZ I, ROSA JA. 2003. Characterization of two strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isolated from specimens of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) collected in wild environment. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 45(13):161.

MARTINEZ I. Caracterização de duas cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) isoladas de exemplares de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera,



- Reduviidae) coletados em ambiente silvestre. 98f. Tese [Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2004.
- MARTINS LPA. Isolamento e caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) a partir de triatomíneos silvestres do Estado do Rio Grande do Sul. Tese [Doutorado em Análises Clínicas] – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2005.
- MARTINS LPA, CASTANHO REP, CASANOVA C, CARAVELAS DT, FRIAS GT, RUAS-NETO AL, ROSA JA. 2006. Triatomíneos rupestres infectados por Trypanosomatidae, coletados em Quaraí, Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 39(2):198-202.
- MARTINS LP, MARCILI A, CASTANHO RE, THEREZO AL, DE OLIVEIRA JC, SUZUKI RB, TEIXEIRA MMG, DA ROSA JA, SPERANÇA MA. 2008. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. Am J Trop Med Hyg. 79(3):427–34.
- MARTINS-MELO FR, ALENCAR CH, RAMOS AN JR, HEUKELBACH J. 2012. Epidemiology of mortality related to Chaga's Disease in Brazil, 1997–2007. PLoS Negl Trop Dis.; 6(2):e1508.
- MARTINS-MELO FR, RAMOS JÚNIOR AN, ALENCAR CH, HEUKELBACH J. 2014. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. Acta Trop.; 130: 167-74. 36. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37(6):441-446.
- MARTINS-MELO FR, RAMOS AN JR, ALENCAR CH, HEU KELBACH J. 2016. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. Bull World Health Organ; 94:103–110.
- MAS-COMA S, BARGUES MD. 2009. Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. Acta Trop 110:112-136.
- MAZEROLLE MJ. 2019. AICcmodavg: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c). R package version 2.-]. Available from: [https://cran.r-project.org/package = AICcmodavg](https://cran.r-project.org/package=AICcmodavg).
- MCDANIEL JP, DVORAK JA. 1993. Identification, isolation, and characterization of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants. Mol Biochem Parasitol.; 57:213-222.
- MEDRANO-MERCADO N, UGARTE-FERNANDEZ R, BUTRON V, UBER-BUSEK S, GUERRA HL, ET AL. 2008. Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. Mem Inst Oswaldo Cruz; 103: 423–430.
- MELLO CB, AZAMBUJA P, GARCIA ES, RATCLIFFE NA. 1996. Differential in vitro and in vivo behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* in the gut and hemolymph of *Rhodnius prolixus*. Exp. Parasitol., 82:112–121.
- MELO MF, MOREIRA OC, TENÓRIO P, LORENA V, LORENA-REZENDE I, OLIVEIRA JÚNIOR W, ET AL. 2015. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. Parasites & Vectors 8:154
- MELO RFP, GUARNERI AA, SILBER AM. 2020. The Influence of Environmental Cues on the Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae Vector. Front. Cell. Infect. Microbiol, 10:27.
- MENDONÇA VJ, SILVA MTA, ARAÚJO RF, JÚNIOR JM, JÚNIOR MB, ALMEIDA CE, COSTA J, GRAMINHA MAS, CICARELLI RMB, ROSA JA. 2009. Phylogeny of *Triatoma herlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. Am J Trop Med Hyg.;81:858–864.

MESSIAS AC. 2011. Vivendo com os insetos: Barbeiros. 22ªed. Rio de Janeiro: Biomanguinhos/FIOCRUZ.

MESQUITA RD, VIONETTE-AMARAL RJ, LOWENBERGER C, RIVERA-POMAR R, MONTEIRO FA, MINX P, SPIETH J, CARVALHO AB, PANZERA F, LAWSON D, TORRES AQ, RIBEIRO JM, SORGINE MH, WATERHOUSE RM, MONTAGUE MJ, ABAD-FRANCH F. 2015. Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112:14936–14941.

MILES MA, CEDILLOS RA, POVOA MM, DE SOUZA AA, PRATA A, MACEDO V. 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? Lancet, 1:1338–1340.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2019. Doença de Chagas. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas#:~:text=Entre%20o%20per%C3%ADodo%20de%202010,respons%C3%A1vel%20por%2071%25%20dos%20casos.>>. Acessado em: 04/01/2021.

MISHLER BD & BRANDON RN. 1987. 'Individuality, Pluralism, and the Phylogenetic Species Concept', Biology and Philosophy 2, 397–414.

MOLAEI G, ANDREADIS TG, ARMSTRONG PM, DIUK-WASSER M. 2008. Host-feeding patterns of potencial mosquitos vectors in Connecticut, USA: molecular analysis of blomeals from 23 species of *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia*, *Psorophora* and *Uranotaenia*. J. Med. Entomol., 45(6):1143-1151.

MONJE-RUMI MM, FLORIDIA-YAPUR N, ZAGO MP, RAGONE PG, PÉREZ BRANDÁN CM, NUÑEZ S, BARRIENTOS N, TOMASINI N, DIOSQUE P. 2020. Potential association of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. Infect Genet Evol. 84:104329.

MONTEIRO FA, BARRETT TV, FITZPATRICK S, CORDÓN-ROSALES C, FELICIANGELI D, BEARD CB. 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. Mol. Ecol. 12:997–1006.

MONTEIRO FA, DONNELLY MJ, BEARD CB, COSTA J. 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. Mol Phylogenet Evol 32: 46-56.

MONTEIRO WM, MAGALHAES LK, DE SA AR, GOMES ML, TOLEDO MJ, BORGES L, ET AL. 2012. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. PLoS One.;7(7):e41284.

MONTEIRO FA, PERETOLCHINA T, LAZOSKI C, HARRIS K, DOTSON EM, ABAD-FRANCH F, TAMAYO E, PENNINGTON PM, MONROY C, CORDÓN-ROSALES C, SALAZARSCHETTINO PM, GÓMEZ-PALACIO AM, GRIJALVA MJ, BEARD CB, MARCET PL. 2013. Phylogeographic pattern and extensive mitochondrial DNA divergence disclose a species complex within the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. PLoS One 8:e70974.

MONTEIRO FA, WEIRAUCH C, FELIX M, LAZOSKI C, ABAD-FRANCH F. 2018. Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. Advances in Parasitology, 99:265-344.

- MORA MC, SANCHEZ NEGRETTE O, MARCO D, BARRIO A, CIACCIO M, SEGURA MA, ET AL. 2005. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J Parasitol*; 91(6):1468-73.
- MORAES-SOUZA H, FERREIRA-SILVA MM. 2011. Control of transfusional transmission. *Rev Soc Bras Med Trop*; 44(2):64–67.
- MOREIRA D, LÓPEZ-GARCÍA P, VICKERMAN K. 2004. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: Proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54:1861–1875.
- MOREIRA OC, RAMÍREZ JD, VELÁZQUEZ E, MELO MF, LIMA-FERREIRA C, GUHL F, ET AL. 2013. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.*; 125(1):23-31.
- MOREIRA OC, VERLY T, ARAUJO PF, GOMES SAO, LOPES CM, SOUSA DM, AZEVEDO LR, MOTA FF, DA D`AVILA-LEVY CM, SANTOS-MALLET JR, BRITTO C. 2017. Development of conventional and real-time multiplex PCR-based assays for estimation of natural infection rates and *Trypanosoma cruzi* load in triatomine vectors. *Parasites & Vectors*, v.10:404, 14p.
- MOSER DR, KIRCHHOFF LV, DONELSON JE. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*; 27(7):1477-1482.
- MURCIA L, CARRILERO B, MUÑOZ MJ, IBORRA MA, SEGOVIA M. 2010. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother*;65(8):1759-64.
- NASCIMENTO JD, ROSA JA, SALGADO-ROA FC, HERNÁNDEZ C, PARDO-DIAZ C, ALEVI KCC, RAVAZI A, OLIVEIRA J, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, SALAZAR C, RAMIREZ JD. 2019. Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species? *Plos One*, 14, 2.
- NEIVA, A. 1911. Zwei neue Afrikanische Arten des Genus *Triatoma* (oder Conorhinus). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 13:239-240.
- NEIVA A, LENT H. 1936. Notas e comentários sobre triatomídeos. Lista de espécies e sua distribuição geográfica. *Revista de Entomologia*, 6:153-190.
- NEIVA A, LENT H. 1941. Sinopse dos Triatomídeos. *Revista de Entomología*, Rio de Janeiro 12:61-92.
- NEVES NS, CLAUSELL DT, NÓLIBOS H, DE MELLO AL, OSSANAI J, RAPONE T, SNELL T. 1968. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*; 10:265-276.
- NIELEBOCK MAP, MOREIRA OC, XAVIER SCDC, MIRANDA LDFC, LIMA ACBD, PEREIRA TODJS, HAASLOCHER-MORENO AM, BRITTO C, SANGENIS LHC, SARAIVA RM. 2020. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. *PLoS ONE* 15(12):e0243008.

- NOIREAU F, GUTIERREZ T, ZEGARRA M, FLORES R, BRENIÈRE F, CARDOZO L, DUJARDIN JP. 1998. Cryptic Speciation in *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) from the Bolivian Chaco. Trop. Med. and Int. Health 3:364-372.
- NOIREAU F, ZEGARRA M, ORDOÑEZ J, GUTIERREZ T, DUJARDIN JP. 1999. Genetic Structure of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae) Domestic Populations from Bolivia: Application on Control Interventions. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz 94:347-351.
- NOIREAU F, BASTRENTA B, CATALÁ SS, DUJARDIN JP, PANZERA F, TORRES M, PEREZ R, JURBERG J, GALVÃO C. 2000a. Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from field collection to characterization. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 95:119–122.
- NOIREAU F, FLORES R, GUTIERREZ T, ABAD-FRANCH F, FLORES E, VARGAS F. 2000b. Natural ecotopes of *Triatoma infestans* dark morph and other sylvatic triatomines in the Bolivian Chaco. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg, 94:23–27.
- NOIREAU F, DOS SANTOS SM, GUMIEL M, DUJARDIN JP, SOARES MS, CARCAVALLO RU, GALVÃO C, JURBERG J. 2002. Phylogenetic relationships within the *oliveirai* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Infect. Genet. Evol, 2:11-17.
- NOUVELLET P, RAMIREZ-SIERRA MJ, DUMONTEIL E, GOURBIÈRE S. 2011. Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatán peninsula, Mexico. Infect Genet Evol. 11(6):1243–9.
- NOVAIS CM. 2004. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento; 33:10-13.
- NUNES MCP, DONES W, MORILLO CA, ENCINA JJ, RIBEIRO AL. 2013. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. J Am College Cardiol. 62:767–76.
- OCHSENREITER T, CIPRIANO M, HAJDUK SL. 2007. KISS: The kinetoplastid RNA editing sequence search tool. RNA; 13:1-4.
- OLIVARES-VILLAGÓMEZ D, MCCURLEY TL, VNENCAK-JONES CL, CORREA-OLIVEIRA R, COLLEY DG, CARTER CE. 1998. Polymerase Chain Reaction amplification of three different *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human chagasic cardiac tissue. Am J Trop Med Hyg.; 59(4): 563-570.
- OLIVEIRA-LIMA JW, FILHO OFF, VIEIRA JBF, GADELHA FV, FILHO AMO. 2000. Peridomestic changes and implications for *Triatoma brasiliensis* control. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16(2):75-81.
- OLIVEIRA AG, MARASSA AM, CONSALES CA, DORVAL MEC, FERNANDES CE, OLIVEIRA GR, BRAZIL RP, GALATI EAB. 2008. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. Acta Trop., 107(3): 238-241.
- OLIVEIRA TG, CARVALHO-COSTA FA, GOMES TF, SARQUIS O, SPOSINA R, LIMA MM. 2010. Developmental and reproductive patterns of *Triatoma brasiliensis* infected with *Trypanosoma cruzi* under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 105(8):1057–60.
- OLIVEIRA RL. Principais insetos vetores e mecanismos de transmissão das doenças infecciosas e parasitárias. In: Coura, J.R. (Ed.), Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

OLIVEIRA J, AYALA JM, JUSTI SA, ROSA JA, GALVÃO C. 2018. Description of a new species of *Nesotriatoma* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). J. Vec. Ecol, 43:148-157.

OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde). Disponível em: < [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_docman&view=download&alias=820-curso-capacitacao-para-deteccao-do-trypanossoma-cruzi-modulo-iii-0&category\\_slug=capacitacao-deteccao-trypanossoma-cruzi-193&Itemid=965](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=820-curso-capacitacao-para-deteccao-do-trypanossoma-cruzi-modulo-iii-0&category_slug=capacitacao-deteccao-trypanossoma-cruzi-193&Itemid=965)>. Acessado em: 29/10/2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). 2002. Expert Committee on the Control of Chagas Disease (2000: Brasília, Brazil) & World Health Organization. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). 2018. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: < [https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/chagas-disease#tab=tab_2)>. Acessado em: 25/12/2020.

ORTIZ MI, SUÁREZ-RIVILLAS A, MOLINA J. 2011. Behavioural responses to human skin extracts and antennal phenotypes of sylvatic first filial generation and long rearing laboratory colony *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 106(4):461–6.

OSCHEROV EB, BAR ME, DAMBORSKY MP, MILANO AM. 2005. [Population statistics of *Triatoma rubrovaria* in laboratory]. Rev Saude Publica; 39(2):211–6.

OSORIO Y, TRAVI BL, PALMA GI, SARAVIA NG. 1995. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. J Parasitol; 81:687-93.

OSTERMAYER AL, PASSOS ADC, SILVEIRA AC, FERREIRA AW, MACEDO V, PRATA AR. 2011. The national survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001–2008). Rev Soc Bras Med Trop; 44(2):108–121.

PACHECO RS, ALMEIDA CE, KLISIEWICZ CR, COSTA J, PIRES MQ, PANZERA F, BAR ME, MASCOMA S, BARGUES ME. 2007. Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. Parasite, 14:231–237.

PAIM RM, ARAÚJO RN, SOARES AC, LEMOS LC, TANAKA AS, GONTIJO NF, ET AL. 2011. Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). Int J Parasitol. 41(7):765–73.

PALÁU MT, MONTILLA M, ZÚÑIGA CA. 2001. Estudio del comportamiento de dos cepas de *Trypanosoma rangeli*. MedUNAB; 4:166-72.

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

PAVAN MG. 2009. Filogeografia de *Rhodnius pictipes* (Hemiptera: Reduviidae) na região amazônica, Biologia Parasitária. Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 127pp.

PAVAN MG, MESQUITA RD, LAWRENCE GG, LAZOSKI C, DOTSON EM, ABUBUCKER S, MITREVA M, RANDALL-MAHER J, MONTEIRO FA. 2013. A nuclear single-nucleotide polymorphism (SNP) potentially useful for the separation of *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius*

- robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution*. 14:426-433.
- PAVAN MG. Especiação em triatomíneos: uma abordagem filogenética, biogeográfica e comportamental dos vetores de Chagas *Rhodnius prolixus* e *R. robustus* s.l. (Hemiptera: Reduviidae). Tese [Doutorado em Ciências] – Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária – Fiocruz; 2013.
- PAVAN MG & MONTEIRO FA. Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial. In: GALVÃO, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, pp. 210- 235. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6.
- PEÑA VH, FERNÁNDEZ JG, GOMEZ-PALACIO AM, MEJÍA-JARAMILLO CANTILLO O, TRIANA-CHÁVEZ O. 2012. High-Resolution Melting (HRM) of the Cytochrome B Gene: A Powerful Approach to Identify Blood-Meal Sources in Chagas Disease Vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(2):E1530.
- PEREIRA MH, GONTIJO NF, GUARNERI AA, SANT'ANNA MR, DIOTAIUTI L. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends Parasitol*. 2006; 22(11):516–20.
- PEREIRA KS, SCHMIDT FL, GUARALDO AM, FRANCO RM, DIAS VL, PASSOS LA. 2009. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot*; 72: 441–46.
- PEREYRA N, LOBBIA PA, MOUGABURE-CUETO G. 2020. Effects of the infection with with *Trypanosoma cruzi* on the feeding and excretion/defecation patterns of *Triatoma infestans*. *Bull Entomol Res.*; 110(1):169– 76.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A, MÜLLER CA, MOREIRA CJ. 1990. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas disease. The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev. Saúde Pública*, 24:165–177.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ A, MOREIRA CJC. 1994. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*-1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 89(4):603–18.
- PERKINS SL, SCHALL JJ. 2002. A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *J. Parasitol*, 88:972-978.
- PFEILER E, BITLER BG, RAMSEY JM, PALACIOS-CARDIEL C, MARKOW TA. 2006. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Phylogenetics Evol.*; 41:209–221.
- PIESMAN J, SHERLOCK IA. 1983. Factors controlling the volume of feces produced by triatomine vectors of Chagas' disease. *Acta Trop*. 40(4):351–8.
- PIMENTEL CFR. Herança de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas com persistência de nDNA de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação [Mestrado em Patologia Molecular] – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; 2012.
- PINAZO MJ, CAÑAS E, ELIZALDE JI, GARCÍA M, GASCÓN J, GIMENO F, et al. 2010. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterol Hepatol*. 33:191–200.

- PINEDA V, MONTALVO E, ALVAREZ D, SANTAMARÍA AM, CALZADA JE, ET AL. 2008. Feeding sources and trypanosome infection index of *Rhodnius pallescens* in a Chagas disease endemic area of Amador County, Panama. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 50:113–116.
- PINHO IF. Diagnóstico molecular da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos nativos de área endêmica para doença de Chagas no estado do Ceará. Dissertação [Mestrado em Medicina Tropical] – Instituto Oswaldo Cruz; 2012.
- PINTO C. 1925. Ensaio monographico dos Reduvidos hematophagos ou barbeiros. Thesis. Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro, 118pp.
- PINTO AY, VALENTE SA, VALENTE VC. 2004. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis*; 8: 454-460.
- PINTO AY, VALENTE SA, VALENTE VC, FERREIRA JUNIOR AG, COURA JR. 2008. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 1995. *Rev Soc Bras Med Trop*; 41(6):602-614.
- PIRON M, FISA R, CASAMITJANA N, LÓPEZ-CHEJADE P, PUIG L, VERGÉS M, ET AL. 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*; 103:195–200.
- PITA S, LORITE P, NATTERO J, GALVÃO C, ALEVI KC, TEVES SC, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, PANZERA F. 2016. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). *Infect Genet Evol* 43:225–231.
- POINAR G. 2019. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretaceous Research*, v. 93:90-97.
- QVARNSTROM Y, SCHIJMAN AG, VERON V, AZNAR C, STEURER F, DA SILVA AJ. 2012. Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. *PLoS Negl Trop Dis*; 6(7):e1689.
- RABINOVICH JE, KITRON UD, OBED Y, YOSHIOKA M, GOTTDENKER N, CHAVES LF. 2011. Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 479-494.
- RAMÍREZ JD, GUHL F, RENDÓN LM, ROSAS F, MARIN-NETO JA, MORILLO CA. 2010. Chagas Cardiomyopathy Manifestations and *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chronic Chagasic Patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(11):e899.
- RAMÍREZ JD, HERNANDEZ C, MONTILLA M, ZAMBRAN P, FLOREZ AC, PARRA E, ET AL. 2014. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses and Public Health*; 61(7):477–479.
- RAMÍREZ JC, CURA CI, DA CRUZ MOREIRA O, LAGES-SILVA E, JUIZ N, VELÁZQUEZ E, RAMÍREZ JD, ALBERTI A, PAVIA P, ET AL. 2015. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*.;17(5):605-15.
- RAMÍREZ JC, TORRES C, CURTO MLA, SCHIJMAN AG. 2017. NEW insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLoS Negl Trop Dis*.;11(12):e0006139.

- RAMÍREZ-GONZÁLEZ MG, FLORES-VILLEGAS AL, SALAZAR-SCHETTINO PM, GUTIÉRREZ-CABRERA AE, ROJAS-ORTEGA E, CÓRDOBA-AGUILAR A. 2019. Zombie bugs? Manipulation of kissing bug behavior by the parasite *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 200:105177.
- RASSI A JR, RASSI SG, RASSI A. 2001. Sudden death in Chagas disease. *Arq Bras Cardiol* 76: 75-96.
- RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas disease. 2010. *Lancet*. 375:1388–402.
- RAY DS. 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of Trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*; 9(3):1365-1367.
- REQUENA JM, LOPEZ MC, ALONSO C. 1996. Genomic repetitive DNA Elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today*; 12:279-282.
- REY L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4ª.ed [Reimpr]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
- REY L. Protozoários agentes de doenças humanas. In: Coura, J.R. (Ed.), Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- RIBEIRO G, DOS SANTOS CGS, LANZA F ET AL. 2019. Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. *Parasites Vectors*; 12, 604.
- RIBEIRO JM, SCHNEIDER M, ISAIAS T, JURBERG J, GALVÃO C, GUIMARÃES JA. 1998. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J Med Entomol*. 35(4):599–610.
- RIBEIRO AR, MENDONÇA VJ, ALVES RT, MARTINEZ I, ARAÚJO RF, MELLO F AND ROSA JA. 2014. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Saúde Pública* 48:295-302.
- ROCHA CS. Variabilidade genética de três colônias de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843), (Hemiptera, Reduviidae), oriundas do estado do Rio Grande do Sul, avaliadas por meio do sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e ribossomal. 2009. 78 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009.
- ROCHA CS. Análise da relação filogenética entre *Triatoma carcavallo* Jurberg, Rocha; Lent, 1998; *Triatoma circummaculata* Stal, 1859; *Triatoma klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent; Galvão, 2001 e *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae) baseada no sequenciamento de genes do DNA mitocondrial e nuclear. 2012. 104 f. Tese [Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia] - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012.
- RODRIGUES-DOS-SANTOS Í, MELO MF, DE CASTRO L, HASSLOCHER-MORENO AM, DO BRASIL PEAA, SILVESTRE DE SOUSA A, BRITTO C, MOREIRA OC. 2018. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. Nov 12;12(11):e0006939.
- ROSA JÁ, JUSTINO HHG, NASCIMENTO JD, MENDONÇA VJ, ROCHA CARVALHO DB, et al. 2017. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys*, 675:1–25.
- ROSENTHAL R. 1994. Parametric measures of effect size. In: Cooper H, Hedges LV, editors. *The handbook of research synthesis*. New York: Russell Sage Foundation. p. 231–44.



- ROSS PA, ENDERSBY-HARSHMAN NM, HOFFMANN AA. 2019. A comprehensive assessment of inbreeding and laboratory adaptation in. *Evol Appl.* 12(3):572–86.
- RUAS-NETO AL, CORSEUIL E, CAVALLERI A. 2001. Development of rupestrian Triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) following hemolymphagy on Blaberids (Blattodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Entomologia y Vectores.* 8:205–16.
- RUAS-NETO AL, CORSEUIL E. 2002. Hábitos, Distribuição Geográfica e Potencialidade dos triatomíneos rupestres como vetores da doença de Chagas no Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Entomol y Vect*, 9(2):231-249.
- RUSSOMANDO G, ARIAS AR, ALMIRON M, FIGUEREDO A, FERREIRA ME, MORITA K. 1996. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp Parasit*; 83:62–6.
- RUTLEDGE RG, COTE C. 2003. Mathematics of quantitative PCR and the applications of standard curves. *Nucleic Acids Research.*; 31:e93.
- RYCKMAN RE. 1951. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *J Parasitol.* 37(5 1):433–4.
- RYCKMAN RE. 1962. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North America (Hemiptera: Reduviidae) (Rodentia: Cricetidae). University of California Publications in Entomology, 27, 93-240.
- SAAVEDRA M, ZULANTAY I, APT W, CASTILLO J, ARAYA E, MARTÍNEZ G, RODRÍGUEZ J. 2016. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. *Parasites Vectors* 9, 382.
- SALVATELLA R, CALEGARI L, PUIME A, BASMADJIAN Y, ROSA R, GUERRERO J, MARTINEZ M, MENDARO G, BRIANO D, MONTERO C, WISNIVESKY-COLLI C. 1994. Perfil alimentario de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Triatominae) en ámbitos peridomiciliarios, de una localidad rural de Uruguay. *Revista do instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 36:311-320.
- SALVATELLA R, ROSA R, BASMADJIAN Y, PUIME A, CALEGARI L, GUERRERO J, MARTINEZ M, MENDARO G, BRIANO D, MONTERO C, WISNIVESKY-COLLI C. 1995. Ecology of *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Triatominae) in wild and peridomestic environments of Uruguay. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 90:325-328.
- SANDOVAL CM, DUARTE R, GUTIÉRREZ R, ROCHA DS, ANGULO VM, ESTEBAN L, ET AL. 2004. Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz [Internet]*; 99(2): 137-140.
- SANGER F. 1975. The Croonian Lecture. Nucleotide sequences in DNA. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*191:317-333.
- SANTOS EF, SILVA ÂAO, LEONY LM, FREITAS NEM, DALTRO RT, REGIS-SILVA CG, ET AL. 2020. Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 14(8): e0008445.
- SANTOS-MALLET J, CARDOZO-DE-ALMEIDA M, NOVO SPC, GONÇALVES TCM. 2008. Morfologia externa de *Triatoma carcavalloei* Jurberg, Rocha & Lent (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) através da microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. *EntomoBrasilis*1(2):37-42.

- SARQUIS O, BORGES-PEREIRA J, MAC CORD JR, GOMES TF, CABELLO PH, LIMA MM. 2004. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(3):263-70.
- SARQUIS O, SPOSINA R, OLIVEIRA TG, MAC CORD JR, CABELLO PH, BORGES-PEREIRA J, LIMA MM. 2006. Aspects of peridomestic ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera: Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 143-147.
- SASAKI H, ROSALES R, TABARU Y. 2003. Host feeding profiles of *Rhodnius prolixus* and *Triatoma dimidiata* in Guatemala (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Medical Entomology and Zoology 54:283–289.
- SCHAUB GA. 1988. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. Acta Trop. 45(1):11–9.
- SCHIJMAN AG, ALTCHER J, BURGOS JM, BIANCARDI M, BISIO M, LEVIN MJ, FREILIJ H. 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. J Antimicrob Chemother; 52(3):441-9.
- SCHIJMAN AG, BISIO M, ORELLANA L, SUED M, DUFFY T, MEJIA JARAMILLO AM, CURA C, AUTER F, VERON V, QVARNSTROM Y, DEBORGGRAEVE S, HIJAR G, ZULANTAY I, LUCERO RH, ET AL. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis.;5(1):e931.
- SCHIJMAN AG. 2018. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop.; 184:59-66.
- SCHMUNIS GA, YADON ZE. 2010. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop.; 115:14–21.
- SCHROEDER H, KLOTZBACH H, ELIAS S, AUGUSTIN C, PUESCHEL K. 2003. Use of PCR – RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Diptera, Calliphoridae) on human corpses. Forensic Sci. Int. 132:76–81.
- SCHOFIELD CJ, DIOTAIUTI L, DUJARDIN JP. 1994. The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz; 89(1):375-378.
- SCHOFIELD CJ, DIAS JC. 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. Adv Parasitol. 42:1–27.
- SCHOFIELD CJ, JANNIN J, SALVATELLA R. 2006. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 22(12):583–8.
- SCHOFIELD CJ, GALVÃO C. 2009. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. Acta Trop. 110:88–100.
- SCHWEIGMANN N, BRENIERE SF, BOSSENO MF, CONTI O, TELLERIA J, NOIREAU F, WISNIVESKYCOLI C. 1995. Aportes de la técnica de PCR al estudio del ciclo silvestre del *T. cruzi* en Santiago del Estero, Argentina. Parasitología al Día (Chile);19(Suppl.):65.
- SENA LS. 2010. Elisa “Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay”. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/labimuno/elisa-3454963#btnPrevious>>. Acesso em 10 de janeiro de 2021.

- SHAW J, LAINSON R, FRAIHA H. 1969. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saude Publica*. 3:153–7.
- SHERLOCK IA. 1979. Vetores S In: Brener Z, Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 42-88.
- SHIKANAI-YASUDA MA, CARVALHO NB. Oral transmission of chagas disease. 2012. *Clin Infect Dis*. 54:845–52.
- SILBER AM, BÚA J, PORCEL BM, SEGURA EL, RUIZ AM. 1997. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1:BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp. Parasitol.*; (85):225–232.
- SILVA NN, CLAUSELL DT, NÚBILOS H, MELLO AL, OSSANAI J, RAPONE T, et al. 1968. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Rev Inst Med Trop*. 10:265–76.
- SILVA IG, LUQUETTI AO, SILVA HHG. 1993. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da susceptibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*; 26:19-24.
- SILVA LA. Estudo morfológico, morfométrico e molecular de cinco espécies do subcomplexo *Triatoma rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Dissertação [Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia] – Programa de Pós-Graduação em em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia– UNESP; 2018.
- SILVEIRA AC. 1984. Altas taxas de infecção natural em *Panstrongylus lutzi* Neiva & Pinto, 1923. In: XI Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Programa e Resumos, p. 176, Caxambu: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- SILVEIRA AC. 2000. Current situation with Chagas disease vector control in the Americas. *Cad. Saúde Pública*, 16(2):35-42.
- SILVEIRA AC, DIAS JC. 2011. O controle da transmissão vetorial. *Rev Soc Bras Med Trop.*; 44(2): 52–63.
- SILVEIRA AC, MARTINS E. 2014. Histórico do controle da transmissão vetorial e situação epidemiológica atual. In: Galvão C, editor. Vetores da doença de chagas no Brasil. *Zoologia: guias e manuais de identificação series*. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; p. 10–25.
- SIMÕES MV, ROMANO MMD, SCHMIDT AM, KÁRYTA SM, MARIN-NETO JA. 2018. Cardiomiopatia da Doença de Chagas. *International Journal of Cardiovascular Sciences*, 31(2), 173-189.
- SIMPSON L. 1997. The genomic organization of guide RNA genes in kinetoplastid protozoa: several conundrums and their solutions. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 86:133-141.
- SINAN. 2020. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/chagasrs.def>>. Acessado em: 10/12/2020.
- SMITH MA, FISHER BL, HEBERT PDN. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360:1825-1834.
- SOLER CA, SCHENONE H, REYES H. 1969. Problemas derivados de la reaparición de *Triatoma infestans* en viviendas desinsectadas y el concepto de reinfestación. *Bol. chil. Parasit.*, 24:83-87.

SOUZA ES, VON ATZINGEN NCB, FURTADO MB, OLIVEIRA J, NASCIMENTO JD, VENDRAMI DP, GARDIM S, ROSA JA. 2016. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Pará state, Brazil. *ZooKeys*, 621:45–62.

SRS. 2020. Clima, temperatura e precipitação. Disponível em: <<https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/clima-temperatura-e-precipitacao>>. Acessado em: 03/11/2020.

STURM NR, DEGRAVE W, MOREL C, SIMPSON L. 1989. 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 Parasitology*; 33(3):205-214.

STURM NR, CAMPBELL DA. 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*; 115:35–43.

TAKANO-LEE M, EDMAN JD. 2002. Lack of manipulation of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) vector competence by *Trypanosoma cruzi*. *J Med Entomol*. 39(1):44–51.

TELLERIA J, LAFAY J, VIRREIRA M, BARNABÉ C, TIBAYRENC M, SVOBODA M. 2006. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental Parasitology*. 114(4): 279-288, ISSN 0014-4894.

THOMAZ S, MARTINEZ IT, WESTENBERGER SJ, SURM NR. 2007. A population study of the minicircles in *Trypanosoma cruzi*: predicting guide RNAs in the absence of empirical RNA editing. *BMC Genomics*; 8(133).

TIBAYRENC M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28: 85-104.

UEHARA LA, MOREIRA OC, OLIVEIRA AC, AZAMBUJA P, LIMA APCA, ET AL. 2012. Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(12): e1958.

URDANETA-MORALES S, NIRONI I. 1996. *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of urban opossums: I- isolation and experimental infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 91(4):399-403.

USINGER RL. 1944. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. *US Public Health Bulletin*, 288:1-83.

VAGO AR, ANDRADE LO, LEITE AA, D'ÁVILA REIS D, MACEDO AM, ADAD SJ, et al. 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 156:1805–9.

VALENTE SA. 2005. Epidemiologia da transmissão oral da doença de Chagas. In: Exposição na mesa redonda Situação atual da doença de Chagas na Amazônia. XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; Florianópolis.

VALLEJO GA, GUHL F, CHIARI E, MACEDO AM. 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica*; (72):203-212.

VALLEJO GA, GUHL F, CARRANZA JG, MORENO J, TRIANA O, GRISARD EC. ET AL. 2002.; Parity between kinetoplast DNA and mini exon gene sequences support either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect. Gen. Evol.*; 67: 1-7.

- VARGAS N, PEDROSO A, ZINGALES B. 2004. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Biochem Parasitol*; 138: 131–141.
- VELASCO AJ, GÓMEZ JR, AGIRRE X, BARRIOS M, NAVARRO G, ENÉRIZ ESJ, ET AL. 2006. PCR en tiempo real, una nueva herramienta para la toma de decisiones clínicas. *Haematologica edición española*; 91(1):27-34.
- VENABLES WN, RIPLEY BD. *Modern Applied Statistics with S*. 4 ed. New York: Springer; 2002.
- VERLAG U, VERLAG F. 2001. Unlocking the secrets of Trypanosome kinetoplast DNA network replication. *Protist*; 152:255-62.
- VIEIRA CB, PRAÇA YR, BENTES KLDS, SANTIAGO PB, SILVA SMM, SILVA GDS, MOTTA FN, BASTOS IMD, DE SANTANA JM, DE ARAÚJO CN. 2018. Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? *Front Cell Infect Microbiol.*; 8: 405.
- VINHAES MC, DE OLIVEIRA SV, REIS PO, DE LACERDA SOUSA AC, SILVA RA, OBARA MT, et al. 2014. Assessing the vulnerability of Brazilian municipalities to the vectorial transmission of *Trypanosoma cruzi* using multicriteria decision analysis. *Acta Trop.*; 137:105–110.
- VILLACIS AG, OCANA-MAYORGA S, LASCANO MS, YUMISEVA CA, BAUS EG, GRIJALVA MJ. 2015. Abundance, Natural Infection with Trypanosomes, and Food Source of an Endemic Species of Triatomine, *Panstrongylus howardi* (Neiva 1911), on the Ecuadorian Central Coast. *Am. J. Trop. Med. Hyg*; 92(1):187-192.
- VIRREIRA M, TORRICO F, TRUYENS C, ALONSO-VEGA C, SOLANO M, CARLIER Y, ET AL. 2003. Comparison of Polymerase Chain Reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*; 68(5): 574-582.
- VITELLO DJ, RIPPER RM, FETTIPLACE MR, WEINBERG GL, VITELLO JM. 2015. Blood Density Is Nearly Equal to Water Density: A Validation Study of the Gravimetric Method of Measuring Intraoperative Blood Loss. *J Vet Med*.152730.
- VITZHUM F, GEIGER G, BISSWANGER H, BRUNNER H, BERNHAGEN J. 1999. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standardultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem*. 276(1):59-64.
- VOLPATO FCZ, SOUSA GR, D'ÁVILA DA, GALVÃO LMDC, CHIARI E. 2017. Combined parasitological and molecularbased diagnostic tools improve the detection of *Trypanosoma cruzi* in single peripheral blood samples from patients with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 50(4):506–515.
- WALTMANN A, WILLCOX AC, BALASUBRAMANIAN S, BORRINI MAYORI K, MENDOZA GUERRERO S, SALAZAR SANCHEZ RS, et al. 2019. Hindgut microbiota in laboratory-reared and wild *Triatoma infestans*. *PLoS Negl Trop Dis* 13(5):e0007383.
- WESTENBERGER SJ, CERQUEIRA GC, EL-SAYED NM, ZINGALES B, CAMPBELL DA, STURM NR. 2006. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC Genomics*; 62: 30-46.
- WICKHAM H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag.
- WINCKER P, BRITTO C, PEREIRA JB, CARDOSO MA, OELEMANN W, MOREL CM. 1994. 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.*; 51:771-777.

- YANG S, ROTHMAN RE. 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*; 4:337-348.
- YOO W, MAYBERRY R, BAE S, SINGH K, PETER HE Q, LILLARD JW. 2014. A Study of Effects of MultiCollinearity in the Multivariable Analysis. *Int J Appl Sci Technol.*; 4(5):9-19.
- ZHAO Y, GALVÃO C, CAI W. 2021. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys* 1012, 71-93.
- ZELEDÓN R, SOLANO G, ZÚÑIGA A, SWARTZWELDER JC. 1973. Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). 3. Habitat and blood sources. *J Med Entomol* 10:363-370.
- ZELEDÓN R, RABINOVICH JE. 1981. Chagas disease: An ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol*, 26:101-133.
- ZINGALES B, ANDRADE SG, BRIONES MR, CAMPBELL DA, CHIARI E, FERNANDES O, ET AL. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 104(7):1051-1054.
- ZINGALES B. 2011. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas? *Revista da Biologia*; 6b:44-48.
- ZINGALES B, MILES MA, CAMPBELL DA, TIBAYRENC M, MACEDO AM, TEIXEIRA MM, ET AL. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.*, 12:240-253.
- ZIPPER H, BRUNNER H, BERNHAGEN J, VITZTHUM F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*; 32:e103.
- ZÚÑIGA C, PALÁU MT, PENIN P, GAMALLO C, DE DIEGO JA. 1997. Characterization of a *Trypanosoma rangeli* strain of Colombian origin. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 92:523-30.

## 10 ANEXO 1

**Tabela:** Correlação de espécies e estádios evolutivos de triatomíneos, municípios em que foram coletados e a fonte alimentar detectada. **Em negrito:** alimentações mistas. (\*): amostras positivas para k-DNA de *T. cruzi*. Silv: Silvestre. Peri: Peridomicílio. Id: Identidade.

Espécie de triatomíneo	Estádio evolutivo	Fonte alimentar	Análise no BLAST			Município	Ecótopo
			Nº de acesso	E-value	Id (%)		
<i>T. circummaculata</i> *	Fêmea	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	3,00E-120	93	São Jerônimo	Silv
<i>T. rubrovaria</i> *	Macho	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-83	85	Lavras do Sul	Silv
<i>T. rubrovaria</i> *	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	2,00E-103	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i> *	Macho	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-98	88	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i> *	Macho	<i>Gallus gallus</i>	KP211422.1	1,00E-95	88	São Jerônimo	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	Macho	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	1,00E-94	87	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KF161283.1	4,00E-29	80	Lavras do Sul	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	DQ236097.1	8,00E-57	81	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MG272613.1	6,00E-123	95	Canguçu	Silv
<i>T. carcavalloii</i> *	N5	<i>Homo sapiens</i>	KY410029.1	5,00E-153	99	Canguçu	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	Macho	<i>Mus musculus</i>	AK131583.1	5,00E-123	95	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	MF278018.1	5,00E-138	98	Canguçu	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	Macho	<i>Mus musculus</i>	HQ180173.1	2,00E-121	95	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	Macho	<i>Homo sapiens</i>	MF278018.1	3,00E-155	99	Cachoeira do Sul	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	Fêmea	<i>Mus musculus</i>	KY018919.1	9,00E-166	100	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	Macho	<i>Mus musculus</i>	KY018919.1	2,00E-147	97	Cachoeira do Sul	Silv
<i>T. carcavalloii</i> *	N2	<i>Gallus gallus</i>	AB044986.1	3,00E-86	88	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	3,00E-100	88	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	Macho	<i>Mus musculus</i>	KY018919.1	1,00E-163	99	Cachoeira do Sul	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MF598731.1	3,00E-120	94	Canguçu	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	Fêmea	<i>Mus musculus</i>	HQ180173.1	3,00E-130	94	Cachoeira do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N3	<i>Mus musculus</i>	HQ180173.1	2,00E-137	97	São Jerônimo	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	Macho	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	7,00E-112	93	Cachoeira do Sul	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	N5	<i>Mus musculus</i>	KT376849.1	8,00E-161	99	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	Macho	<i>Mus musculus</i>	HQ180173.1	1,00E-146	99	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-97	88	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	KP211424.1	2,00E-67	83	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-126	92	Canguçu	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-113	91	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	MG027614.1	7,00E-137	97	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-131	94	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i> *	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	4,00E-84	86	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-111	84	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KF964328.1	2,00E-82	88	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	1,00E-130	94	Caçapava do Sul	Silv

<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	7,00E-82	86	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	MG027618.1	5,00E-79	85	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	FM205716.1	1,00E-149	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.*</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-114	91	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-153	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	AY509649.1	1,00E-126	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	4,00E-126	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	1,00E-93	90	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KX534431.1	5,00E-37	83	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KF964328.1	3,00E-110	93	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	KF964328.1	2,00E-97	95	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	2,00E-106	95	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-138	95	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Mus musculus</i>	KT376849.1	2,00E-153	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	FM205716.1	3,00E-130	95	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1	1,00E-70	83	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	3,00E-116	92	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KP211424.1	6,00E-118	93	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	5,00E-124	92	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KF964328.1	5,00E-103	90	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	FM205716.1	1,00E-128	94	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	2,00E-151	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-146	97	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	2,00E-147	97	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	8,00E-136	95	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	5,00E-125	93	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KF964328.1	4,00E-121	93	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	2,00E-147	97	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	2,00E-148	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.*</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	FM205716.1	2,00E-101	89	Caçapava do Sul	Silv
<i>T. carvalhoi</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	3,00E-155	98	Canguçú	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	5,00E-119	92	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	2,00E-127	93	Encruzilhada do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	2,00E-126	97	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-109	90	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KF964328.1	2,00E-97	89	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	2,00E-131	94	Caçapava do Sul	Silv
<i>T. carvalhoi</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	5,00E-154	99	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	2,00E-112	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	KX947009.1	2,00E-83	87	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1	2,00E-33	82	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	FM205716.1	3,00E-150	99	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	2,00E-103	90	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	9,00E-116	92	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Gallus gallus</i>	FM205716.1	7,00E-112	91	Canguçú	Silv



<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Gallus gallus</i>	FM205716.1	1,00E-88	87	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	1,00E-154	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	5,00E-149	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KX987152.1	2,00E-52	81	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	KX534431.1	3,00E-51	80	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AJ971340.1	4,00E-90	90	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AJ401080.1	2,00E-128	94	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	7,00E-152	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	8,00E-83	86	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	3,00E-155	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	MG027618.1	8,00E-47	80	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	9,00E-126	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	3,00E-150	95	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	3,00E-116	91	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	6,00E-108	91	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	7,00E-87	87	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	4,00E-139	96	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-136	94	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	9,00E-111	91	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	5,00E-158	98	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	7,00E-122	94	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-144	96	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	FM205718.1	6,00E-118	92	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	3,00E-130	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	3,00E-106	92	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	AY509649.1	7,00E-142	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.*</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	AY509649.1	1,00E-19	84	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	MG605671.1	1,00E-15	82	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	3,00E-116	92	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-114	92	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	2,00E-117	92	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-134	94	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	3,00E-121	92	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	MG027618.1	2,00E-108	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	6,00E-103	89	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-113	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	MG027593.1	2,00E-137	95	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-123	93	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	4,00E-129	94	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.*</i>	N5	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	2,00E-108	90	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	1,00E-114	91	Encruzilhada do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	3,00E-155	98	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	DQ236093.1	9,00E-156	97	Encruzilhada do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.*</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	AJ971340.1	4,00E-45	82	Canguçu	Silv
<i>T. circummaculata*</i>	Fêmea	<i>Gallus gallus</i>	KP211422.1	3,00E-66	86	São Jerônimo	Silv

<i>T. carcavalloii</i>	N4	<i>Gallus gallus</i>	KJ505835.1	2,00E-43	80	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	LC088151.1	8,00E-102	90	São Jerônimo	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MK165676.1	1,00E-75	88	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<b>Homo sapiens</b>	MG273012.1	8,00E-57	87	São Jerônimo	Silv
			<b>Gallus gallus</b>	DQ512917.1	6,00E-48		
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MH553733.1	9,00E-57	87	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MK434282.1	2,00E-28	79	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KP126150.1	3,00E-126	97	São Jerônimo	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	LC088151.1	1,00E-64	90	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<b>Homo sapiens</b>	DQ236097.1	2,00E-58	86	São Jerônimo	Silv
			<b>Varanus griseus</b>	HM921207.1	2,00E-58		
<i>T. carcavalloii</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KP126143.1	1,00E-90	97	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<b>Acanthodactylus cf.</b>	KX753553.1	3,00E-52	84	São Jerônimo	Silv
			<b>cantoris</b>	LC088151.1	2,00E-78		
<i>T. rubrovaria</i>	Macho	<i>Tupinambis merianae</i>	AF151181.1	5,00E-129	99	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	Fêmea	<i>Homo sapiens</i>	KY645724.1	1,00E-39	80	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Gallus gallus</i>	KY039437.1	3,00E-41	87	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	LC088151.1	6,00E-18	81	Lavras do Sul	Silv
<i>T. rubrovaria*</i>	N5	<b>Conepatus semistriatus</b>	KM047818.1	5,00E-54	89	Lavras do Sul	Silv
			<b>Homo sapiens</b>	KT587622.1	4,00E-50		
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Bos taurus</i>	EU365345.1	1,00E-129	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KU131206.2	2,00E-68	92	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Bos taurus</i>	HQ184040.1	1,00E-79	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KF161899.1	5,00E-08	89	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MH981900.1	6,00E-98	94	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MH981896.1	1,00E-84	88	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-107	96	Caçapava do Sul	Silv
<i>T. rubrovaria</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KY410079.1	4,00E-50	86	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MG273012.1	3,00E-66	87	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	EU597503.1	2,00E-127	94	Lavras do Sul	Silv
<i>T. rubrovaria</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	DQ512917.1	6,00E-118	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Ovis aries</i>	AJ971339.1	3,00E-141	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	6,00E-78	95	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KU683219.1	5,00E-129	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gallus gallus</i>	KY039419.1	3,00E-41	87	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KU683219.1	2,00E-132	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MH981902.1	5,00E-104	90	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-100	94	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MF362915.1	1,00E-15	85	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MG571125.1	2,00E-43	97	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-134	97	Lavras do Sul	Silv
<i>T. carcavalloii</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	8,00E-102	95	Encruzilhada do Sul	Silv

<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	6,00E-153	99	Canguçu	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KU683578.1	2,00E-62	91	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KU683219.1	8,00E-102	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK434283.1	1,00E-140	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	4,00E-115	97	Lavras do Sul	Silv
<i>T. rubrovaria</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	DQ512917.1	9,00E-112	93	Lavras do Sul	<b>Peri</b>
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MG773616.1	2,00E-67	93	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	LC088157.1	2,00E-123	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	DQ851982.1	1,00E-105	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	Fêmea	<i>Homo sapiens</i>	MH449449.1	2,00E-72	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Tupinambis merianae</i>	AF151181.1	3,00E-141	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Conepatus semistriatus</i>	KM047815.1	1,00E-144	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	JX545998.1	1,00E-129	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<b><i>Homo sapiens</i></b>	KP126162.1	2,00E-143	98	Lavras do Sul	Silv
		<b><i>Conepatus semistriatus</i></b>	KM047808.1	6,00E-133	97		
		<b><i>Leopardus tigrinus</i></b>	KP202287.1	2,00E-82	87		
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KP126162.1	2,00E-143	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MH981900.1	4,00E-55	85	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	MH985853.1	6,00E-143	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<b><i>Homo sapiens</i></b>	MH981900.1	2,00E-97	94	Lavras do Sul	Silv
		<b><i>Tupinambis merianae</i></b>	AF151181.1	8,00E-92	93		
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-144	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	Fêmea	<i>Bos taurus</i>	EU365345.1	5,00E-149	99	Lavras do Sul	Silv
<i>T. circummaculata</i>	N2	<i>Coendou prehensilis</i>	MG775435.1	3,00E-04	97	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MG182528.1	1,00E-120	97	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-115	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MH120736.1	3,00E-11	78	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	6,00E-143	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-127	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MH043569.1	4,00E-140	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MH981841.1	1,00E-135	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	DQ236097.1	1,00E-119	94	Lavras do Sul	Silv
<i>T. rubrovaria</i>	N1	<i>Tupinambis merianae</i>	AF151181.1	2,00E-43	81	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	MG407510.1	4,00E-70	84	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MH981900.1	4,00E-120	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MH981900.1	8,00E-102	95	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Tupinambis</i>	AF151181.1	4,00E-125	97	Caçapava do Sul	Silv

		<i>merianae</i>					
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KP126162.1	1,00E-144	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-123	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Capra hircus</i>	FM205715.1	4,00E-160	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Capra hircus</i>	FM205715.1	2,00E-148	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MK128896.1	5,00E-64	87	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<b><i>Homo sapiens</i></b>	KY411465.1	1,00E-130	98	Caçapava do Sul	Silv
		<b><i>Blaptica dubia</i></b>	KU684410.1	9,00E-37	82		
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MH981900.1	2,00E-112	94	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-150	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KU683538.1	7,00E-13	95	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	LC088157.1	2,00E-128	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	LC088157.1	2,00E-137	97	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	MG571125.1	2,00E-34	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-125	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	KU899146.1	5,00E-134	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	5,00E-139	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	DQ236097.1	1,00E-120	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-137	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-139	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	6,00E-148	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-149	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	5,00E-114	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	2,00E-152	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Capra hircus</i>	GU120393.1	4,00E-140	97	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Ovis aries</i>	KX397294.1	2,00E-123	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<b><i>Homo sapiens</i></b>	MG571125.1	5,00E-69	100	Lavras do Sul	Silv
		<b><i>Canis lupus familiaris</i></b>	JX849653.1	1,00E-69	100		
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	5,00E-139	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KX457306.1	2,00E-132	97	Lavras do Sul	Silv
<i>T. rubrovaria</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	5,00E-150	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	AY879467.1	6,00E-163	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Gryllus assimilis</i>	AF248657.1	1,00E-135	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Gryllus assimilis</i>	AF248657.1	1,00E-136	97	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Blaptica dubia</i>	KU684410.1	9,00E-57	85	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<b><i>Blaptica dubia</i></b>	KU684410.1	4,00E-75	84	Lavras do Sul	Silv
		<b><i>Blattella germanica</i></b>	EU854321.1	4,00E-65	83		
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	LC088157.1	6,00E-138	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	LC088157.1	5,00E-134	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Ovis aries</i>	MG407524.1	8,00E-82	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MH120823.1	4,00E-150	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Ovis aries</i>	LC088159.1	4,00E-125	94	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Neacomys sp.</i>	MG262334.1	2,00E-21	89	Lavras do Sul	Silv

<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Ovis aries</i>	JX567783.1	1,00E-149	99	Lavras do Sul	Silv
<i>T. rubrovaria</i>	N3	<b><i>Homo sapiens</i></b>	KY825013.1	4,00E-95	96	Lavras do Sul	Silv
		<b><i>Canis lupus familiaris</i></b>	JX849653.1	1,00E-95	96		
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	2,00E-108	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	MF523115.1	7,00E-123	94	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	2,00E-142	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	KY595649.1	1,00E-124	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	MH981639.1	7,00E-113	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	4,00E-95	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	2,00E-142	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KY941905.1	1,00E-109	96	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Gryllus assimilis</i>	AF248658.1	1,00E-139	97	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Gryllus assimilis</i>	AF248657.1	9,00E-122	96	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KP126157.1	4,00E-145	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Capra hircus</i>	GU120393.1	1,00E-119	92	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	8,00E-157	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	5,00E-139	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	2,00E-158	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	1,00E-155	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	5,00E-154	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-132	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-137	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	6,00E-153	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KY509039.1	1,00E-140	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.	8,00E-157	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	4,00E-132	99	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MG660742.1	5,00E-95	89	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MG660718.1	3,00E-62	83	São Jerônimo	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Bos taurus</i>	EU365345.1	3,00E-147	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	6,00E-141	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KP126157.1	5,00E-150	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MN540499.1	6,00E-84	90	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MF695892.1	2,00E-104	93	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-153	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KP126162.1	2,00E-139	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	1,00E-56	87	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	1,00E-151	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MG660718.1	2,00E-48	85	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	5,00E-130	96	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	6,00E-159	99	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KP126157.1	2,00E-68	89	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	6,00E-139	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KX023905.1	8,00E-128	95	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Capra hircus</i>	MK656968.1	6,00E-164	100	Caçapava do Sul	Silv

<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Capra hircus</i>	MK656968.1	2,00E-164	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Capra hircus</i>	MK656968.1	2,00E-164	100	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	Fêmea	<i>Homo sapiens</i>	KC252383.1	5,00E-35	82	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK248333.1	1,00E-100	89	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KP126150.1	2,00E-33	95	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	6,00E-164	100	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	4,00E-156	98	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	Macho	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	5,00E-160	98	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	3,00E-162	100	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	6,00E-159	99	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	8,00E-143	96	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK930370.1	6,00E-99	91	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	8,00E-153	97	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	6,00E-149	98	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	1,00E-156	99	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	LC088150.1	2,00E-129	93	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-164	100	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	3,00E-162	100	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MF437219.1	5,00E-130	98	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<b>Homo sapiens</b>	KX697544.1	3,00E-137	100	Cachoeira do Sul	Silv
		<b>Canis lupus familiaris</b>	JX849653.1	6,00E-149	99		
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK049277.1	6,00E-68	91	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	5,00E-37	95	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	AY509658.1	5,00E-145	100	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-129	100	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	DQ236097.1	2,00E-148	99	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Mus musculus</i>	KF697004.1	5,00E-84	92	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	1,00E-157	100	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KP126162.1	2,00E-139	98	Cachoeira do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<b>Homo sapiens</b>	MK936800.1	2,00E-88	98	Encruzilhada do Sul	Silv
		<b>Canis lupus familiaris</b>	JX849653.1	2,00E-88	98		
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	1,00E-120	95	Encruzilhada do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	2,00E-149	100	Encruzilhada do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	NG_041830.1	5,00E-60	89	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MF991434.1	6,00E-55	84	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<b>Homo sapiens</b>	MK936800.1	2,00E-149	100	Canguçú	Silv
		<b>Planigale maculata</b>	KX604037.1	2,00E-149	100		
		<b>Canis lupus familiaris</b>	JX849653.1	2,00E-148	99		
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	LC088150.1	2,00E-113	93	Canguçú	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	6,00E-119	98	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<b>Homo sapiens</b>	MK936800.1	1,00E-81	92	Lavras do Sul	Silv

		<b>Canis lupus familiaris</b>	JX849653.1	1,00E-81	92		
		<b>Planigale maculata</b>	KX604037.1	3,00E-82	92		
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<b>Homo sapiens</b>	MK936800.1	3,00E-147	99	Lavras do Sul	Silv
		<b>Planigale maculata</b>	KX604037.1	3,00E-147	99		
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<b>Homo sapiens</b>	DQ236097.1	8,00E-138	98	Lavras do Sul	Silv
		<b>Canis lupus familiaris</b>	JX849653.1	1,00E-135	97		
		<b>Planigale maculata</b>	KX604037.1	1,00E-136	97		
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	2,00E-113	95	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MF437280.1	2,00E-119	95	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Ovis aries</i>	AJ971339.1	4,00E-131	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	DQ236097.1	2,00E-134	97	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	3,00E-67	91	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<b>Homo sapiens</b>	MK936800.1	7,00E-114	99	Lavras do Sul	Silv
		<b>Canis lupus familiaris</b>	JX849653.1	7,00E-114	99		
		<b>Planigale maculata</b>	KX604037.1	7,00E-114	99		
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	6,00E-149	100	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	5,00E-155	100	Lavras do Sul	
<i>Triatoma sp.</i>	N5	<i>Neacomys sp.</i>	MG262334.1	6,00E-20	88	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<i>Homo sapiens</i>	MH981900.1	8,00E-83	96	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Mus musculus</i>	MN627229.1	3,00E-122	99	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	KY645732.1	4,00E-86	92	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MK134334.1	4,00E-35	88	Lavras do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MH553891.1	5,00E-55	89	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Mus musculus</i>	KF697020.1	2,00E-64	92	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MH981900.1	8,00E-143	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Mus musculus</i>	KT376853.1	4,00E-51	89	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N1	<i>Homo sapiens</i>	EF657578.1	6,00E-64	91	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	3,00E-107	96	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<b>Homo sapiens</b>	MK936800.1	1,00E-111	99	Caçapava do Sul	Silv
		<b>Canis lupus familiaris</b>	JX849653.1	1,00E-111	99		
<i>Triatoma sp.</i>	N2	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	6,00E-114	98	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N4	<b>Homo sapiens</b>	MK491411.1	8,00E-108	97	Caçapava do Sul	Silv
		<b>Canis lupus familiaris</b>	JX849653.1	8,00E-108	97		
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	MK936800.1	5,00E-125	96	Caçapava do Sul	Silv
<i>Triatoma sp.</i>	N3	<i>Homo sapiens</i>	KX697544.1	2,00E-129	98	Caçapava do Sul	Silv

## RESEARCH ARTICLE

# Vector competence and feeding-excretion behavior of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi* TcVI

Thaiane Verly<sup>1</sup>, Stephanie Costa<sup>1</sup>, Nathanielly Lima<sup>2</sup>, Jacenir Mallet<sup>2,3</sup>, Francisco Odêncio<sup>4</sup>, Mirian Pereira<sup>4</sup>, Carlos José de Carvalho Moreira<sup>5</sup>, Constança Britto<sup>1,6</sup>, Márcio G. Pavan<sup>6</sup>\*

**1** Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemiptera, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Universidade Iguaçu - UNIG, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Laboratório de Ultraestrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

\* These authors contributed equally to this work.

\* [mgpavan@ioc.fiocruz.br](mailto:mgpavan@ioc.fiocruz.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Verly T, Costa S, Lima N, Mallet J, Odêncio F, Pereira M, et al. (2020) Vector competence and feeding-excretion behavior of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi* TcVI. *PLoS Negl Trop Dis* 14(9): e0008712. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712>

**Editor:** Geoffrey M. Attardo, University of California Davis, UNITED STATES

**Received:** April 3, 2020

**Accepted:** August 13, 2020

**Published:** September 24, 2020

**Copyright:** © 2020 Verly et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** TV received a scholarship of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Finance Code 001) CB was funded by Fundação Getúlio Vargas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ (Cientista do Nosso Estado, grants E-26/202.931/2015 (212770) and E-26/202.782/2018

## Abstract

### Background

Several studies addressed changes on the insect vector behavior due to parasite infection, but little is known for triatomine bugs, vectors of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. We assessed infection rates and metacyclogenesis of *T. cruzi* (TcVI) in fifth-instar nymphs of *Triatoma rubrovaria* comparing with the primary vector *Triatoma infestans*. Also, biological parameters related to feeding-excretion behavior were evaluated aiming to identify which variables are most influenced by *T. cruzi* infection.

### Methodology/principal findings

Fifth-instar nymphs of *T. rubrovaria* and *T. infestans* were fed on mice infected with *T. cruzi* (TcVI). We compared the presence and the number of parasite evolutive forms in excreta of both triatomine species at 30, 60 and 90 days post-infection (dpi) with traditional statistical analyses. Moreover, both species were analyzed through generalized linear models and multinomial logistic regression hypotheses for seven behavioral parameters related to host-seeking and feeding-excretion. *Triatoma rubrovaria* and *T. infestans* had similar overall infection and metacyclogenesis rates of *T. cruzi* TcVI in laboratory conditions. Regarding vector behavior, we confirmed that the triatomine's tendency is to move away from the bite region after a blood meal, probably to avoid being noticed by the vertebrate host. Interspecific differences were observed on the volume of blood ingested and on the proportion of individuals that excreted after the blood meal, revealing the higher feeding efficiency and defecation rates of *T. infestans*. The amount of ingested blood and the bite behavior of *T.*



(237001) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Bolsista de Produtividade, grants 305589/2015-6 and 304309/2019-3) MGP was funded by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ (Auxílio Instalação INCT 2014.2, grant 211.144/2015). We are grateful for the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES, and Fiocruz (Programa Institucional de Internacionalização da Fiocruz PII Int Fiocruz-CAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

*rubrovaria* seems to be influenced by TcVI infection. Infected specimens tended to ingest ~25% more blood and to bite more the head of the host. Noteworthy, in two occasions, kleptohematophagy and coprophagy behaviors were also observed in *T. rubrovaria*.

### Conclusions/significance

Laboratory infections revealed similar rate of *T. cruzi*/TcVI trypomastigotes in excreta of *T. rubrovaria* and *T. infestans*, one of the most epidemiological important vectors of *T. cruzi*. Therefore, TcVI DTU was able to complete its life cycle in *T. rubrovaria* under laboratory conditions, and this infection changed the feeding behavior of *T. rubrovaria*. Considering these results, *T. rubrovaria* must be kept under constant entomological surveillance in Rio Grande do Sul, Brazil.

### Author summary

Chagas disease is caused by the etiological agent *Trypanosoma cruzi* and is mainly transmitted through the excreta of triatomine vectors. It is endemic in Latin America and the Caribbean, affecting ~8 million people. Control programs are based on the elimination of domestic vectors through insecticide-spraying indoors, since there is no vaccine or efficient treatment for chronic patients. However, this strategy is not sustainable where native triatomine species are capable of colonizing peridomestic structures and reinvading human dwellings. Since the 'virtual' elimination of *Triatoma infestans* in Brazil (residual foci remain in Rio Grande do Sul and Bahia), specimens of the native *Triatoma rubrovaria* have been constantly collected inside human dwellings and peridomestic ecotopes in Rio Grande do Sul, southern Brazil, which might represent a real risk for human infections. Here we analyzed a unique and large dataset through classical and modern statistical methods to evaluate *T. cruzi* infection in *T. rubrovaria* and to identify host-seeking, and also feeding/excretion behavioral traits that could be influenced by the parasite. Our results indicated that the parasite infection caused changes in *T. rubrovaria* feeding behavior that could increase *T. cruzi* TcVI transmission. Moreover, this vector species had similar infection rate to one of the main important Chagas disease vectors in South America, *T. infestans*. Therefore, *T. rubrovaria* must be kept under constant entomological surveillance in Rio Grande do Sul, Brazil.

### Introduction

Vector-borne diseases represent nearly 17% of all known infectious diseases and are responsible for ~700,000 deaths annually [1]. Bloodsucking insects play the main role as pathogen transmitters (through their saliva or excreta) to humans. The incidence of a vector-borne disease is determined by several factors, including the density of primary vectors, efficient parasite replication and infectivity in vertebrate and invertebrate hosts, and the presence of susceptible hosts [2, 3].

The dispersion of parasites depends on the behavior of their arthropod vectors [4]. Pathogens can impose a fitness cost in life-history traits of vectors, which can influence parasite transmission [5, 6]. Most of the literature focuses on the costs of parasitism for mosquitoes (e.g. [2, 8]), and very little is known for triatomine bugs (Hemiptera, Reduviidae), vectors of

*Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the etiological agent of Chagas disease (ChD).

ChD affects ~8 million people worldwide and is endemic in Latin America and the Caribbean [1]. Most patients during the acute phase are successful in treatment with trypanocidal compounds, but the treatment of chronic cases only reduces parasitic burden and does not prevent cardiac complications [2]. Therefore, control programs are based on the elimination of domestic vectors through insecticide-spraying indoors [10]. When entomological surveillance ceases, native vectors re-invade dwellings, which might cause a re-emergence of the transmission [11, 12].

The 'virtual' elimination of the primary vector *Triatoma infestans* (Klug, 1834) in Brazil (there are only residual foci in Bahia and the northwest of Rio Grande do Sul, Brazil) largely reduced the incidence and disease burden [12]. However, specimens of the native *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) have constantly been collected inside human dwellings and peridomestic ecotopes in southern Brazil [13, 14]. Moreover, this species (i) has eclectic blood-feeding habitats, being capable of feeding on humans [15]; (ii) was already collected naturally-infected with *T. cruzi* [16]; (iii) excretes trypomastigotes (the infective form of *Trypanosoma cruzi* to humans) in laboratory conditions [17]; and also (iv) has bionomic characteristics that may be favorable to acquire the infection and to transmit the parasite to humans [18].

*Trypanosoma cruzi* is transmitted primarily through the urine/feces (excreta) of infected triatomines [19]. Therefore, host-seeking and probing, and feeding/excretion behaviors are some of the key parameters to determine their vectorial capacity [20]. Recent data show that this parasite causes negative impacts on vector fitness [21], such as impairing fertility, development and survival [22–26]. However, behavioral phenotypes of infected triatomines can be discrepant, with an increase in the locomotor activity of *Triatoma pallidipennis* [27] or a reduction in the activity of *Rhodnius prolixus* [4]. Considering feeding/excretion behavior, it seems that *T. cruzi* infection does not influence the amount of blood ingested by *R. prolixus* or the period of time between blood feeding and excretion [28], but it does for *T. infestans* [29]. Indeed, the impact of *T. cruzi* infection on the phenotype of insect behavior is understudied, requiring further attention [5].

Changes on vector behavior due to parasite infection may contribute to a better understanding of pathogen transmission dynamics. This study evaluates the infection rate and also the rate of metacyclogenesis of *T. cruzi* VI (isolated from field-collected *T. infestans*) in fifth-instar nymphs of *T. rubrovaria* specimens, comparing with the primary vector *T. infestans*. Moreover, it accesses the influence of *T. cruzi* infection on vector behavior parameters related to host-seeking and feeding-excretion.

## Methods

### Parasite culture

The *Trypanosoma cruzi* CL strain (TcVI) used in this study has derived from the excreta of a field-collected *T. infestans* from Rio Grande do Sul, southern Brazil, and was cultivated in Liver-Infusion Tryptose (LIT) medium, containing 10% fetal bovine serum (FBS) at 28°C [30]. Briefly, metacyclic trypomastigotes, harvested from LIT culture at the stationary phase, were used to infect Vero cells. Trypomastigote forms released from *T. cruzi*-infected Vero cells at four days post-infection (dpi) were used to infect Swiss Webster mice.

### Experimental hosts

Male Swiss Webster mice (18 to 20 g), provided by the Institute of Science and Technology in Bio-Models (ICTB/Fiocruz), were maintained in cages (19.56 x 30.91 x 13.34 cm, with four

animals/cage) under controlled humidity and temperature ( $55\% \pm 5\%$  and  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , respectively) and light-dark cycles (12:12 h), with no food restriction. The animals were intraperitoneally infected with tissue-derived trypomastigotes CL strain ( $1 \times 10^4$  parasites/0.1 mL NaCl 0.9%). The parasitemia was daily evaluated after 4 dpi through the Pizzi-Brener method [31]. When reaching parasitemia levels of  $1 \times 10^5$  parasites/mL, the animals were used to feed fifth-instar *T. rubrovaria* and *T. infestans* specimens.

### *T. rubrovaria* and *T. infestans* feeding and infection

Recently-merged fifth-instar nymphs of laboratory-colony reared *T. rubrovaria* (F3 generation) and *T. infestans* (F20 generation) were obtained from the *Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos*, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, and maintained under controlled temperature and relative humidity (RH) conditions, at  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  and 70%, respectively. We chose this developmental stage due to low mortality rate [32], high feeding efficiency [33, 34] and easy handling. For the sake of comparison of infection and behavioral parameters obtained for *T. rubrovaria*, the primary vector *T. infestans* was included in the analysis, due to its high capacity for *T. cruzi* infection and transmission (positive control). As a negative control, we used non-infected *T. rubrovaria* specimens. Non-infected *T. infestans* with TcVI was not included in the analysis, since its bionomy and behavior are well established in the literature (cf. [5] and references therein [29]).

Ten days after molting to the 5th instar, insects were fed on anaesthetized Swiss Webster mice (combined ketamine hydrochloride 100 mg/kg and xylazine chloridrate 10 mg/kg), infected or not with *T. cruzi* CL strain (TcVI). Thirty days post-infection (30 dpi), starved triatomines exposed or not to TcVI were fed again on non-infected anaesthetized mice for behavioral analysis. For each experimental round, a single Swiss Webster mouse was laterally positioned in the presence of five triatomines in a rounded plastic container (12 cm diameter x 4 cm high) covered on the bottom with paper towels. Triatomine nymphs were centered in front of the Swiss Webster mouse's abdomen 7 cm apart, and the blood source was offered for 30 minutes, including the adaptation time of the triatomine to the environment (i.e. the first 10-min period inside the container to recognize the host and start the blood meal, with no separation between the insects and the host). Specimens were replaced when not feeding after this period; notwithstanding, some experimental groups had less than five triatomines feeding on the mouse. The experiment was performed twice, under low artificial and indirect illumination at zeitgeber-time (ZT) 11, which corresponds to near the dusk, the peak of activity of triatomines for foraging [35]. The non-infective blood source was offered again at 60 and 90 dpi. One-hundred and twenty-seven *T. rubrovaria* specimens were used in behavioral analyses, which 58 were infected with *T. cruzi* ( $N_1 = 25$  and  $N_2 = 33$  for the first and second experiments, respectively) and 69 were not infected ( $N_1 = 40$  and  $N_2 = 29$ ), besides the 52 *T. cruzi*-infected *T. infestans* ( $N_1 = 25$  and  $N_2 = 27$ ).

Survived mice were euthanized after the experiments by peritoneal injection of ketamine hydrochloride (300 mg/kg) and xylazine chloridrate (30 mg/kg) in a final volume of 0.5 mL. Dead animals were frozen in a biological discard bag and sterilized at  $121^\circ\text{C}$  for 20 min for final disposal.

### Ethics statement

All animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Institute Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz (Licenses L015/17, LW-28/15 and L028/18).

### Detection of TcVI-infected *T. rubrovaria* and *T. infestans*

Non-infected (*T. rubrovaria*) and infected (*T. infestans*, as a positive control, and *T. rubrovaria*) groups were blood-fed at 30, 60 and 90 dpi. Triatomines' excreta were individually collected after blood feeding and spontaneous defecation in up to 4h. Twenty microliters of the excreta were then diluted in 100  $\mu$ L of 1x phosphate-buffered saline solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) for parasite counting in Neubauer chamber, using optical microscope Primo Star (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 400-X magnification. The morphological classification of *T. cruzi* evolutive forms as epimastigotes or trypomastigotes was based on cell shape, size, width, and motility (cf [36] for further details). We defined as "transitory" all parasites that did not morphologically fit as either forms (*sensu* [37]). In the case of dubious morphology, we changed to a 1000-X magnification and classified according to the position of the kinetoplast in relation to the cell's nucleus and by the emergence of the flagellum [36], whenever these structures were visible. In total, we analyzed the *T. cruzi* infection of 24 *T. rubrovaria* and 27 *T. infestans* specimens.

### Behavioral parameters

Specimens of negative control and TcVI-infected triatomine groups were analyzed individually at 30 dpi for the following parameters: (i) feeding time (min), which is the period between the first insertion of the proboscis into the mouse skin and its final removal (i.e. when insect moves away from the bite site); (ii) excretion time (up to 10 min) after feeding (min); (iii) excreta distance from the bite site (cm); (iv) volume of ingested blood ( $\mu$ L); (v) feeding efficiency (volume of ingested blood / feeding time;  $\mu$ L/min); (vi) excretion efficiency (feeding time / excreta distance; min/cm); and (vii) bite site on Swiss-mouse (head, dorso, tail, abdomen and legs). The amount of ingested blood was calculated through weighing specimens before and after the blood meal on a five-digit precision scale (AY220 model, Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan) and converted to volume with a proportion of 1mg of additional weight after blood feeding = 1  $\mu$ L blood, since the mass of mouse blood is nearly equal to distilled water [38]. We also compared the proportion of individuals that excreted during the experiment between species (*T. rubrovaria* and *T. infestans*), with their status of infection (infected and non-infected), and also with the number of feeding attempts. We have considered a single attempt event when the vector inserted the proboscis into the mouse skin and then removed and walked away from the bite site.

### Statistical analysis

All statistical analyses were conducted in R environment [39] with proper packages. Infection and behavior data were not normally distributed (Shapiro-Wilk tests,  $p < 0.001$ ) and, therefore, we used statistical tests that do not assume this probability distribution. The experimental replicates were not significantly different (non-significative Kruskal-Wallis and Pearson's Chi-squared Test for Count Data) and, therefore, were analyzed together.

**Infection.** Infections of *T. rubrovaria* and *T. infestans* with *T. cruzi* TcVI were analyzed both qualitatively and quantitatively. For each species, the presence/absence of infected triatomines at 30, 60 and 90 dpi, as well as the presence of trypomastigote, epimastigote and transitory *T. cruzi* forms in triatomine-infected excreta, were treated as dummy variables with binary data (qualitative analyses). Pairwise comparisons between *T. infestans* and *T. rubrovaria* were performed with Pearson's Chi-squared Test for Count Data ( $\chi^2$ ), including overall infection (i.e. regardless dpi and *T. cruzi* forms), and differences in the proportion of specimens with distinct parasite forms at the three dpi parameters analyzed.

Parasitic loads (quantitative analyses) were compared with the non-parametric Kruskal-Wallis (H) test, followed by Dunn's multiple tests between 30, 60 and 90 dpi. Wilcoxon-Mann-Whitney W-test was also used to compare the parasite loads in *T. rubrovaria* and *T. infestans* for each time point. The Wilcoxon effect size of comparisons ( $r$ ) was calculated with Rosenthal's formula [40]. The  $r$  value varies from 0 to 1, which 0–0.14 is considered as a small effect, 0.15–0.29 as moderate and 0.30 or higher as a large effect. Significance level was adjusted for multiple comparisons with the false discovery rate (FDR) method [41].

Generalized linear models (GLMs) with binomial distribution were performed with the "Gally" package [42] to identify significant effects of species and dpi (independent variables or predictors) on the presence of each of the different *T. cruzi* forms (dependent variable). The redundancy between predictor variables was accessed through the computation of the variance inflation factor (VIF) with the "car" package [43]. This factor measures how much the variance of a regression coefficient is inflated due to multicollinearity among predictors. Multicollinearity problems consist of including, in the same model, variables with similar predictive relationships with the outcome. VIF values are integer and always positive, and  $VIF < 5$  represents absence of multicollinearity [44, 45]. Therefore, predictors with  $VIF > 5$  were excluded from the analysis, as they would represent redundancy and may compromise model accuracy [44, 46]. Model selection was done through the calculation of second order Akaike's information criterion scores (AICc) with the logit link function in the "AICcmodavg v.2.2" package [47]. Models were ranked and then compared with delta AICc ( $\Delta AICc$ ), for which  $\Delta AICc > 2$  indicated a clear model choice. Moreover, we calculated AICc model weights (Wt), which can be interpreted as the relative likelihood of a model, where Wt near 1.0 means most likely [48]. The strength of the association between each independent variable was expressed by the Odds Ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI).

**Behavior.** The proportion of individuals that excreted during behavioral experiments was compared between species (*T. rubrovaria* and *T. infestans*) and infection status (infected and non-infected *T. rubrovaria*) through Pearson's Chi-squared Test for Count Data ( $X^2$ ). The same statistical method was used to compare the number of feeding attempts. Pairwise comparisons were performed with Wilcoxon-Mann-Whitney W-tests to analyze six behavioral parameters (i to vi, see Behavioral parameters section). Two different tests were performed: W1 –infected *T. rubrovaria* vs. infected *T. infestans*, to infer possible species differences; and W2 –non-infected and infected *T. rubrovaria*, to observe if *T. cruzi* TcVI infection altered any feeding-excretion parameter of this vector. Significance level was adjusted for multiple comparisons with the FDR method [41]. Also, we used the same statistical method to infer if the ingested blood volume was different for specimens that excreted and not excreted after the blood meal.

Generalized linear models (GLMs) assuming Gamma distribution were performed with the "Gally" package [42]. We tested the influence of the variables "species" (*T. rubrovaria* or *T. infestans*) and "infection" (infected or non-infected) on each estimated behavioral parameter (cf. Behavioral parameters section), which resulted in GLMs with seven different dependent variables. Moreover, behavioral traits were also included as independent variables in GLMs to test their effects on dependent variables (Table 1). Only behavioral traits that occurred before or during the dependent variable were included in the analyses as independent variables to avoid spurious associations between traits. For example, feeding time could explain the dependent variable blood volume as they occurred at the same time, but excreta distance could not explain the dependent variable "ingested blood volume", since the former variable is measured after the blood ingestion. All predictors were evaluated for multicollinearity through VIF, calculated with the "car" package [43]. Only non-redundant variables were maintained for model selection using second-order Akaike's information criterion scores (AICc), as described above.

**Table 1. Generalized Linear Models (GLMs) with Gamma distribution tested with different behavioral traits as dependent variables.**

Dependent variables	Independent variables	N <sub>GLM</sub>	K <sub>MAX</sub>	K <sub>BEST</sub>	ΔAIC <sub>c</sub>
Feeding time	Species, infection, <b>ingested blood volume</b>	8	5	4	1.26
Excretion time	Species, infection, <b>ingested blood volume</b> , excreta distance, feeding time	32	7	5	1.15
Excreta distance	Species, infection, <b>ingested blood volume</b> , feeding time, excretion time	32	7	5	0.55
Ingested blood volume	Species, infection, <b>feeding time</b>	8	5	5	0.01
Feeding efficiency	Species, infection, <b>excreta distance</b>	8	5	4	2.33
Excretion efficiency	Species, infection, <b>blood volume</b>	8	5	4	0.62

The independent variables present in the best GLM are in bold. N<sub>GLM</sub>: number of GLMs tested; K<sub>MAX</sub>: maximum number of parameters tested in a single GLM; K<sub>BEST</sub>: number of parameters in the best GLM; ΔAIC<sub>c</sub>: delta Akaike Information Criteria corrected between the best and second best GLM (cf. S1 Table for further details about tested GLMs).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.t001>

Models were ranked and compared with ΔAIC<sub>c</sub> and Wt. The strength of each parameter tested was expressed by the Odds Ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI).

The bite site on Swiss mouse of negative control (non-infected *T. rubrovaria*), tested (infected-*T. rubrovaria*) and positive control (infected *T. infestans*) groups were computed as categorical variables divided in five groups: head, tail, legs, dorso and abdomen. Multinomial logistic regression (MLR) was performed with the "nnet" package [49] to estimate the impact of predictor variables (bite sites) on infected and non-infected conditions. The significance of the regression coefficients was accessed after 2-tailed z-tests.

## Results

### *T. cruzi* infection

Infection results revealed that both triatomine species had similar rates of *T. cruzi* TcVI infection, irrespective of the dpi or parasite form ( $X^2 = 3.5 \times 10^{-34}$ ,  $df = 1$ ,  $p > 0.05$ ). Twenty out of the 24 *T. rubrovaria* specimens fed on infected mice have excreted the parasite (83.3%), as well as 22 out of the 27 *T. infestans* (81.5%). The number of infected triatomines and the parasite load in the excreta were similar between species when trypomastigote and transitory forms of *T. cruzi* TcVI were considered (trypomastigote forms:  $X^2 = 0.09$ ,  $p = 0.77$ , and  $W = 0.03$ ,  $p = 0.86$ ; transitory forms:  $X^2 = 3.27$ ,  $p = 0.051$ , and  $W = 3.08$ ,  $p = 0.054$ ). However, the number of insects with metacyclic trypomastigotes increased in later days post infection, regardless the vector species (GLM: Trypomastigote – dpi, AIC<sub>c</sub> = -91.57, with 72% probability of being the best model; S1 Table). The increasing number of trypomastigotes in infected excreta had strong positive association with time at 60 and 90 dpi (OR = 4.73 and 9.73, respectively; Table 2). The highest loads of metacyclic trypomastigote forms in triatomines' excreta were

**Table 2. Generalized linear model for the presence of metacyclic trypomastigote forms of *T. cruzi* TcVI in the excreta of *T. rubrovaria* and *T. infestans* at different days post infection (dpi).**

Parameters	OR	Estimate	SE	95% CI		P-value
(Intercept)	-	-0.97	0.41	-1.78	0.15	0.02*
60 dpi	4.73	1.55	0.41	0.43	2.68	0.006**
90 dpi	9.73	2.26	2.26	0.75	3.78	0.003**

Note that 30 dpi is not shown, since it was used as the baseline condition. CI: Confidence interval; OR: odds ratio; SE: standard error.

\*  $0.01 < p < 0.05$ .

\*\*  $0.001 \leq p \leq 0.01$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.t002>

also found at these time points ( $H = 18.66$ ,  $p < 0.0001$ ; Dunn's post-hoc 30-60dpi with  $p = 0.021$  and 30-90dpi with  $p < 0.0001$ ; Fig 1A).

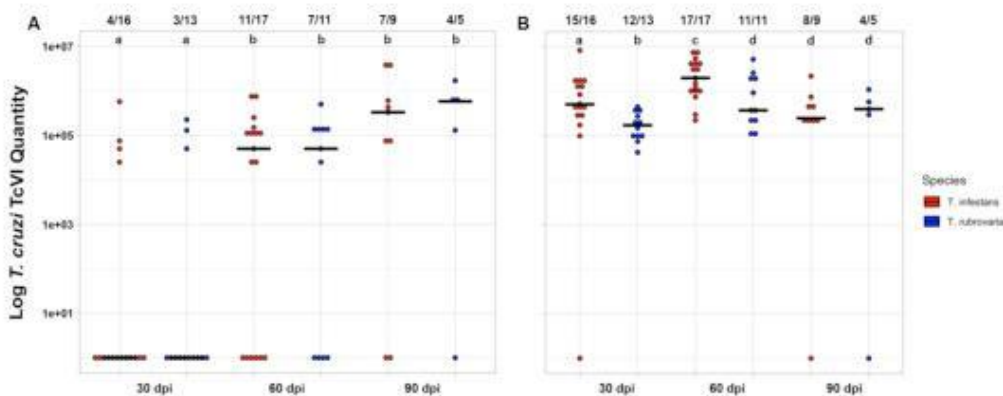
Regarding the epimastigote forms, even though the GLM did not indicate differences between species or dpi for excreta infection rate (S2 Table), the amount of *T. cruzi* TcVI parasites in *T. infestans* excreta was higher than observed in *T. rubrovaria* at 30 and 60 dpi ( $W = 173$  and  $106$ ,  $r = 0.56$  and  $0.41$ , with  $p = 0.002$  and  $p = 0.02$ , respectively) (Fig 1B).

### Vector behavior

**Pairwise comparisons.** The weight of specimens before the experiments had non-significant differences when infection status (non-infected and infected *T. rubrovaria*) and species (*T. rubrovaria* and *T. infestans*) were compared (W-rank sum tests,  $p > 0.1$ ). Therefore, there was no need to normalize the ingested blood volume data (median  $\pm$  standard error  $84.0 \pm 24.2$ ,  $102.5 \pm 14.7$  and  $109 \pm 16.39$  mg, for non-infected and infected *T. rubrovaria* and infected *T. infestans*, respectively).

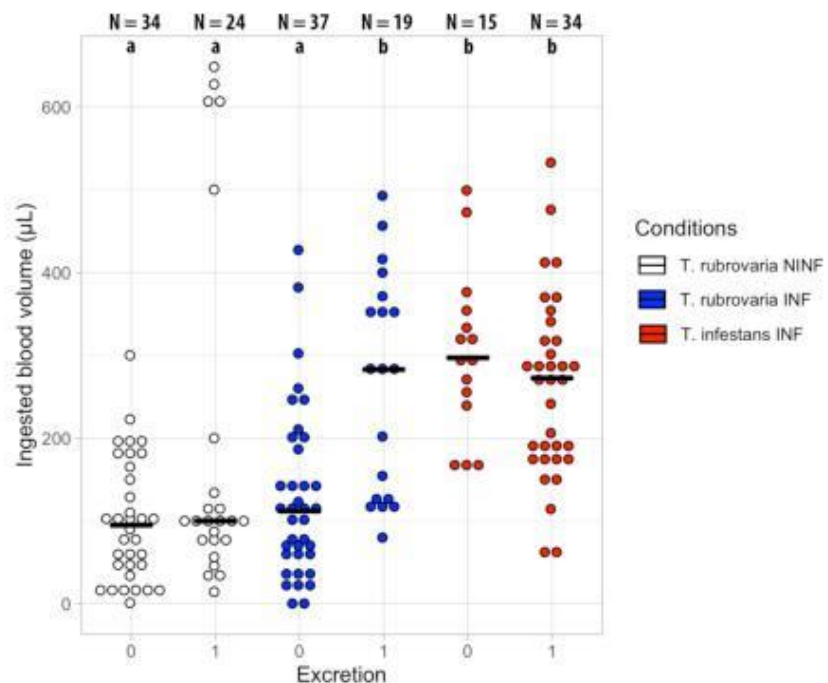
The number of *T. infestans* individuals that excreted during behavioral experiments were proportionally higher than observed for *T. rubrovaria* nymphs (34/49 = 69.4% and 43/114 = 37.7%, respectively;  $X^2 = 12.55$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0.001$ ). The infection status did not influence on the proportion of *T. rubrovaria* individuals that excreted up to 10-min after blood ingestion (24/58 = 41.4% and 19/56 = 33.9% for non-infected and infected specimens, respectively;  $X^2 = 0.39$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.53$ ). For *T. cruzi*-infected *T. infestans* and non-infected *T. rubrovaria*, there was no difference in the amount of blood ingested between individuals of the same species who excreted or not after the blood meal ( $W = 304.5$ ,  $p = 0.29$  and  $W = 332.5$ ,  $p = 0.24$ ); however, *T. cruzi*-infected *T. rubrovaria* individuals that have excreted after the blood meal ingested more blood than those that have not excreted ( $W = 133$ ,  $p < 0.001$ ; Fig 2).

The number of feeding attempts was non-significant when species ( $X^2 = 2.49$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.11$ ) or infection status ( $X^2 = 4.25$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.12$ ) was compared, since the great majority of nymphs made a single attempt to feed on the blood of Swiss-mice (98.3%, 89.9% and 92.3% for non-infected and infected *T. rubrovaria*, and infected-*T. infestans*, respectively). The six



**Fig 1. *T. cruzi* TcVI metacyclic trypomastigote (A) and epimastigote (B) loads in the excreta of *T. rubrovaria* and *T. infestans*.** The number of infected and the total number of specimens analyzed for each condition are shown above each dotplot column. Different lowercase letters on the top indicate statistically significant differences (Kruskal-Wallis test; A:  $p$  (a and b)  $< 0.05$ ; Wilcoxon-Mann-Whitney  $W$ -tests B:  $p$  (a and b) = 0.002 and  $p$  (c and d) = 0.02). dpi = days post infection.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.g001>



**Fig 2.** Ingested blood volume and excretion status (0: Not excreted, 1: Excreted) of non-infected *T. rubrovaria* (NINF), and infected- *T. rubrovaria* (INF) and *T. infestans* (INF). The number of samples analyzed for each condition is shown above each dotplot column. Different lowercase letters indicate statistically significant differences (Wilcoxon-Mann-Whitney W-test,  $p < 0.001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.g002>

feeding-excretion parameters were contrasted to assess possible behavioral differences between *T. rubrovaria* and *T. infestans* and to define what behavior aspects changed due to *T. cruzi* TcVI infection in *T. rubrovaria* (Table 3). Infected and non-infected *T. rubrovaria*, and also infected *T. infestans* had similar feeding time (median 95% CI: 15–28 min; W-tests,  $p > 0.05$ ), excreted at a similar period after blood feeding (median 95% CI: 1–13 min; W-tests,  $p > 0.05$ ) and at a similar distance from the bite (median 95% CI: 1–6 cm; W-tests,  $p > 0.05$ ), resulting in similar excretion efficiency (median 95% CI: 0.3–8.8 min/cm). Two behavioral parameters were different for the two triatomine species (Table 3 and Fig 3). Infected-*T. infestans* specimens ingested more blood than infected-*T. rubrovaria* (median 95% CIs: 239.4–301.3  $\mu$ L and 113.8–198.8  $\mu$ L, respectively;  $W = 733.5$ ,  $p < 0.0001$ ), and thus had higher feeding efficiency (median 95% CIs: 12.8–18.8  $\mu$ L/min and 3.9–9.8  $\mu$ L/min, respectively;  $W = 595$ ,  $p < 0.0001$ ). Although the median of feeding efficiency for infected-*T. rubrovaria* was slightly higher than for non-infected *T. rubrovaria* (6.8 against 4.7  $\mu$ L/min), this difference was not statistically significant ( $W = 1388$ ,  $p = 0.18$ ). Interestingly, the ingestion of blood seemed to be influenced by *T. cruzi* TcVI infection, with higher ingestion of blood for *T. cruzi*-infected than for non-infected *T. rubrovaria* specimens (median 95% CIs: 113.8–198.8  $\mu$ L and 75.0–105.3  $\mu$ L, respectively;  $W = 1208$ ,  $p = 0.016$ ).



**Table 3. Summary statistics and Wilcoxon-Mann-Whitney (W) tests between *T. cruzi* TeVI non-infected and infected *T. rubrovaria*, and infected-*T. infestans*.**

Behavioral parameter	N	Median (95% CI)	W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>
Feeding time (min)	NNR = 58	20.5(17.0–24.0)		1531
	NIR = 69	23.9(18.0–28.0)		
	NII = 52	19.0(15.0–22.0)		
Ingested blood volume (μL)	NNR = 58	100.0(75.0–105.3)	7.335***	<b>1208*</b>
	NIR = 56	126.5(113.8–198.8)		
	NII = 49	282.2(239.4–301.3)		
Excreta distance (cm)	NNR = 24	3.3(1.5–6.0)	283.5	225.5
	NIR = 21	3.0(1.0–5.5)		
	NII = 28	2.0(2.0–3.5)		
Excretion time (min)	NNR = 27	5.0(1.0–8.0)	268	281.5
	NIR = 21	3.0(1.0–6.0)		
	NII = 36	6.0(4.0–13.0)		
Feeding efficiency (μL/min)	NNR = 58	4.7(3.3–5.8)	595***	1388
	NIR = 56	6.8(3.9–9.8)		
	NII = 49	16.7(12.8–18.8)		
Excretion efficiency (min/cm)	NNR = 24	1.2(0.5–8.8)	291	184.5
	NIR = 21	0.8(0.3–2.0)		
	NII = 28	0.7(0.4–2.0)		

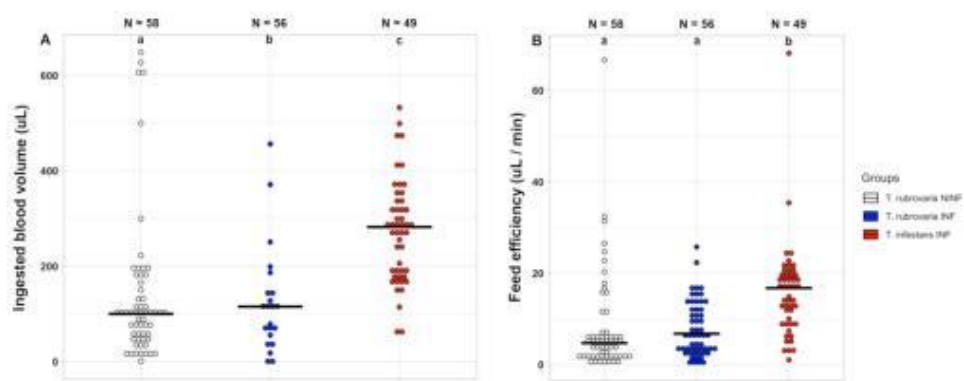
Statistically significant results are highlighted in bold. N: number of samples; N<sub>NNI</sub>: number of non-infected-*T. rubrovaria*; N<sub>IRI</sub>: number of infected-*T. rubrovaria*; N<sub>II</sub>: number of infected-*T. infestans*; W<sub>1</sub>: W tests between infected *T. rubrovaria* and *T. infestans*; W<sub>2</sub>: W tests between infected- and non-infected *T. rubrovaria*.

\* 0.01 < p < 0.05;

\*\*\* p < 0.0001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.t003>

**Generalized linear models.** We fitted 96 GLMs to evaluate which feeding-excretion variables better explain the observed behavior phenotypes of *T. infestans* and *T. rubrovaria* (S3 Table). Three to four different models were comparable ( $\Delta AICc < 2$ ; cumulative Wt = 0.53–0.91) to explain most of the dependent variables, with the exception of “excretion efficiency”.



**Fig 3. Feeding parameters of non-infected *T. rubrovaria* (NINF), and infected *T. rubrovaria* (INF) and *T. infestans* (INF) – ingested blood volume (A) and feeding efficiency (B).** The number of samples analyzed for each condition is shown above each dotplot column. Different lowercase letters indicate statistically significant differences (Wilcoxon-Mann-Whitney W-test; A: p (ab) < 0.05, p (bc and ac) < 0.0001; B: p (ab) < 0.0001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.g003>

Table 4. Behavioral parameter results of the best generalized linear models with different dependent variables.

Variables	OR	Coefficient	SE	95% CI		P-value
<b>Excretion time ~ species + excreta distance + blood volume (N = 69)</b>						
Species ( <i>T. rubrovaria</i> )	<b>0.71</b>	-0.34	0.26	-0.85	0.17	0.194
Excreta distance	<b>1.13</b>	0.12	0.05	0.03	0.21	0.009**
Blood volume	1.00	6.02E-04	7.78E-04	-9E-04	2E-03	0.438
Intercept	NA	1.24	0.34	0.58	1.90	4.5E-04***
<b>Excreta distance ~ infection + excretion time + blood volume (N = 69)</b>						
Infection	1.08	7.75E-02	5.82E-02	-0.04	0.19	0.188
Excretion time	0.99	-9.70E-03	3.93E-03	-0.02	-2E-03	0.017*
Blood volume	1.00	1.67E-05	1.60E-04	-3E-04	3E-03	0.917
Intercept	NA	3.04E-01	5.68E-02	0.39	0.42	1.2E-06***
<b>Blood volume ~ species + infection + feeding time (N = 163)</b>						
Species ( <i>T. rubrovaria</i> )	<b>0.59</b>	-0.51	0.16	-0.83	-0.19	0.001**
Infection	<b>1.20</b>	0.18	0.15	-0.12	0.49	0.238
Feed time	1.01	6.75E-03	3.43E-03	3.2E-05	1.3E-02	0.051
Intercept	NA	5.28	0.21	4.87	5.68	2.0E-16***
<b>Feeding efficiency ~ species + excreta distance (N = 69)</b>						
Species ( <i>T. rubrovaria</i> )	<b>0.52</b>	-0.64	0.21	-1.04	-0.23	0.002**
Excreta distance	1.02	0.02	0.04	-0.05	0.09	0.566
Intercept	NA	2.83	0.20	2.43	3.22	2.0E-16***
<b>Excretion efficiency ~ species + blood volume (N = 80)</b>						
Species ( <i>T. rubrovaria</i> )	<b>0.53</b>	-0.64	0.30	-1.23	-0.05	0.037*
Blood volume	0.99	-1.03E-03	9.62E-04	-3E-03	8E-04	0.287
Intercept	NA	-0.49	0.34	-1.15	0.17	0.153

CI: Confidence interval; OR: odds ratio; SE: standard error; NA: not available.

\*  $0.01 < p < 0.05$ ;

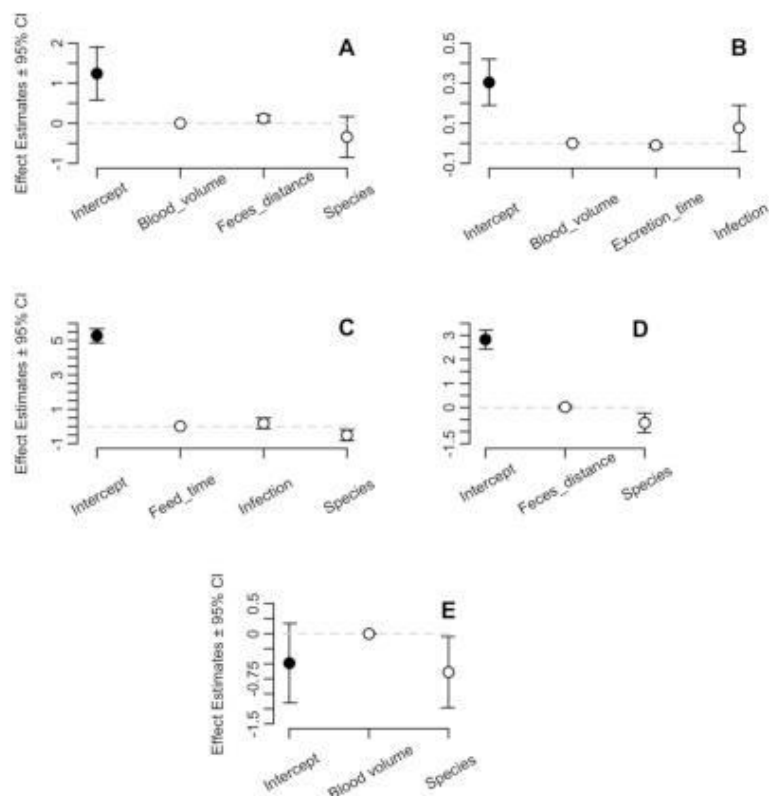
\*\*  $0.001 \leq p \leq 0.01$ ;

\*\*\*  $p < 0.001$ . Colon marks between variable names mean "interacting with". OR > 1.1 or OR < 0.9 are highlighted in bold.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.t004>

in which two models were chosen ("species + blood volume" and "species" only, as independent variables;  $\Delta AICc = 0.62$ ; cumulative  $Wt = 0.53$ ) and "feeding efficiency", for which a single model was selected ("species + excreta distance" as independent variables;  $\Delta AICc = 2.33$ , when compared to the second best model;  $Wt = 0.73$ ). Hence, for the sake of clarity, we decided to show only GLM results for the model with the highest relative likelihood ( $Wt$ ).

The response variable "feeding time" could be explained by three different GLMs using as explanatory variables "species", "infection" and "ingested blood volume"; however, none of the GLM coefficients were statistically significant ( $p > 0.05$ ). When the dependent variable "excretion time" was analyzed, the independent variable "excreta distance" appeared in three out of the four GLMs with higher  $Wt$  (S3 Table) and was positively correlated (GLM coefficient 95% CI: 0.03, 0.21;  $p = 0.009$ ) with mild causal influence (OR = 1.13; Table 4 and Fig 4). The opposite was also observed, with a significant correlation between the independent variable "excretion time" and the dependent variable "excreta distance" (GLM coefficient 95% CI: -0.02, -0.002;  $p = 0.017$ ). However, since the GLM coefficient was near zero (i.e. between -0.1 and 0.1), there was no apparent causal influence on the dependent variable (OR = 0.99).



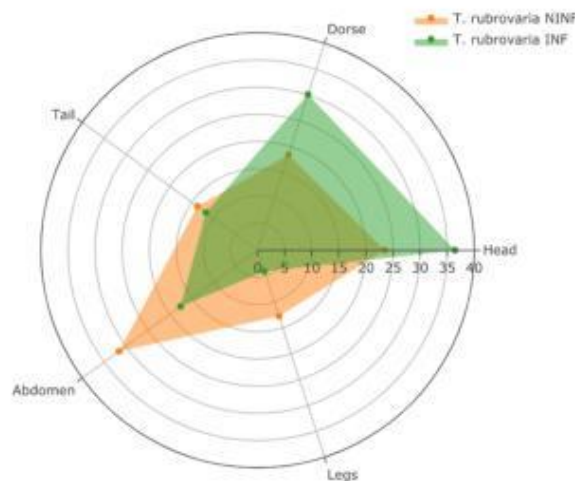
**Fig 4. Model-averaged coefficients ( $\pm$  95% CI) of the independent variables (white dots) and the intercepts (black dots) of generalized linear models.** Excretion time after a blood meal (A), excreta distance from the bite (B), ingested blood volume (C), feeding efficiency (D) and excretion efficiency (E). Dashed line shows  $y$ -axis = 0. Colon marks between variable names mean "interacting with".

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.g004>

*Triatoma rubrovaria* ingested less blood than *T. infestans* (GLM coefficient 95% CI: -0.83, -0.19;  $p = 0.001$ ; OR = 0.59) and, consequently, had lower efficiency on blood feeding (GLM coefficient 95% CI: -1.04, -0.23;  $p = 0.002$ ; OR = 0.52), besides having lower efficiency on excretion (GLM coefficient 95% CI: -1.23, -0.05;  $p = 0.037$ ; OR = 0.53). Indeed, a negative impact of "species" (*T. rubrovaria*) on "excretion time" was observed (OR = 0.71), but GLM coefficient was not significant (95% CI: -0.85, 0.17;  $p = 0.194$ ).

A positive impact of *T. rubrovaria* infection on blood volume was observed (OR = 1.20), which would mean that infected specimens of this species ingested more blood than non-infected ones. It is noteworthy, however, that the GLM coefficient was also not significant (95% CI: -0.12, 0.49;  $p = 0.238$ ).

**Multinomial logistic regression.** Non-infected *T. rubrovaria* ( $N = 58$ ) bit more frequent in the mice's abdomen (31.6%), followed by the head (23.5%) and the dorso (18.4%).



**Fig 5. Radar chart exhibiting the percentage of bites of non-infected (NINF) and infected (INF) *T. rubrovaria* on different parts of mice's body (head, dorso, tail, abdomen and legs).**

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.g005>

Infected-*T. rubrovaria* (N = 69) had a different behavior, biting more the head (36.4%) than the dorso (30.1%) or the abdomen (17.6%) (Fig 5).

The variables "species" and "infection" were tested in four different MLR models aiming to explain the dependent variable "bite site" (S1 Table). The best model considered only infection as an important predictor (MLR: bite site – infection;  $\Delta AIC = 5.93$  when compared to the second model;  $Wt = 90\%$ ). A strong and positive association was observed between *T. cruzi* infection and triatomine behavior of biting the head (OR = 2.94) and the dorso (OR = 2.80), but only the former was considered statistically significant in the model (MLR coefficient  $1.08 \pm 0.55$ ,  $p = 0.03$ ; Table 5). These results suggest that the bite behavior of *T. rubrovaria* specimens changed due to *T. cruzi* TcVI infection. Noteworthy, in two occasions, kleptohematophagy (an unfed individual ingesting 100.2  $\mu$ L of blood and possibly hemolymph from another mouse-fed individual) and coprophagy behaviors (S1 Fig) were observed in *T. rubrovaria* fifth-instar nymphs.

## Discussion

The Brazilian triatomine vector control campaign (1983–1988) and the successful Southern Cone Initiative involving other countries of South America (1991–2000) aimed the eradication

**Table 5. Parameter coefficients for multinomial logistic regression of bite sites.**

Bite sites	Intercept Coefficient	Intercept SE	Infection Coefficient	Infection SE	P-value	OR
Dorso	-0.55	0.68	1.03	0.50	0.05	<b>2.80</b>
Head	-0.56	0.64	1.08	0.55	0.03*	<b>2.94</b>
Leg	-1.06	1.10	0.55	0.78	0.48	0.58
Tail	-0.79	0.82	0.44	0.66	0.51	1.55

SE: standard error; OR: odds ratio.

\*  $0.01 < p < 0.05$ . In bold, OR > 2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008712.t005>

of *T. infestans* through mapping and insecticide-spraying infested peridomestic and dwellings [50, 51]. In southern Brazil, these strategies coupled with community-based vigilance achieved a sharp decline on domestic populations of this species, but also followed by an increase capture of *T. rubrovaria* nymphs and adults in anthropic ecotopes, suggesting that this species in fact begun to establish peridomestic and domestic populations only after the reduction of *T. infestans* populations [13, 14].

In this study, we aimed to evaluate some parameters related to vector competence of *T. rubrovaria* and to identify behavioral traits that could be influenced by *T. cruzi* infection. The results were compared with *T. infestans*, one of the primary vectors of *T. cruzi* in the Southern Cone of South America [52]. *Trypanosoma cruzi* infection (TcVI isolated from *T. infestans* in Rio Grande do Sul, Brazil) and metacyclogenesis rates, and also feeding-excretion parameters were evaluated in fifth-instar nymphs. We found compelling evidence that *T. infestans* and *T. rubrovaria* had similar *T. cruzi* infection rates, and also non-significant differences in most feeding-dejection parameters (feeding time, excretion time after blood meal, excreta distance from bite wound and, thus, excretion efficiency). Specimens of *T. infestans*, however, ingested more than twice the amount of blood that did *T. rubrovaria*, thus confirming higher feeding efficiency, as well as higher excretion rates after a blood meal. Our findings also suggested that *T. rubrovaria* individuals infected with *T. cruzi* TcVI ingested more blood than non-infected conspecifics (~25%) and also changed their biting behavior.

Metacyclogenesis is an *T. cruzi* adaptive differentiation due to nutritional and oxidative stress in the triatomine gut [53]. Therefore, it is unsurprising that vectors and parasites circulating at a same biotope may have a better interaction due to coevolution [54], including higher metacyclogenesis rates [55]. For triatomines and *T. cruzi*, this coevolution would result in successful infections and transmission cycles (i.e. presence of trypomastigote forms in insects' excreta). Experimental infections of *Mepnia pallidipennis* from Morelos, Mexico, with two different strains of TcI—one from Morelos and another from Chilpancingo, Guerrero, Mexico, revealed that the parasite from the different geographic area (Chilpancingo) caused more debilitating effects on the vector, such as affecting their size and causing high parasitemia and low survival rate [24], thus evidencing possible role of genotype-by-genotype interactions [54] on triatomine populations and *T. cruzi* strains of the same geographical area. Hence, here we used a parasite (CL strain, TcVI) isolated from the excreta of field-captured *T. infestans* in Rio Grande do Sul, southern Brazil, same location where *T. infestans* and *T. rubrovaria* were collected, to ensure that the outcomes observed here were not caused by genotype impairments between vector population and parasite strain.

In this work, laboratory-infections of these species with *T. cruzi* TcVI revealed non-significant interspecific differences on the number of infected triatomines or on the parasite load in the excreta when trypomastigote and transitory forms were considered (Fig 1A). The number of triatomines with metacyclic trypomastigotes was significantly higher, as well as trypomastigote loads in the excreta in later days post infection (60 and 90 dpi), regardless the vector species (Table 2 and Fig 1). Therefore, our results warn about the great potential of *T. rubrovaria* to transmit *T. cruzi* TcVI. Interspecific differences were observed in Bolivia for three different vector species infected with *T. cruzi* TcVI (Tulahuen strain). Although the percentage of excreta with trypomastigote forms was similar for *T. infestans*, *T. sonnída* and *T. guasayana* (sylvatic/peridomestic species in Bolivia), *T. infestans* had higher loads of trypomastigotes [56]. Regarding the epimastigote form, *T. infestans* presented here a higher number of this evolutive form at 30 and 60 dpi (Fig 1B). This result is possibly because that *T. infestans* ingested more blood than *T. rubrovaria* (Tables 3 and 4 and Fig 4) and heme (a pro-oxidant molecule released in large amounts upon hemoglobin degradation during blood digestion) seems to be responsible for epimastigote proliferation in a dose-dependent manner [57].

The effects of *T. cruzi* infection on triatomine behavior are scarcely investigated and the few studies available focused on fitness parameters, feeding-excretion behavior, aggregation/geomotaxis and dispersion/locomotion (reviewed in [21], [58], [24], [29]). Feeding and excretion are behavioral parameters of paramount importance, since they determine the efficiency of *T. cruzi* transmission to vertebrate hosts [20]. In our study, non-infected and infected *T. rubrovaria*, and also infected *T. infestans* spent a similar period of time for feeding and excreting after the blood meal, and also they defecated at a similar distance from the bite. Previously, no difference was observed on the first two parameters between non-infected and infected *R. prolixus* collected in Venezuela with a *T. cruzi* TcI strain from the Amazon Basin. Nonetheless, discrepant results were observed for non-infected and infected *T. infestans* from Chaco, Argentina, with a strain of *T. cruzi* TcVI from Tulahuén, Chile. Infected specimens defecated earlier and in greater quantity than non-infected ones [29]. Earlier excretion was also observed for *Mepraia spinolai* (species responsible for *T. cruzi* transmission in arid and semiarid Chile) from Las Chinchillas National Reserve, Chile, infected with *T. cruzi* isolated from the same locality [59].

The amount of ingested blood seems to be positively influenced by *T. cruzi* TcVI infection, with a higher volume ingested by infected-*T. rubrovaria* (median 126.5  $\mu$ L) than by uninfected specimens (median 100  $\mu$ L) (Table 3). Moreover, *T. rubrovaria* specimens infected with *T. cruzi* that excreted during the experiments ingested twice the volume of blood when compared to non-infected *T. rubrovaria* or infected *T. rubrovaria* that did not defecate (Fig 2). The effect of infection on ingested blood volume was marginally observed in GLM, which even though the coefficient of infection was not significant, the odds ratio revealed a mild effect (Table 4). *Trypanosoma cruzi* did not affect the feeding time and probing in *R. prolixus* [28]. Botto-Mahan et al. [59] observed an increased biting rate in *M. spinolai* infected with *T. cruzi* compared to non-infected specimens, although the parasite did not interfere on the time interval until the first feeding attempt [59], or in the volume of ingested blood [60]. Estay-Olea et al. [61] observed for the same triatomine species that nutritional status of uninfected triatomines was higher than that from infected ones, strengthening the hypothesis that triatomines infected with *T. cruzi* need more blood for molting and excreting during/after a blood meal than uninfected individuals, probably to compensate the nutrients consumed by trypanosomes [61].

In close proximity, triatomines are capable of recognizing and being attracted by different host cues, such as host odorants and carbon dioxide, besides their extreme heat sensitivity due to the perception of heat and host-emitted infrared radiation (revised in [5]). In a recent study, third instar *T. pallidipennis* and *T. longipennis* infected with *T. cruzi* Chilpancingo isolate (TcI) were more attracted to compounds that mimic the odor released by the human face than non-infected insects [27]. These data are in agreement with our findings that infected *T. rubrovaria* sting more often in the head (36.4%) than in other body regions of the mice, whereas non-infected specimens bit more frequent in the mice's abdomen (31.6%) (Fig 5). Different multinomial models were assayed for testing the variables "species" and "infection" as predictors of the bite site and the model that considers only infection as an important predictor was the most informative (S4 Table). Despite the multinomial logistic regression has showed a strong association between *T. cruzi* infection and triatomine behavior of biting the head (OR = 2.93) and the dorso (OR = 2.80), only the former was statistically significant in the model (Table 5). The resulting analyses suggest a change on the bite behavior of *T. rubrovaria* caused by *T. cruzi* TcVI infection.

Interspecific differences were observed regarding the proportion of individuals that excreted during the experiment, for which it was higher for *T. infestans* (Fig 2), and the volume of blood ingested, for which this species ingested more than twice of the blood volume of that observed for *T. rubrovaria* (Fig 3A). Consequently, the former species revealed higher feeding

efficiency (Fig 3B). Indeed, the negative correlations between *T. rubrovaria* and the amount of blood ingested and blood uptake efficiency were considerable (Table 4 and Fig 4). Structural and physiological features were already associated with the feeding efficiency of triatomines. Blood suction, for instance, depends on the cibarial pump (a chamber structure with muscles in the head) that promotes a negative pressure, drawing blood up from inside the vessel. It is already observed that *T. infestans* is capable of ingesting higher amounts of blood per contraction of the cibarial pump when compared to *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* [62]. Moreover, differences in the activity of vasodilatory and apyrase (platelet aggregation inhibitor) enzymes present in salivary glands [63, 64], and in hemagglutination and anticoagulant activities in the intestinal contents during feeding [65, 66] also influence blood meal size and thus the feeding efficiency of triatomines on vertebrate hosts. The higher ingestion rate of blood probably explains the shorter molting time of *T. infestans* over *T. rubrovaria* fifth-instar nymphs (64–83 and 110–131 days, respectively) [67, 68] and also a high population density of *T. infestans* inside human dwellings [69]. Since the amount of blood ingested is positively correlated with the volume of the excreta [20], it is also highly probable that *T. infestans* releases more parasites than *T. rubrovaria* during excretion.

The positive association observed in the GLM between the excreta distance from the bite wound and time of excretion after a blood meal (Table 4) is a commonsense feeding-excretion behavior of triatomines, but seldom tested. Our results here confirm that the triatomine's tendency is to move away from the bite region after a blood meal, probably to avoid being noticed/predated by the vertebrate host, which reinforces the low probability estimates of direct transmission of *T. cruzi* from triatomines to humans [21]. *Triatoma rubrovaria* tended to excrete later than *T. infestans*; however, GLM coefficient was not statistically significant, probably due to the wide variance of measurements for this behavioral parameter. Another discrepant result between species was observed for the excretion efficiency parameter, which GLM results showed that *T. rubrovaria* is significantly less efficient (OR = 0.53), but W-tests were not significant (Tables 3 and 4). Our results differed from a previous work [56] which showed that *T. infestans* defecated during the blood meal at about five minutes before ending the blood ingestion. However, some differences in experimental settings should be highlighted, as follows: (i) we analyzed *T. infestans* infected with *T. cruzi*, while Loza-Murguía and Noireau [56] analyzed only non-infected specimens; and (ii) five triatomines were fed at the same time on a single host in this study (leading to some interruptions on blood feeding), while in the other work they individualized the vectors to feed on mice. Therefore, we raise the importance of including an epidemiologically-relevant species in experiments when analyzing a non-model species for comparison purposes.

Triatomines require numerous blood meals to complete their life cycle. Despite being rare [68, 72], coprophagy (the ingestion of stools), kleptohematophagy (blood draw from the gut of another triatomine) and hemolymphagy (to ingest hemolymph from other arthropods) have long been reported by several authors [23]. It has been observed *Triatoma circummaculata* and *T. rubrovaria* drawing hemolymph from wild cockroaches (*Blaptia dubia*) in natural rock piles [74, 75]. It remains unclear, however, if hemolymph as the only food source available is enough to complete their development cycle. In our work it is important to highlight in two occasions, an unfed nymph piercing the intestine of a recently fed nymph to obtain blood, besides having been observed in a single time a nymph feeding on the excreta of another individual. These behaviors were seen while the food source (Swiss mice) was being offered to the insects (S1 Fig). As far as we know, these are the first reports of coprophagy and kleptohematophagy in *T. rubrovaria*. Even with the availability of food source, the fifth-instar nymphs fed on the blood content of an engorged nymph. A recent hypothesis for this cannibalistic behavior is that the rapid intake of warm blood of the vertebrate host by the triatomine raises the

insect's body temperature and consequently, leading to the attraction of unfed individuals to obtain food [26]. In an epidemiological context, the cannibalism could increase the possibility of ingesting the parasite and its further transmission from bug to bug [27].

This work has some caveats that must be bear in mind when interpreting our results. First, there will always be limitations in what the data generated in laboratory conditions can reveal about insect behavior in the field. Insects are submitted in the field to daily environmental oscillations of light, humidity and temperature, as well as vector aggregation that might shape different activity patterns from those observed in laboratory settings [58, 78, 79]. Moreover, laboratory-reared insects can lose the genetic variability observed in the field, probably due to inbreeding and stochastic processes such as founder effects and, thus, do not completely represent field populations [80]. Convincing evidence with experimental data supporting the impacts on behavior of rearing insects in laboratory conditions for many generations is scarce. Although there is a reduction in both body size and sexual dimorphism of laboratory-reared triatomines, which may reflect the high density of vectors in small containers and limited supply of blood meal [81], laboratory-reared populations of insects seem to exhibit similar performance to field populations. Ross et al. [82] observed only negligible changes in the development time, survival to adulthood, fecundity and egg hatch proportion when comparing *Aedes aegypti* populations from 2<sup>nd</sup> and 22<sup>nd</sup> generations. In triatomines, Ortiz et al. [83] observed that *R. prolixus* specimens maintained for over 30 years fed on chicken blood were attracted by human skin extracts in a similar way that F1 insects did. Experiments involving field (or recently field-caught) *T. rubrovaria* in natural or semi-natural conditions should be conducted to evaluate the impact of laboratory conditions on behavioral data.

Second, infections were confirmed and quantified through direct observations of trypanosomes in the excreta, and not through sensitive tools such as qPCR. Therefore, it is possible that we have detected as positive only triatomines with high infections. Although we believe that this limitation did not interfere the comparisons between *T. rubrovaria* and *T. infestans*, we probably excluded from the analyses individuals with low infections that could have different behavioral outcomes. Third, although we used a *T. cruzi* strain isolated from a *T. infestans* individual collected in the same locality of *T. rubrovaria* specimens used in this study, there is no evidence that *T. cruzi* TcVI lineage is infecting *T. rubrovaria* in the field. So far, only *T. rubrovaria* individuals infected with *T. cruzi* TcIII have been captured in the region [16, 84]. Entomological surveillance studies coupled with laboratory infections of *T. rubrovaria* with *T. cruzi* TcIII are needed to identify the *T. cruzi* strains circulating in this vector species and the possible effects of this parasite strain on feeding-excretion behavior.

Fourth, we analyzed feeding and excretion parameters in triatomines only at 30 dpi, when the number of vectors with trypomastigote forms in their excreta was significantly lower than observed at 60 and 90 dpi. Therefore, if behavioral changes observed here were a phenotypic outcome of the infection or a manipulation of triatomines by *T. cruzi* [27], we would expect to observe more significant behavior changes at 60 or 90 dpi. Molecular and histological studies are useful and needed approaches to understand the underlying mechanisms of possible behavioral manipulation [85]. Lastly, contradictory results regarding parasite infection influence on the triatomine behavior probably are associated to the variation in *T. cruzi* strain or genetic lineage used in infection assays and in vector species tested [86]. Moreover, differences in the experimental designs also may have an important contribution [29]. Therefore, there is an urgent need to standardize methodological conditions in future studies on behavioral traits of parasitized bugs to better understand the role of each type of *T. cruzi* on changes of vector behavior traits.



### Epidemiological relevance and concluding remarks

In conclusion, these results based on a unique and large dataset analyzed through classical statistical methods coupled with exhaustive generalized linear model and multinomial logistic regression hypotheses indicate that laboratory *T. cruzi* TcVI infection changed the *T. rubrovaria* feeding behavior. Infected individuals were capable of ingesting more blood than non-infected specimens and bit more often the host's head. Despite the lower percentage of *T. rubrovaria* defecating after the blood meal and the lower volume of ingested blood when compared with one of the main important Chagas disease vectors in South America, *T. infestans*, these vector species shared similar overall infection and metacyclic trypomastigote rates of *T. cruzi* TcVI in their excreta under laboratory conditions, and also shared similar scores for most of the feeding-excretion parameters.

Lent and Wygodzinsky [20] highlighted that although most triatomines are potential vectors of *T. cruzi*, some conditions must be fulfilled to incriminate a species as 'effective vector' to humans, as follows: (i) wide geographical distribution, (ii) being capable of living in human habitations, (iii) anthropophilic behavior, and (iv) short interval between feeding and excretion. *Triatoma rubrovaria* is restricted to northern Argentina, Uruguay and southern Brazil [20] and although an increasing domiciliary and peridomiciliary invasion of *T. rubrovaria* [13, 14], there is no consistent evidence of intradomiciliary colonization, since only few nymphs have been captured inside dwellings [13]. This species has eclectic blood feeding habits, and a low percentage of its individuals was found with human blood content in the gut (1.3–8.0% [15, 87]). Together, these bionomic aspects emphasize the epidemiological findings that *T. infestans* had established larger colonies in southern Brazil and probably displaced *T. rubrovaria* from peridomiciles. However, the similarity between these species related to the overall infection and metacyclogenesis rates of *T. cruzi* TcVI in laboratory conditions and to the feeding-excretion time interval raises epidemiological concerns. The 'virtual' elimination of *T. infestans* probably triggered a recolonization process of human-modified habitats by the native species [14], as observed for other autochthonous species, such as *T. brasiliensis* and *Panstrongylus megistus* in northeastern and southeastern Brazil [69] and, thus, *T. rubrovaria* must be kept under constant entomological surveillance in Rio Grande do Sul, southern Brazil.

### Supporting information

**S1 Fig. Coprophagy.** Fifth-instar nymphs of *Triatoma rubrovaria* feeding on another triatomine's excreta.

(TIF)

**S1 Table. Competitive generalized linear models for the presence of metacyclic trypomastigote forms of *T. cruzi* TcVI in the excreta of *T. rubrovaria* and *T. infestans* at different days post infection (dpi).** K: number of parameters; AICc: Akaike Information Criterion corrected;  $\Delta$ AICc: difference between the AICc of a given model and the highest AICc, which  $\Delta$ AICc > 2 means high support for a given model; Wt: model probability based on Akaike weight. Cum Wt: cumulative model probability based on Akaike weight.

(XLSX)

**S2 Table. Generalized linear model for the presence of epimastigote forms of *T. cruzi* TcVI in the excreta of *T. rubrovaria* and *T. infestans* at different days post infection (dpi).** Note that 30 dpi is not shown, since it was used as the baseline condition. The colon mark (:) means interaction between variables. CI: Confidence interval; OR: odds ratio; SE: standard error. \*  $0.01 < p < 0.05$ ; \*\*  $0.001 \leq p \leq 0.01$ .

(XLSX)

**S3 Table. Competitive generalized linear models for six predicted feeding-excretion variables.** AICc: Akaike Information Criterion corrected;  $\Delta$ AICc: difference between the AICc of a given model and the highest AICc, which  $\Delta$ AICc > 2 means high support for a given model; Wt: model probability based on Akaike weight; Cum Wt: cumulative model probability based on Akaike weight; LL: Log-likelihood of a given model. The models which  $\Delta$ AICc < 2 are highlighted in bold.

(XLSX)

**S4 Table. Competitive multinomial logistic regression models for bite site parameters.**

AIC: Akaike Information Criterion;  $\Delta$ AIC: difference between the AIC of a given model and the highest AIC, which  $\Delta$ AIC > 2 means high support for a given model; Wt: model probability based on Akaike weight; Cum Wt: cumulative model probability based on Akaike weight.

(XLSX)

### Acknowledgments

We thank the Rio Grande do Sul State Center for Health Surveillance for contributions to the fieldwork and to the Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos and Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia de Doença de Chagas, Fiocruz, for the supply of the triatomines and parasites, respectively, used in this study. We also thank Mariana R. David for insightful comments and suggestions in statistical analyses.

### Author Contributions

**Conceptualization:** Thaiane Verly, Mirian Pereira, Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Data curation:** Thaiane Verly, Stephanie Costa, Márcio G. Pavan.

**Formal analysis:** Márcio G. Pavan.

**Funding acquisition:** Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Investigation:** Thaiane Verly, Stephanie Costa.

**Methodology:** Thaiane Verly, Stephanie Costa, Nathanielly Lima, Jacenir Mallet, Francisco Odêncio, Mirian Pereira, Carlos José de Carvalho Moreira, Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Project administration:** Thaiane Verly, Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Resources:** Jacenir Mallet, Mirian Pereira, Carlos José de Carvalho Moreira, Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Software:** Márcio G. Pavan.

**Supervision:** Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Validation:** Thaiane Verly, Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Visualization:** Thaiane Verly, Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Writing – original draft:** Thaiane Verly, Constança Britto, Márcio G. Pavan.

**Writing – review & editing:** Thaiane Verly, Stephanie Costa, Nathanielly Lima, Jacenir Mallet, Francisco Odêncio, Mirian Pereira, Carlos José de Carvalho Moreira, Constança Britto, Márcio G. Pavan.

## References

1. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) 2020 [cited 2020 02 January]. Available from: <https://www.who.int/chagas/en/>.
2. Colley DG. Parasitic diseases: opportunities and challenges in the 21st century. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95 Suppl 1:79–87. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000700015> PMID: 11142732.
3. Jansen AM, Xavier SDC, Roque ALR. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit Vectors*. 2018; 11(1):502. Epub 2018/09/06. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3067-2> PMID: 30189896; PubMed Central PMCID: PMC6127949.
4. Marlière NP, Latorre-Estivalis JM, Lorenzo MG, Camasco D, Alves-Silva J, Rodrigues JO, et al. Trypanosomes Modify the Behavior of Their Insect Hosts: Effects on Locomotion and on the Expression of a Related Gene. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(8):e003973. Epub 2015/08/20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003973> PMID: 26291723; PubMed Central PMCID: PMC4546274.
5. Lazzari CR, Pereira MH, Lorenzo MG. Behavioural biology of Chagas disease vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; 108 Suppl 1:34–47. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130409> PMID: 24473801; PubMed Central PMCID: PMC4109178.
6. Kramer LD, Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol*. 2015; 15:112–8. Epub 2015/12/06. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.003> PMID: 26589343; PubMed Central PMCID: PMC4688158.
7. Nyasembe VO, Teal PE, Sawa P, Tumlinson JH, Borgemeister C, Torto B. *Plasmodium falciparum* infection increases *Anopheles gambiae* attraction to nectar sources and sugar uptake. *Curr Biol*. 2014; 24(2):217–21. Epub 2014/01/09. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.022> PMID: 24412210; PubMed Central PMCID: PMC3935215.
8. da Silveira ID, Petersen MT, Sylvestre G, Garcia GA, David MR, Pavan MG, et al. Zika Virus Infection Produces a Reduction on *Aedes aegypti* Lifespan but No Effects on Mosquito Fecundity and Oviposition Success. *Front Microbiol*. 2018; 9:3011. Epub 2018/12/18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.10.03011> PMID: 30619118; PubMed Central PMCID: PMC6305470.
9. Morillo CA, Main-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015; 373(14):1295–306. Epub 2015/09/01. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574> PMID: 26323937.
10. Abad-Franch F, Ferraz G, Campos C, Palomeque FS, Grijalva MJ, Aguilar MH, et al. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4:e620. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000620> PMID: 20209149.
11. Güntler RE, Kilron U, Cecere MC, Segura EL, Cohen JE. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(41):16194–9. Epub 2007/10/03. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700963104> PMID: 17913895; PubMed Central PMCID: PMC2042184.
12. Abad-Franch F, Pavan MG, Jaramillo-ON, Palomeque FS, Dale C, Chaverra D, et al. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; 108 Suppl 1:92–9. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130434> PMID: 24473808; PubMed Central PMCID: PMC4109185.
13. Almeida CE, Vinhas MC, de Almeida JR, Silveira AC, Costa J. Monitoring the domiciliary and peridomestic invasion process of *Triatoma rubrovaria* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(6):761–8. <https://doi.org/10.1590/s0074-027620000600003> PMID: 11080754.
14. Silveira AC, Martins E. Histórico do controle da transmissão vetorial e situação epidemiológica atual. In: Galvão C, editor. *Vetores da doença de chagas no Brasil*. Zoologia: guias e manuais de identificação series. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia; 2014. p. 10–25.
15. Almeida CE, Duarte R, do Nascimento RG, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) II: trophic resources and ecological observations of five populations collected in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(8):1127–31. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000800011> PMID: 12563478.
16. Martins LP, Marcell A, Castanho RE, Therezo AL, de Oliveira JC, Suzuki RB, et al. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 79(3):427–34. PMID: 18784237.
17. Perlowagora-Szumlewicz A, Moreira CJC. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*-1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89(4):603–18. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761994000400018> PMID: 8524063.
18. Almeida CE, Folly-Ramos E, Agapito-Souza R, Magno-Esperança G, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) IV: bionomic aspects on the vector

- capacity of nymphs. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100(3):231–5. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000300002> PMID: 16113859
19. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed—a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102 Suppl 1:113–22. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007000900018> PMID: 17992371
  20. Lent H, Wygodzinski PW. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. Bulletin of the American Museum of Natural History. 1979; 163:125–520.
  21. Guarnieri AA, Lorenzo MG. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. J Insect Physiol. 2017; 97:66–76. Epub 2016/07/09. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.07.005> PMID: 27401498
  22. 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. 2010; 105(8):1057–60. <https://doi.org/10.1590/s0074-0276201000800018> PMID: 21225208
  23. Nouvellet P, Ramirez-Sierra MJ, Dumontet E, Gourbière S. Effects of genetic factors and infection status on wing morphology of *Triatoma dimidiata* species complex in the Yucatán peninsula, Mexico. Infect Genet Evol. 2011; 11(6):1243–9. Epub 2011/04/14. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.04.008> PMID: 21515410
  24. Cordero-Montoya G, Flores-Villegas AL, Salazar-Schettino PM, Vences-Bianco MO, Rocha-Ortega M, Gutiérrez-Cabrera AE, et al. The cost of being a killer's accomplice: *Trypanosoma cruzi* impairs the fitness of kissing bugs. Parasitol Res. 2019; 118(9):2523–9. Epub 2019/09/05. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06413-8> PMID: 31385028
  25. Elliot SL, Rodrigues J de O, Lorenzo MG, Martins-Filho OA, Guarnieri AA. *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas disease, is virulent to its triatomine vector *Rhodnius prolixus* in a temperature-dependent manner. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(3):e0003646. Epub 2015/03/20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003646> PMID: 25793495; PubMed Central PMCID: PMC4368190
  26. Fellet MR, Lorenzo MG, Elliot SL, Camasco D, Guarnieri AA. Effects of infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* on the reproductive performance of the vector *Rhodnius prolixus*. PLoS One. 2014; 9(8):e105255. Epub 2014/08/19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105255> PMID: 25136800; PubMed Central PMCID: PMC4138117
  27. Ramirez-González MG, Flores-Villegas AL, Salazar-Schettino PM, Gutiérrez-Cabrera AE, Rojas-Ortega E, Córdoba-Aguilar A. Zombie bugs? Manipulation of kissing bug behavior by the parasite *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. 2019; 200:105177. Epub 2019/09/17. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105177> PMID: 31539526
  28. Takano-Lee M, Edman JD. Lack of manipulation of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) vector competence by *Trypanosoma cruzi*. J Med Entomol. 2002; 39(1):44–51. <https://doi.org/10.1093/jmedent/39.1.44> PMID: 11931271
  29. Pereyra N, Lobbia PA, Mougabure-Cuello G. Effects of the infection with *Trypanosoma cruzi* on the feeding and excretion/defecation patterns of *Triatoma infestans*. Bull Entomol Res. 2020; 110(1):169–76. Epub 2019/07/24. <https://doi.org/10.1017/S0007485319000464> PMID: 31337451
  30. Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964; 6:93–100. PMID: 14177814
  31. Brener Z. The apyretic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1962; 4:389–98. PMID: 14015210
  32. Oschev EB, Bar ME, Damborsky MP, Milano AM. [Population statistics of *Triatoma rubrovaria* in laboratory]. Rev Saude Publica. 2005; 39(2):211–6. Epub 2005/05/09. <https://doi.org/10.1590/s0034-8910200500200011> PMID: 15895140
  33. Bar ME, Milano AM, Damborsky MP, Oschev EB, Avalos G. Patrones de alimentación y de defecación de *Triatoma rubrovaria* (Heteroptera: Reduviidae) bajo condiciones de laboratorio. Rev Soc Entomol. 2003; 62:107–13.
  34. Almeida CE, Francischetti CN, Pacheco RS, Costa J. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) III: patterns of feeding, defecation and resistance to starvation. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(3):367–71. Epub 2003/07/18. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000300012> PMID: 12886416
  35. Lazzari CR. Circadian organization of locomotion activity in the hematophagous bug *Triatoma infestans*. J Insect Physiol 1992; 38: 895–903.
  36. Hoare CA. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1972. 749 p.
  37. Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. Parasitol Today. 2000; 16(9):381–7. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(00\)01724-5](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(00)01724-5) PMID: 10951597

38. Vitello DJ, Ripper RM, Fetipace MR, Weinberg GL, Vitello JM. Blood Density Is Nearly Equal to Water Density: A Validation Study of the Gravimetric Method of Measuring Intraoperative Blood Loss. *J Vet Med.* 2015; 2015:152730. Epub 2015/01/29. <https://doi.org/10.1155/2015/152730> PMID: [26464949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26464949/); PubMed Central PMCID: PMC4590883.
39. Team RC. A Language and Environment for Statistical Computing. *Open Journal of Statistics.* 2017; 7.
40. Rosenthal R. Parametric measures of effect size. In: Cooper H, Hedges LV, editors. *The handbook of research synthesis.* New York: Russell Sage Foundation.; 1994. p. 231–44.
41. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann Statist.* 2001; 29:1165–88.
42. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* Springer-Verlag; 2016.
43. Fox J, Weisberg S. *An R Companion to Applied Regression.* 3 ed. Sage Publications; 2019.
44. Yoo W, Mayberry R, Bae S, Singh K, Peter He Q, Lillard JW. A Study of Effects of MultiCollinearity in the Multivariable Analysis. *Int J Appl Sci Technol.* 2014; 4(5):9–19. PMID: [26664257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26664257/); PubMed Central PMCID: PMC4318006.
45. James G, Witten D, Hastie T, Tibshirani R. *An Introduction to Statistical Learning: With Applications in R.* Springer Publishing Company; 2014.
46. Bruce P, Bruce A. *Practical Statistics for Data Scientists.* O'Reilly Media; 2017.
47. Mazerolle MJ. AICcmodavg: Model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c). 2019. R package version 2.0. Available from: <https://cran.r-project.org/package=AICcmodavg>.
48. Burnham KP, Anderson DR. *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach.* 2 ed. New York: 2002.
49. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S.* 4 ed. New York: Springer; 2002.
50. Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(5):603–12. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000500002> PMID: [12219120](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12219120/).
51. Schofield CJ, Dias JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol.* 1999; 42:1–27. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)0147-5](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)0147-5) PMID: [10050271](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10050271/).
52. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006; 22(12):583–8. Epub 2006/10/16. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.011> PMID: [17049308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17049308/).
53. Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *The Journal of parasitology.* 2000; 86(6):1213–8. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1213:DOTCEM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1213:DOTCEM]2.0.CO;2) PMID: [11191893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191893/).
54. Lambrechts L, Fellous S, Koella JC. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.* 2006; 22(1):12–6. Epub 2005/11/23. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.11.008> PMID: [16310412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16310412/).
55. Dworak ES, Araújo SM, Gomes ML, Massago M, Ferreira E, Toledo MJO. Sympatry influence in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with triatomine. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(5):629–37. <https://doi.org/10.1590/s0037-8682-0219-2017> PMID: [29160509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29160509/).
56. Loza-Muñoz M, Noireau F. Vectorial capacity of *Triatoma guayanae* (Wygodzinsky & Abalos) (Hemiptera: Reduviidae) compared with two other species of epidemic importance. *Neotrop Entomol.* 2010; 39(5):799–809. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x201000500020> PMID: [21120391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21120391/).
57. Lara FA, Sant'anna C, Lemos D, Laranja GA, Coelho MG, Reis Salles I, et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 355(1):16–22. Epub 2007/01/23. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.238> PMID: [17292866](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17292866/).
58. Depickère S, Ramírez-Ávila GM, Deneubourg JL. Alteration of the aggregation and spatial organization of the vector of Chagas disease, *Triatoma infestans*, by the parasite *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep.* 2019; 9(1):17432. Epub 2019/11/22. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53986-w> PMID: [31758071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31758071/); PubMed Central PMCID: PMC6874570.
59. Botto-Mahan C, Cattán PE, Medel R. Chagas disease parasite induces behavioural changes in the kissing bug *Mepraia spinolai*. *Acta Trop.* 2006; 98(3):219–23. Epub 2006/06/15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.05.005> PMID: [16780784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16780784/).
60. Botto-Mahan C. *Trypanosoma cruzi* induces life-history trait changes in the wild kissing bug *Mepraia spinolai*: implications for parasite transmission. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9(5):505–10. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0003> PMID: [19128032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19128032/).
61. Estay-Olea D, Correa JP, de Bona S, Bacigalupo A, Quiroga N, San Juan E, et al. *Trypanosoma cruzi* could affect wild triatomine approaching behaviour to humans by altering vector nutritional status. A

- field test. *Acta Trop.* 2020; 210:105574. Epub 2020/06/03. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105574> PMID: 32504588.
62. Guameri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH. Comparison of feeding behaviour of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *J Insect Physiol.* 2000; 46(7):1121–7. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00222-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00222-X) PMID: 10817938.
  63. Araujo RN, Soares AC, Paim RM, Gontijo NF, Gontijo AF, Lehane MJ, et al. The role of saliva and nitrophenols in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol.* 2009; 39(2):83–9. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.10.002> PMID: 18992340.
  64. Ribeiro JM, Schneider M, Issas T, Jurberg J, Galvão C, Guimarães JA. Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Hemiptera). *J Med Entomol.* 1998; 35(4):599–610. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.4.599> PMID: 9701952.
  65. Araujo RN, Pereira MH, Soares AC, Pereira ID, Diotaiuti L, Gontijo NF, et al. Effect of intestinal erythrocyte agglutination on the feeding performance of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae). *J Insect Physiol.* 2009; 55(9):862–8. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.06.002> PMID: 19524599.
  66. Paim RM, Araujo RN, Soares AC, Lemos LC, Tanaka AS, Gontijo NF, et al. Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *Int J Parasitol.* 2011; 41(7):765–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.014> PMID: 21447340.
  67. Damborsky MP, BarME, Goffa D. Life cycle and reproductive patterns of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera: Reduviidae) under constant and fluctuating conditions of temperature and humidity. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(5):433–7. Epub 2005/09/12. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822005000500014> PMID: 16172762.
  68. Durán P, Siñani E, Depickáre S. On triatomines, cockroaches and haemolymphagy under laboratory conditions: new discoveries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016; 111(10):605–13. Epub 2016/10/03. <https://doi.org/10.1590/0074-027801600027> PMID: 27706376; PubMed Central PMCID: PMC5068326.
  69. Pereira MH, Gontijo NF, Guameri AA, Sant'Anna MR, Diotaiuti L. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends Parasitol.* 2006; 22(11):516–20. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.012> PMID: 16971183.
  70. Friesman J, Sherlock IA. Factors controlling the volume of feces produced by triatomine vectors of Chagas' disease. *Acta Trop.* 1983; 40(4):351–8. PMID: 6142833.
  71. Nouvellet P, Dumontel E, Goubrière S. The improbable transmission of *Trypanosoma cruzi* to human: the missing link in the dynamics and control of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(11):e2505. Epub 2013/11/07. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002505> PMID: 24244766; PubMed Central PMCID: PMC3820721.
  72. Ryckman RE. Recent observations of cannibalism in *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). *J Parasitol.* 1951; 37(5 1):433–4. PMID: 14889379.
  73. Jurberg J, Galvão C. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) vectors of Chagas' disease and implications for human health. *Denisia.* 2006; 19:1096–116.
  74. Lorosa ES, Jurberg J, Souza ALA, Vinhaes MC, Nunes IM. Hemodínta de Dytocoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores* 2000; 7:287–96.
  75. Ruas-Neto AL, Corseuil E, Cavalleir A. Development of rupestrian Triatomines (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) following hemolymphagy on Blaberids (Blattodea: Blaberidae) in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Entomologia y Vectores* 2001; 8:205–16.
  76. Lazzari CR, Fauquet A, Lahondère C. Keeping cool: Kissing bugs avoid cannibalism by thermoregulating. *J Insect Physiol.* 2018; 107:29–33. Epub 2018/02/12. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.02.006> PMID: 29447846.
  77. Schaub GA. Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. *Acta Trop.* 1988; 45(1):11–9. PMID: 2896441.
  78. Vanin S, Bhutani S, Montelli S, Menegazzi P, Green EW, Pegoraro M, et al. Unexpected features of *Drosophila* circadian behavioural rhythms under natural conditions. *Nature.* 2012; 484(7394):371–5. <https://doi.org/10.1038/nature10991> PMID: 22495312.
  79. Rivas GBS, Teles-de-Freitas R, Pavan MG, Lima JBP, Peixoto AA, Bruno RV. Effects of Light and Temperature on Daily Activity and Clock Gene Expression in Two Mosquito Disease Vectors. *J Biol Rhythms.* 2018; 33(3):272–88. <https://doi.org/10.1177/0748730418772175> PMID: 29781749.
  80. Gómez-Sucequia LJ, Triana-Chávez O, Jaramillo-Ocampo N. Quantification of the genetic change in the transition of *Rhodnius pallidus* Barber, 1932 (Hemiptera: Reduviidae) from field to laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(6):871–7. <https://doi.org/10.1590/s0074-02782009000600009> PMID: 19876559.

81. Dujardin JP, Panzera P, Schofield CJ. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94 Suppl 1:223–8. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700036> PMID: [10677722](#)
82. Ross PA, Endersby-Harshman NM, Hoffmann AA. A comprehensive assessment of inbreeding and laboratory adaptation in. *Evol Appl*. 2019; 12(3):572–86. Epub 2018/12/17. <https://doi.org/10.1111/evo.12740> PMID: [30828375](#); PubMed Central PMCID: [PMC6383739](#).
83. Oriz MI, Suárez-Rivillas A, Molina J. Behavioural responses to human skin extracts and antennal phenotypes of sylvatic first filial generation and long-rearing laboratory colony *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(4):461–6. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000400013> PMID: [21739035](#).
84. Brenière SF, Waleckx E, Bamabé 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. Epub 2016/08/29. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792> PMID: [27571035](#); PubMed Central PMCID: [PMC5003387](#).
85. Hughes DP, Libersat F. Parasite manipulation of host behavior. *Current Biology*. 2019; 29:R45–R7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.001> PMID: [30688944](#)
86. Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today*. 1991; 7(9):240–4. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90237-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90237-4) PMID: [15463507](#).
87. Salvatella R, Calegari L, Puime A, Basmadjian Y, Ross R, Guerrero J, et al. [Feeding pattern of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Triatominae) in peridomestic habitats, of a rural area of Uruguay]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994; 36(4):311–20. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651994000400003> PMID: [7732361](#).