



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

EDGARD HIROMI KAMIMURA

Estrutura populacional de *Triatoma brasiliensis* de distintos ecótopos e municípios dos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba inferida pela variação morfométrica e molecular

Population structure of *Triatoma brasiliensis* from different ecotopes and municipalities of the states of Rio Grande do Norte and Paraíba inferred from morphometric and molecular variation

CAMPINAS

2020

EDGARD HIROMI KAMIMURA

Estrutura populacional de *Triatoma brasiliensis* de distintos ecótopos e municípios dos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba inferida pela variação morfométrica e molecular

Population structure of *Triatoma brasiliensis* from different ecotopes and municipalities of the states of Rio Grande do Norte and Paraíba inferred from morphometric and molecular variation

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, na Área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Animal Biology in the area of human relations, environment and parasitology.

Orientador: Dr. Carlos Eduardo de Almeida

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO EDGARD HIROMI
KAMIMURA E ORIENTADA PELO CARLOS
EDUARDO ALMEIDA

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

K128e Kamimura, Edgard Hiromi, 1989-
Estrutura populacional de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae) de distintos ecótipos e municípios dos estados brasileiros do Rio Grande do Norte e Paraíba inferida pela variação morfométrica e molecular / Edgard Hiromi Kamimura. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Carlos Eduardo Almeida.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Morfometria. 3. Triatominae. 4. Doença de Chagas. 5. Citocromo b. I. Almeida, Carlos Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Population structure of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae) from different ecotopes and municipalities of the Brazilian states of Rio Grande do Norte and Paraíba inferred from morphometric and molecular variation

Palavras-chave em inglês:

Trypanosoma cruzi

Morphometrics

Triatominae

Chagas disease

Cytochromes b

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestre em Biologia Animal

Banca examinadora:

Carlos Eduardo Almeida [Orientador]

João Aristeu da Rosa

Kaio Cesar Chaboli Alevi

Data de defesa: 06-04-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3053-5247>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/66666666-408585444>

Campinas, 06/04/2020

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Carlos Eduardo Almeida

Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós Graduação em Biologia Animal da Universidade Estadual de Campinas/ Instituto de Biologia.

À minha família e amigos
Dedico

Agradecimentos

Esse trabalho é resultado de uma caminhada de aproximadamente dois anos e meio e, durante esse percurso, surgiram inúmeras dificuldades acadêmicas, pessoais e políticas. Por isso, apesar de todo esforço, estudo e dedicação de minha parte seria impossível chegar ao final dessa etapa se não fossem diversas pessoas que me acompanharam, ajudaram e me apoiaram nesse período e a quem devo meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente agradeço à classe trabalhadora brasileira, responsável por toda produtividade nacional inclusive a acadêmica, tornando possível a realização da pesquisa no país.

Agradeço aos meus pais Márcia e Betão e minha irmã bocó Mariana, quem veem me apoiando e me dando suporte não só nesse período, mas durante toda minha vida.

Às minhas avós, as pessoas que mais me dão motivos para viver e donas de todo amor que cabe em mim, Dona Josefa que, apesar de não estar mais aqui, ainda me faz querer ser motivo de orgulho e exemplo e Dona Kazuco que me ensina a sorrir indiferente a qualquer dor. Vocês são os maiores exemplo de força e humildade que eu tenho, “enquanto eu viver a senhora nunca mais sofre”.

Aos meus padrinhos tio Dinho e tia Lúcia por todo afeto e amor paternal. Aos meus seis primos Lucas, Tenile, Juan, Bruno, Tamires e Giovana que cresceram comigo e me viram crescer e, apesar de todas as diferenças, sempre conviveram comigo como se fossem meus irmãos.

À todos os meus tios que sempre cuidaram de mim como se eu fosse seu próprio filho

À minha Tia Cris e Tia Li, que seguem pelo caminho que eu quero seguir e me inspiram, me dão exemplo e orgulho. Além de todo amor vocês também me desperta uma grande admiração pela dedicação, amor e copetência pela docência.

À minha família de Recife Lucas, Tiago, Etevaldo, Fátima, Ana e Lari que estão comigo a mais de 20 anos me acompanhando em todas as fases da vida sempre me incentivando, torcendo, sorrindo e chorando comigo. Vocês são a família que eu escolhi.

Ao tripé, Pietro, Túlio e Mateus, que sempre levantam minha cabeça, me ajudam, me mostram caminhos, me inspiram e dividiram comigo os dias mais felizes da minha vida.

À Day, a melhor pessoa que eu conheço na vida que possui uma bondade quase inacreditável e sua companhia sempre me conforta. Além de ser a minha melhor amiga é a pessoa mais maravilhosa do mundo.

Ao CBN09 que mesmo longe não deixam o amor esfriar e foram responsável pela melhor fase da minha vida.

À Mariel, a pessoa que é a personificação da arte que me acompanhou e me ajudou muito nesses últimos anos e me inspira sempre querer ser uma pessoa melhor. Sem vocês a vida não teria a menor graça e nem o menor sentido.

Essa jornada começou a partir do momento em que meu orientador Dr Carlos Eduardo de Almeida acreditou que eu seria capaz, aceitou a me orientar e me incentivou a entrar para o mestrado, por isso devo a ele meus sinceros agradecimentos.

À Prof^a. Dra. Patricia Jacqueline Thyssen responsável pelo Laboratório de Entomologia Integrativa (LEI) que acolheu nosso grupo de pesquisa e forneceu uma infraestrutura essencial para realizar qualquer pesquisa.

À Prof^a. Dra. Vera Solferini, responsável pelo Laboratório de Diversidade Genética, que abriu as portas de seu laboratório e nos integrou, facilitando e ajudando nosso trabalho.

Aos meus amigos e colegas de departamento que me ajudaram academicamente, tecnicamente e pessoalmente.

À UNICAMP e o Instituto de Biologia, minha segunda casa desde 2012, por possibilitarem minha pesquisa e formação acadêmica e continuar fazendo pesquisa de ponta com reconhecimento internacional mesmo sofrendo diversos ataques políticos e financeiros.

À todos os trabalhadores do programa de pós graduação que sempre se mostram muito solícitos e empenhados a nos ajudar em quaisquer problemas, dúvidas e dificuldades.

Este trabalho foi desenvolvido graças ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): (i) apoio a Jovem Pesquisador (Processo 16/08176-9), (ii) Bolsas no Brasil - Programa Capacitação - Treinamento Técnico (Processo 17/15210)- e Bolsas no Brasil – Mestrado (18/04205-0). O financiador não teve nenhum papel no desenho do estudo, coleta de dados, análise, decisão de publicação ou preparação da dissertação.

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

Resumo

Em áreas endêmicas da doença de Chagas, o protozoário *Trypanosoma cruzi* circula em diferentes ecótopos: no silvestre, peridomicilar e domiciliar. Um surto chagásico foi notificado recentemente, no ano de 2018, no Estado do Rio Grande do Norte RN, onde o *Triatoma brasiliensis* é o mais importante vetor da doença de Chagas. No presente estudo, populações de diferentes ecótopos no Rio Grande do Norte RN e Paraíba PB, com registros de *T. brasiliensis* foram analisadas utilizando morfometria geométrica (com 13 *landmarks* das asas direitas) e o marcador molecular mitocondrial citocromo b. As análises morfométricas foram baseadas em 698 indivíduos e as moleculares em 220 indivíduos de populações de oito municípios, alcançando 240 km no eixo leste-oeste e 95 km no eixo norte-sul. Para todos os pares de populações foram calculadas as distâncias de Mahalanobis (DM) e o coeficiente de diferenciação molecular (Φ_{ST}). Os resultados foram ilustrados em dendrogramas de DM, Φ_{ST} , além de mapas fatorais de análise de componentes principais e variáveis canônicas. Aplicou-se o teste de Mantel para verificar as correlações entre as matrizes obtidas. A análise morfométrica demonstrou que existe dimorfismo sexual, sendo as fêmeas maiores que os machos, com distância de Mahalanobis significativa ($P < 0,0001$). Também foi observado que os insetos peridomiciliares apresentaram tamanho maior que os silvestres ($P < 0,0001$). Para testar o papel da variação ecotípica versus geográfica na distribuição da variabilidade morfométrica e genética, foram feitos diferentes agrupamentos com as populações. Para ambos os marcadores evidenciaram diferenciação estatisticamente significativa, exceto entre alguns grupos dentro do distrito de Patos, que compreende municípios geograficamente associados. Os testes de Mantel correlacionando distâncias geográficas e morfométrica ou genética mostraram baixa conformidade ($R^2 < 0,35$), indicando que outros fatores, além do isolamento por distância, atuaram na distribuição da variação encontrada. Os mapas fatoriais com as análises de variáveis canônicas definiram as populações somente em microescala geográfica. Esse padrão é possivelmente resultado de eventos demográficos em populações coletadas em um mesmo ponto, tais como gargalos ou efeito fundador.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, morfometria geométrica, triatomíneos, doença de Chagas, citocromo B

Abstract

In endemic areas of Chagas disease, the protozoan *Trypanosoma cruzi* circulates in different ecotopes: in the wild, in the peridomicillary and in the domestic. A Chagasic outbreak was recently reported in 2018 in the State of Rio Grande do Norte RN, where *Triatoma brasiliensis* is the most important vector of Chagas disease. In the present study, populations of different ecotopes in the Rio Grande do Norte RN and Paraíba PB, where there are records of *T. brasiliensis* that were analyzed using geometric morphometry (with 13 landmarks on the right wings) and the molecular marker cytochrome b. The morphometric analyses were based on 698 individuals and the molecular analyzes on 220 individuals from populations of eight municipalities, ranging 240 km on the east-west axis and 95 km on the north-south axis. For all pairs of populations, the Mahalanobis distances (DM) and the molecular differentiation coefficient (Φ ST) were calculated. The results were illustrated in DM, Φ ST dendrograms, in addition to factorial maps of principal components (PCA) and canonical variate (CVA) analysis. The Mantel test was applied to verify the correlations between the matrices obtained. Morphometric analysis showed that sexual dimorphism exists, with females being larger than males, with a significant Mahalanobis distance ($P < 0.0001$). It was also observed that the peridomestic insects were larger than the wild insects ($P < 0.0001$). To test the role of ecotypic versus geographic variation in the distribution of morphometric and genetic variability, different groupings were made with the populations. Both markers showed statistically significant differentiation, except between some groups within the district of Patos, which comprises geographically associated municipalities. Mantel tests correlating geographic and morphometric or genetic distances showed low conformity ($R^2 < 0.35$), indicating that factors, other than isolation by distance acted in the distribution of the variation found. The factorial maps with the CVA defined the populations only in geographic microscale. This pattern is possibly the result of demographic events in populations collected at the same point, such as bottlenecks or a founding effect.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, geometric morphometry, triatomines, Chagas disease, cytochrome B

Sumário

1. Introdução.....	13
1.1. Os vetores da doença de Chagas, com destaque aos que ocorrem no Rio Grande do Norte	14
1.2. <i>Triatoma brasiliensis</i> , o vetor da doença de Chagas mais importante do semiárido nordestino	15
1.3. A estrutura genético-fenotípica populacional.....	17
2. Justificativa	18
3. Objetivos	19
3.1. Geral.....	19
3.2. Específicos.....	19
4. Metodologia	19
4.1. Coletas de triatomíneos.....	19
4.2. Morfometria.....	21
4.2.1. Marcos anatômicos	22
4.2.2. Análises estatísticas.....	23
4.3. Análises moleculares.....	23
4.3.1. Isolamento do DNA.....	23
4.3.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR).....	24
4.3.3. Análise da distribuição da variação molecular	25
4.3.4. Estrutura genética.....	26
4.3.5. Neutralidade e seleção.....	26
4.4. Correlação entre matrizes.....	27
5. Resultados.....	27
5.1. Morfometria Geométrica.....	27
5.2. Distribuição da variação morfométrica	32
5.2.1. Variação populacional.....	32
5.2.2. Análises das Variáveis Canônicas (CVAs) em microescala geográfica	39
5.3. Resultados das análises moleculares	50
5.3.1. Testes de neutralidade e estatísticas de variação molecular	53
5.3.2. Estrutura genética.....	55
5.4. Correlação entre matrizes.....	55
6. Discussão	56

7. Conclusões.....	62
8. Anexos.....	71
8.1. Declaração de bioética/biossegurança	71
.....	71
8.2. Declaração de direitos autorais	72

1. Introdução

A doença de Chagas está entre as doenças negligenciadas mais importantes em países latino-americanos, tanto pelo impacto sobre a economia, quanto pela carga que representa para os sistemas de saúde pública. A transmissão ocorre, classicamente, pela via vetorial, por insetos pertencentes à subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) infectados por *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) - o agente etiológico da doença. Embora sua incidência tenha declinado nas últimas décadas devido aos intensos programas de combate ao principal vetor domiciliado - *Triatoma infestans* (Klug, 1834) - estima-se que seis a oito milhões de pessoas ainda estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina (WHO, 2020). Além de ser classificada pela Organização Mundial de Saúde (WHO) como uma das 17 doenças negligenciadas mais importantes, causando, aproximadamente, 12 mil óbitos por ano (WHO, 2010; Lee et al., 2013), essa enfermidade contribui significativamente com a carga global de doenças cardiovasculares, sendo a principal responsável pela cardiomiopatia infecciosa no mundo (Martins-Melo et al., 2012; Cucunubá et al., 2016). No Brasil, o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) foi intensificado a partir da década de 80 e no final da década de 90 o país foi considerado livre da transmissão vetorial por *T. infestans* (Abad-Franch et al., 2013). Entretanto, segundo Costa et al. (2003), esse vetor nunca alcançou o estado do RN, onde focos hiperendêmicos de transmissão por vetores nativos foram registrados no passado (Lucena, 1970). Tal registro não deixa dúvidas sobre o papel dos vetores autóctones na transmissão vetorial. Como o PCDCh foi implementado em todo o Brasil, a transmissão da doença de Chagas por vetores nativos também diminuiu drasticamente, tendo sido considerada praticamente interrompida (Ostermayer et al., 2011).

Recentemente (2018), um surto chagásico foi oficialmente registrado pelo Sistema de Vigilância Sanitária no estado do RN com 18 casos confirmados após a investigação de 21 casos suspeitos, tendo sido atestados, inclusive, três óbitos (Vargas et al., 2018). Os casos foram registrados nos municípios de Tenente Ananias, Marcelino Vieira, Alexandria e Pilões, sendo que dez ocorreram em Marcelino Vieira. Todos estes municípios localizam-se no sudoeste do estado do RN, cerca de 17 a 30 km entre eles, o que levou à

suspeita de que os pacientes tenham se infectado em um mesmo evento (Vargas et al., 2018), o que levou os autores acreditarem que *T. brasiliensis*, Neiva, 1911, tenha contaminado caldo de cana ingerido por moradores. Barbosa-Silva et al. (2016) e Lilio et al. (2017) reportaram insetos infectados dentro dos domicílios no RN e ambos os autores relataram a presença de densas colônias peridomiciliares e com altas prevalências de infecção natural. Em um sítio em particular, Lilio et al. (2017) encontraram uma população peridomiciliar numerosa (N=89 insetos coletados) de *T. brasiliensis*, com 86,7% (26 dos 30 analisados) de prevalência de infecção natural por *T. cruzi*. Dessa forma, a possibilidade de transmissão vetorial ativa na região não pode ser descartada. Todavia, independentemente da via de infecção do surto no RN Norte, tal situação pode ter sido propiciada pela preocupante proximidade física entre vetores infectados por *T. cruzi* e o homem.

1.1. Os vetores da doença de Chagas, com destaque aos que ocorrem no Rio Grande do Norte

No Brasil são registradas 65 espécies de triatomíneos, mas poucas exibem comportamento sinantrópico (Galvão and Jurberg, 2014); cinco espécies (*T. infestans*, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* (Corrêa & Espínola, 1964) e *T. sordida* (Stål, 1859)) infestam comumente ecótopos domiciliares, o que as torna importantes sob o ponto de vista epidemiológico. O Nordeste brasileiro, uma das regiões mais pobres e subdesenvolvidas do Brasil, é considerado importante na epidemiologia da endemia por ser área de infestação por *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*, triatomíneos autóctones e dispersos em todo o semiárido nordestino (Costa et al., 2003; Silveira e Dias, 2011). Essas duas espécies tornaram-se particularmente importantes por serem encontradas frequentemente infestando os intradomicílios, além de se apresentarem naturalmente infectadas por *T. cruzi* (Costa et al., 2003a; Barbosa-Silva et al., 2016; Lilio et al., 2017). Entretanto, *T. pseudomaculata* está mais associada a aves, que são refratárias ao *T. cruzi*, formando colônias com prevalências de infecção natural mais baixas, especialmente em galinheiros (Sarquis et al., 2004). Por outro lado, *T. brasiliensis* é encontrado com mais frequência infestando o intradomicílio (Silveira e Dias, 2011), sendo, portanto, considerado o principal vetor da doença de Chagas no nordeste brasileiro (Costa et al.,

2003a). Essa espécie está intimamente associada a mamíferos, especialmente roedores e cabras (Valença-Barbosa et al., 2015, 2014). Como Lillioso et al. (2017) encontraram populações densas de *T. brasiliensis* no peridomicílio e com alta prevalência de infecção natural por *T. cruzi* (inclusive no intradomicílio) no RN, os autores sugeriram o possível envolvimento desse vetor no surto chagásico do estado.

1.2. *Triatoma brasiliensis*, o vetor da doença de Chagas mais importante do semiárido nordestino

O grupo liderado pela Dra. Jane Costa, do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz, iniciou em 1997 um estudo amplo para entender as relações entre “populações” de *T. brasiliensis* que ocorriam no semiárido do Nordeste brasileiro. O grupo desenvolveu uma série de estudos sobre a biologia, ecologia, distribuição geográfica, filogenia, entre outros (Costa et al., 1997a, 1997b; 2003a, 2003b, 2009, 2014, Monteiro et al., 2004), para avaliar as diferenciações observadas na variação cromática e de distribuição geográfica. Com base nos resultados obtidos, o “complexo de espécies *T. brasiliensis*” foi proposto como um grupo monofilético que apresentava variações cromáticas de *T. brasiliensis*, sendo, na ocasião, denominadas populações “brasiliensis”, “juazeiro” e “melanica”. O resultado do conjunto de estudo liderado pela Dra. Costa foi uma revisão taxonômica detalhada das “populações” de *T. brasiliensis* s.l.. Assim, alguns membros foram elevados ao *status* taxonômico específico, como *T. juazeirensis* (Costa and Felix, 2007) e *T. melanica* (Costa et al., 2006), e outros ao *status* subespecífico, como *T. brasiliensis brasiliensis* e *T. b. macromelasoma*, Galvão, 1956 (Costa et al., 2013). Foi também observado que membros do complexo apresentam importância epidemiológica distinta, conforme enfatizado por Costa et al. (2003a). Em seguida, *T. sherlocki* (Papa et al., 2002) foi incluído nesse complexo de espécies por Mendonça et al., (2009) a partir de informações da variação nos genes mitocondriais citocromo B (Cyt B) e 16S.

Posteriormente, *T. bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 foi revalidada por meio de análises comparativas com *T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967 (com base em morfologia, morfometria, citogenética e cruzamentos experimentais) e ambas foram incluídas no complexo a partir de dados filogenéticos com Cyt B (Mendonça et al., 2016). Finalmente, em 2017, *T. petrocchiai* (Pinto & Barreto,

1925) foi incluído neste grupo, por meio de um estudo que confrontou informações morfométricas e moleculares (variação em múltiplos genes mitocondriais: 12S + 16S + COI + Cyt B) (Oliveira et al., 2017).

Dentre os vetores brasileiros de *T. cruzi*, *T. b brasiliensis* (doravante referido por *T. brasiliensis* para simplificação) se destaca como importante desafio operacional, pois é uma das espécies mais domiciliadas do Brasil (Costa et al., 2003a). Esse triatomíneo, após o tratamento domiciliar com inseticidas, podendo infestar domicílios dentro de seis meses (Silveira et al., 2001b, 2001a). Em seu ambiente natural, *T. brasiliensis* ocorre principalmente em afloramentos rochosos — formações comuns no semiárido nordestino (Lent and Wygodzinsky, 1979). Por meio do estudo da distribuição da variação no fragmento do gene Cyt B, Almeida et al. (2008) demonstraram fluxo gênico entre populações de *T. brasiliensis* provenientes de sítios tratados com inseticidas e àquelas que infestam domicílios adjacentes, sugerindo que as infestações poderiam ser representadas por populações residuais que se recuperaram das borrifações. Mais recentemente, Almeida et al. (2016) utilizaram os microssatélites – marcadores que apresentam maior resolução para estruturação genética em microescalas geográficas – combinados com a variação no gene Cyt B, e demonstraram importante fluxo gênico entre populações silvestres provenientes de afloramentos rochosos e domiciliares em Caicó (RN). Os autores apontaram para um cenário preocupante sob o ponto de vista do epidemiológico, pois as populações silvestres representam focos incontroláveis e perenes de reinfestação domiciliar e apresentaram altas prevalências de infecção natural por *T. cruzi* no estado do RN estado: todas com prevalência superior a 52%.

Lilioso et al. (2017) desenvolveram um estudo em uma série de municípios do estado da Paraíba (PB) e RN, para tanto utilizaram indicadores entomológicos e de infecção natural por *T. cruzi*. Esses autores demonstraram que as populações de *T. brasiliensis* provenientes do RN possuíam prevalências de infecção natural por *T. cruzi* muito mais elevadas que as da PB em todos os ecótopos. Eles revelaram que as populações paraibanas silvestres de *T. brasiliensis* possuíam 6,3% de infecção natural, contra os 72% no RN. Panorama similar foi observado para populações peridomiciliares e

domiciliares: ao passo que nenhum inseto foi encontrado infectado nesses ambientes na PB; no RN as prevalências foram de 30% a 40% para as populações domiciliares e peridomiciliares, respectivamente. A preocupante proximidade entre populações de *T. brasiliensis* — com altas prevalências de infecção natural por *T. cruzi* — e humanos pode desencadear transmissões ativas ou mesmo surtos de contaminação oral da doença de Chagas, como alertado por Lillioso et al. (2017).

1.3. A estrutura genético-fenotípica populacional

O fenótipo é o produto da interação entre genes e ambiente. A variação fenotípica é então um resultado esperado por mais de um fator, que nada mais é do que a combinação da transcrição de genes influenciados pelo meio. O fenótipo expresso por caracteres morfológicos apresenta variações mensuráveis da estrutura genética, mas também sofrem influência de forças fisiológicas, comportamentais, ambientais, da microbiota, entre outras. Técnicas morfométricas visam medir o tamanho, a forma e a relação entre tamanho e forma (alometria). Em entomologia médica, a morfometria geométrica tem sido mais amplamente aplicada para estudos direcionados às relações entre espécies (sistemática beta) (Dujardin, 2017).

No contexto da sistemática gama, a migração entre populações naturais visa avaliar o intercâmbio de indivíduos entre subpopulações. Essa avaliação é denominada "estrutura populacional", que deve ser distinguida da estrutura "genética" — que é definida pelo nível quantitativo de fluxo gênico entre as subpopulações. A primeira abordagem (estrutura populacional) pode ser explorada por uma série de técnicas não moleculares, como a morfometria geométrica. Já o fluxo gênico pode quantificar com mais precisão a migração, apresentando algoritmos com resolução para avaliar o número de migrantes por geração (Wright, 1934; Slatkin, 1985). Apesar das diferenças na natureza das técnicas para mensurar a estrutura genético-fenotípica, o fenótipo é — na generalidade dos casos — influenciado predominantemente pela carga genética. Portanto, é esperado certa conformidade nos resultados de marcadores fenotípicos e genotípicos (Dujardin, 2017).

Segundo Dujardin (2017), o problema na utilização corriqueira dos marcadores genéticos se deve a uma série de fatores, tais como: (i) eles são

relativamente caros, (ii) precisam de infraestrutura apropriada e (iii) não são implementados na rotina do entomologista clássico. Assim, a morfometria geométrica moderna vem sendo considerada por alguns como metodologia capaz de complementar ou mesmo de substituir (em alguns casos) os marcadores moleculares. Entretanto, sua aplicação nesse sentido requer cautela, pois o fenótipo pode ser influenciado pelo meio e pelas dificuldades na reprodutibilidade. O viés da reprodutibilidade da abordagem morfométrica pode ser exemplificada pelo “efeito do usuário” (Dujardin et al., 2010). Entretanto, apesar das críticas, a técnica é indubitavelmente uma candidata para se selecionar previamente o que (e como) deve ser explorado pelos marcadores genéticos, pois a morfometria geométrica moderna apresenta uma série de vantagens, tais como: (i) o rápido processamento, (ii) baixo custo e (iii) fácil disseminação (Dujardin, 2017).

Marcadores morfométricos podem ser aplicados na sistemática alpha, beta e gamma, ou seja, fornecem informações sobre eventos tanto macro, quanto microevolutivos. Alguns estudos com mosquitos (Falconer and Mackay, 1996) e triatomíneos (Schachter-Broide et al., 2004; Gaspe et al., 2013) e com moscas tsé-tsé (Bouyer et al., 2007; Solano et al., 2010; Kaba et al., 2012), trouxeram argumentos encorajadores para usar a morfometria geométrica como ferramenta para examinar a estrutura populacional e possibilitar inferências sobre os padrões de migração (Dujardin 2007).

A combinação de resultados de marcadores fenotípicos e genotípicos já foi vastamente explorada para o grupo dos triatomíneos (ex: Dumonteil et al., 2009; Almeida et al., 2009). Para o complexo *T. brasiliensis*, os marcadores moleculares já foram amplamente utilizados isoladamente, baseados na variação de genes do DNA mitocondrial (Monteiro et al., 2004; Almeida et al., 2008, 2016; Gardim et al., 2014). Para este complexo de espécies, os marcadores moleculares e morfométricos também já foram combinados (Borges et al., 2000; Costa et al., 2016; Oliveira et al., 2017), mas não sob o enfoque da sistemática gama, com um grande número amostral e a larga abrangência geográfica aqui apresentada para *T. brasiliensis*.

2. Justificativa

No semiárido nordestino, *T. brasiliensis* representa um desafio operacional, por infestar persistentemente os domicílios. A determinação dos focos de infestação desse vetor pode ser inferida pelo reconhecimento da distribuição da variação morfométrica e genética de populações provenientes de distintos pontos e ecótopos. As técnicas combinadas podem fornecer medidas quantitativas das variações, sendo fortes aliadas na compreensão dos corredores de dispersão ou superfícies de resistências de triatomíneos ao longo da paisagem.

3. Objetivos

3.1. Geral

- Reconhecer a estrutura populacional de *T. brasiliensis* em áreas de alta pressão de infestação domiciliar nos estados do RN e PB com marcadores morfométricos e moleculares.

3.2. Específicos

- Determinar a estrutura populacional de *T. brasiliensis* em micro e macroescala geográfica pelas variações morfométricas e moleculares;
- Inferir sobre os focos de reinfestação domiciliar e peridomiciliar pelo reconhecimento do padrão de migração da espécie via medidas morfométricas e moleculares;
- Confrontar os resultados das técnicas moleculares e morfométricas sobre a estrutura populacional;
- Avaliar a influência das forças geográficas e ecotípicas na distribuição da variação morfométrica e molecular.

4. Metodologia

4.1. Coletas de triatomíneos

As coletas dos triatomíneos foram realizadas no estado do RN, nos municípios de Caicó, Currais Novos e Marcelino Vieira e no estado da PB, nos municípios de Condado, Cajazeiras, São José dos Espinharas, São Mamede e Emas (Figura 1), compreendendo 240 km (Leste-Oeste, $-38^{\circ}35'27,6''$ a $-36^{\circ}29'09,6''$) e 95 km (Norte-Sul, $-06^{\circ}58'48,0''$ a $-06^{\circ}08'49,2''$ S). As capturas

foram feitas no período diurno e noturno por meio de buscas ativas por método de exaustão com auxílio de luvas, pinças e lanternas em março de 2016 (exceto de Marcelino Vieira, em março de 2017). O método de exaustão consistiu na captura de todos os triatomíneos avistados por um período máximo de 2 horas, conduzida por quatro ou cinco capturadores.

Em cada um dos municípios, os insetos foram coletados em três ecótopos diferentes:

- Silvestre: são os ambientes naturais e primários de *T. brasiliensis*. Este ambiente consiste principalmente, por afloramentos rochosos, mas ocasionalmente cactos. Para esse último, nenhum inseto foi encontrado.
- Domiciliar: são ambientes secundários, nos quais *T. brasiliensis* se adaptou. Foram considerados como ambientes domiciliares aqueles fechados por portas, o que inclui casas ou anexos nos quais ocorram a circulação de humanos e animais domésticos (ex: gatos e cachorros). Nesse ambiente os insetos são encontrados em fendas nas paredes, sob camas, atrás de quadros, móveis entre outros pontos onde o inseto possa se abrigar no interior dos domicílios.
- Peridomiciliar: São ambientes também secundários. Consistem em toda a área no entorno (<100m) do ambiente domiciliar, onde circulam predominantemente os animais domesticados (ex: galinhas, porcos, gado, entre outros). A diferença básica em nossa denominação de animais domésticos e domesticados é que estes últimos são usados para a subsistência dos habitantes rurais. Neste ambiente os insetos são encontrados em galinheiros, chiqueiros, currais, amontoados de madeiras/galhos/tijolos/ telhas, muros de pedras, entre outros.

Identificação das populações - Após as capturas os insetos foram rotulados individualmente e armazenados em microtubos de 1,5ml com álcool 100%. No laboratório eles foram armazenados à temperatura de -20°C. Além da marcação individual, cada inseto foi catalogado em nível populacional, recebendo uma identificação que consiste em siglas, a saber: (i) referente às cidades: Caicó-RN (CC), Currais Novos-RN (CN), Marcelino Vieira_RN (MV), Condado-PB (CD), Cajazeiras-PB (CZ), São José dos Espinharas-PB (SJ), São Mamede-PB (SM) e Emas-PB (EM) (Figura 1); (ii) coordenada geográfica; (iii)

cótopo: silvestre (S), peridomiciliar (P) e domiciliar (D) e (iv) sexo: macho (M), fêmea (F). Portanto, por exemplo, um inseto coletado em Caicó, na coordenada 51, no ecótopo silvestre, do sexo masculino recebeu uma identificação individual e uma populacional – no caso seria a populacional foi CC51S_M. Para algumas análises, as populações de um mesmo município foram fundidas em grupos. A sigla referente ao sexo foi posteriormente suprimida após análises piloto, pois os sexos foram tratados separadamente para as análises morfométricas.

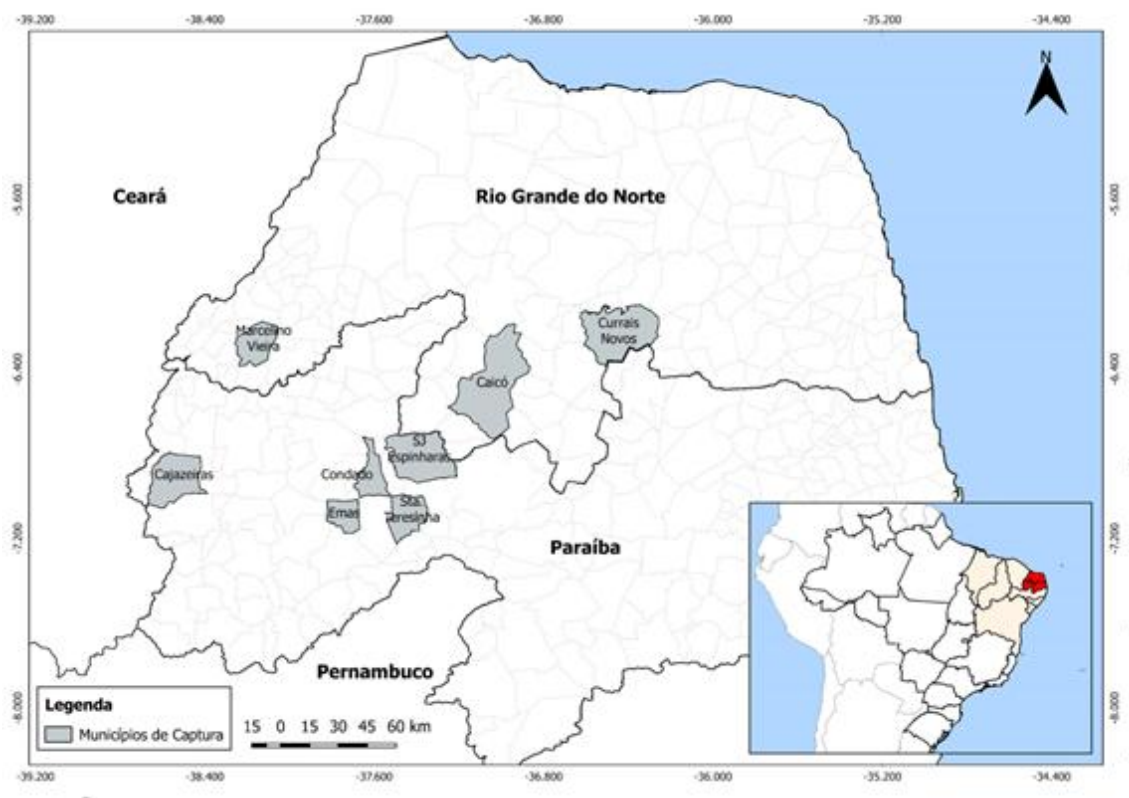


Figura 1: Mapa com os municípios (em cinza) onde foram realizadas as coletas: Caicó-RN (CC), Condado-PB (CD), Currais Novos-RN (CN), Cajazeiras-PB (CZ), Emas-PB (EM), Marcelino Vieira-RN (MV), São José dos Espinharas-PB (SJ) e Santa Teresinha-PB (ST).

4.2. Morfometria

Para o estudo morfométrico foi utilizado um número mínimo de cinco e máximo de 30 asas individuais por população. Foram utilizadas as asas direitas de machos e fêmeas que foram dispostas em uma placa de petri, embebida com álcool a 70%, prensada com uma lamínula de microscópio para que a asa ficasse mais plana o possível. A placa de petri foi colocada sobre um papel milimetrado com uma etiqueta de identificação junto à asa. As imagens foram

digitalizadas em stereomicroscópio Zeiss™ Discovery V.12 com um sistema de captura de imagem AxioCam 5.0™ e software ZEN™ version 2.0. Todas as *landmarks* (marcos anatômicos) foram marcadas pelo mesmo capturador.

4.2.1. Marcos anatômicos

Para minimizar o efeito do usuário as capturas dos marcos anatômicos seguiram uma sequência populacional aleatória. Ou seja, as imagens das asas foram todas misturadas e cada indivíduo foi aleatoriamente retirado do pool de toda a amostragem. As coordenadas resultantes de 13 marcos anatômicos — caracterizadas por conexões e intersecções das asas — foram definidas com base nas características anatômicas e revisão literária (de la Fuente et al., 2011) (Figura 2). As *landmarks* foram demarcadas no programa CLIC (Collection of *Landmarks* for Identification and Characterization, Copyright ©2000 Jean-Pierre Dujardin, www.mome-clic.com/). A sequência dos marcos anatômicos (1 a 13) foi mantida em todas as capturas para estabelecer a homologia espacial da estrutura.



Figura 2: *Landmarks* utilizadas para a análise da asa direita de um macho de *Triatoma brasiliensis* da população silvestre de Caicó.

As variáveis de forma foram obtidas por meio do algoritmo generalizado de superposição de Procrustes e a subsequente projeção dos resíduos de Procrustes foi definida em um espaço euclidiano. Ambos os componentes não uniformes e uniformes foram usados como variáveis de forma (Rohlf, 1990). Esses dois componentes descrevem as diferenças na forma como desvios de uma configuração média de pontos de referência (Zelditch et al., 2004). O tamanho do centróide do estimador isométrico (CS) derivado da análise

baseada em marcos anatômicos foi usado como uma medida do tamanho geral (Klingenberg, 2011; Dujardin, 2008).

4.2.2. Análises estatísticas

Para as medidas de forma, as distâncias de Mahalanobis (DM) entre todos os pares de espécies foram calculadas e sua significância foi avaliada usando um teste não paramétrico baseado em permutações (10.000 simulações), que foram ilustrados em dendrogramas de similaridade, construídas com base nas matrizes obtidas. O percentual de semelhança fenotípica entre pares de populações foi calculado usando o teste de verificação cruzada da análise discriminante (Klingenberg, 2009). A relação entre o tamanho do centroide (CS) e discriminação de formas entre os grupos (alometria) foi estimada por meio de uma regressão multivariada entre as coordenadas de Procrustes (variáveis dependentes) e CS (variável independente). Essa análise foi realizada para cada módulo e entre grupos. As regressões mostram as associações em todas as comparações via permutações aleatórias. O Valor de P ($<0,01$) teve como base os algoritmos de Klingenberg. (2009), que demonstraram a alta sensibilidade dos resultados da Distância de Mahalanobis. O grau de diferenciação entre os indivíduos foi ilustrado pela análise de componentes principais (PCA) e análise das variáveis canônicas (CVA) que avaliaram combinação das variações nas 13 coordenadas anatômicas de cada indivíduo. Todos os dados estatísticos foram avaliados com a utilização do programa MorphoJ (Klingenberg, 2011). Como o conjunto de dados foi composto por organismos de uma mesma espécie (presumidamente com pouco grau de diferenciação) optou-se por ilustrar os resultados de subgrupos com a CVA pois esse algoritmo é mais sensível para delimitar essa categoria de agrupamento (Klingenberg, 2011).

4.3. Análises moleculares

4.3.1. Isolamento do DNA

O DNA foi isolado das pernas dos insetos, utilizando o kit Blood and Tissue da Qiagen® e seguindo as especificações do fabricante. O DNA foi aplicado em gel de agarose 1% e utilizado o corante GelRed para visualização em fotodocumentador visando a quantificação e verificação da integridade de

cada amostra. Foi realizado o tratamento das amostras com RNase, utilizando 1µl de RNase 10mg/mL a cada 100µl de DNA, e incubado a 37°C por duas horas. Essa etapa do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Entomologia Integrativa, liderado pela Profa. Dra. Patrícia Thyssen.

4.3.2. Reação em cadeia de polimerase (PCR)

O gene mitocondrial Cyt b foi selecionado para as análises populacionais. A amplificação do fragmento de DNA alvo dos insetos foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o par de iniciadores CYTB7432F, 5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC-'3, e CYTBR, 5'-ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG-'3 (Monteiro et al., 2004; Lyman et al., 2017). As seguintes condições foram utilizadas para a PCR: 2,5 uL de tampão 10X, 2 uL de MgCl₂ 25 mMol, 1 uL de dNTP 100 mMol, 0,2 uL de Taq 5U/uL, 0,5 uL de cada Primer a 10 pMol. As condições da PCR seguiram os seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 4 minutos; e incubação a 4°C.

Os produtos da PCR foram corados com GelRed®, aplicados em gel de agarose 1,5% e visualizados em fotodocumentador para constatação da amplificação do fragmento de interesse de aproximadamente 600pb (Figura 3). Após essa etapa, os produtos da PCR foram purificados utilizando o conjunto de reagentes GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences), seguindo a recomendação do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado na Plataforma Genômica do Departamento de Genética do Instituto Nacional de Câncer. Para o sequenciamento, foram utilizados os produtos purificados, os iniciadores da PCR e o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Todo material foi disposto em uma placa de 96 poços em um termociclador, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos; e incubação a 8°C. A placa foi precipitada e sequenciada em um sequenciador automático ABI3130xl. Após o sequenciamento, os arquivos extraídos foram analisados e editados utilizando o programa SEQMAN (Swindell e Plasterer, 1997). As sequências foram

montadas (assembled; forward + reverse) e para fins de confirmação da identificação dos indivíduos, foram submetidas à ferramenta online BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que utiliza sequências depositadas no banco de dados online GenBank para comparação (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Em seguida todas as sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo Alignment Clustal (Excoffier e Lischer, 2015) viabilizado pelo Mega7 (Kumar et al. 2016), gerando um conjunto de dados com sequências de 510 pares base.

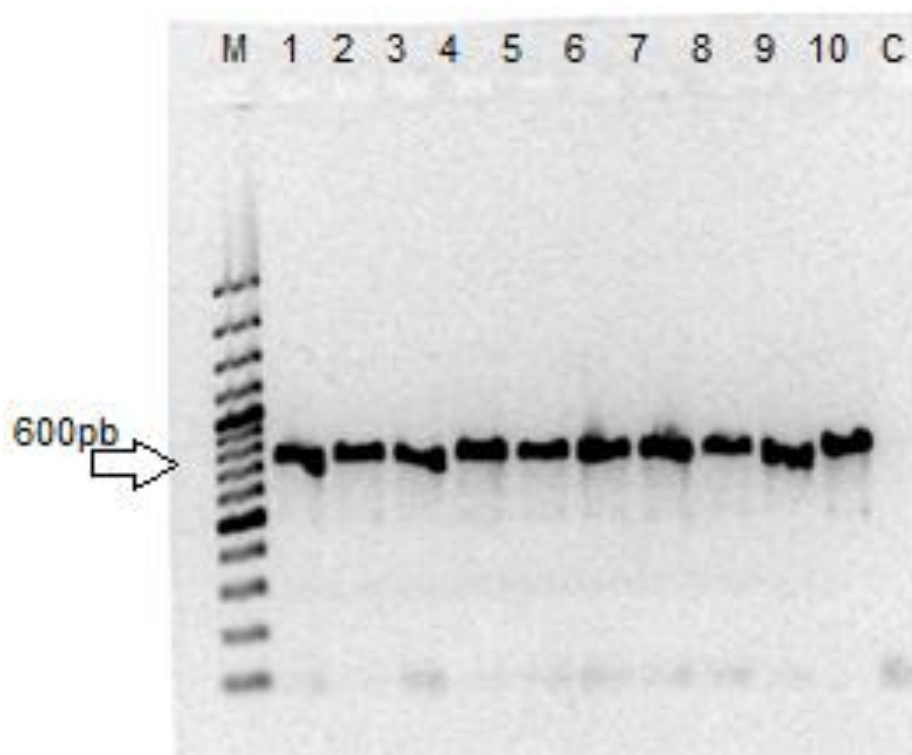


Figura 3: Gel de agarose 1,5%, contendo M: marcador molecular 100pb, amplificações dos DNAs de insetos da população silvestre de Caicó 1:CC51S1, 2: CC51S2, CC51S3, 3: CC51S4, CC51S5, 4: CC51S6, 5: CC51S7, CC51S8, CC51S9, CC51S16 e C: Controle negativo.

4.3.3. Análise da distribuição da variação molecular

O coeficiente “ Φ_{ST} ” foi usado para estimar o grau de diferenciação populacional. Ele foi desenvolvido em função das estatísticas F de Wright (1978) para marcadores co-dominantes, como as isoenzimas. Originalmente, o F_{ST} é representado pela equação: $F_{ST} = 1/(1+4Nm)$, onde N = tamanho efetivo da população, m = índice de migração entre populações (proporção de alelos

que são substituídos por alelos de migrantes de cada geração). Entretanto, a equação foi adaptada por Reynolds et al., (1983) para dados haplotípicos calculados com o uso do programa Arlequin ver 3.5.2 (Excoffier & Lischer, 2015). Os valores de Φ_{ST} par-a-par foram apresentados na forma de uma matriz, que gerou um dendrograma. A hipótese de não haver diferença entre as populações foi testada pela permutação de haplótipos entre as populações, sendo que o valor P foi obtido por 1.000 permutações, onde a significância foi estabelecida em $P < 0,05$.

4.3.4. Estrutura genética

A distribuição da diversidade genética foi estimada também pela Análise de Variância Molecular (AMOVA; Excoffier et al. 1992). O total da variação genética foi distribuído de acordo com as hipóteses para observar a diferenciação entre indivíduos dentro de uma população e entre diferentes populações, ou grupo de populações. Dessa forma, a variação entre e dentro das coletas foi então dividida e analisada por meio de uma análise hierárquica de (co)variância molecular (AMOVA). A significância dos valores de estatísticas Φ e dos componentes de variação genética foi testada usando 1.000 permutações aleatórias.

Para a AMOVA foram testadas separadamente duas fontes diferentes de variação, a distância geográfica e barreiras ecotípicas, que têm sido postuladas como fatores limitantes do fluxo gênico em triatomíneos. Primeiramente foi testada a hipótese de que a estrutura genética era conduzida pela força geográfica, agrupando todas as populações de acordo com seu município. Em seguida, as populações foram agrupadas de acordo com os ecótopos, dentro de cada município, de acordo com Almeida et al. (2008). A comparação entre as proporções de variação explicada por cada partição provê informação sobre o papel da força geográfica vs. ecológica na distribuição da variabilidade genética de *T. brasiliensis*.

4.3.5. Neutralidade e seleção

O objetivo dos testes para avaliar possíveis desvios da premissa de neutralidade seletiva é definir se um conjunto de sequência de DNA evolui sob um processo aleatório (Takahata e Kimura, 1994), incluindo seleção direcional

ou seleção de equilíbrio, expansão ou contração demográfica. Neste trabalho eles foram usados principalmente para avaliar se as populações estavam sob pressão seletiva ou eventos demográficos para a completentação das interpretações das informações morfométricas. Os testes utilizados foram o *D* de Tajima (Tajima, 1989) e FS de Fu (Fu, 1997). A significância das estatísticas moleculares foi testada usando 1.000 permutações, sendo consideradas significativas aquelas com valores de $p < 0,05$.

4.4. Correlação entre matrizes

Todas as matrizes geradas foram comparadas por meio de testes de Mantel (Mantel and Valand, 1970), aplicando-se 10.000 permutações aleatórias para avaliação da significância estatística das correlações ($P < 0,05$). A matriz de distância geográfica foi definida por meio da distância linear entre todos os pares de populações ou pelo ponto central do conjunto de populações (quando essas foram agrupadas), utilizando-se as coordenadas geográficas para sua confecção.

5. Resultados

5.1. Morfometria Geométrica

Ao todo foram digitalizadas 733 asas. Após a exclusão dos indivíduos considerados *outliers* pelo programa, restaram 698 asas, que foram distribuídas em 43 diferentes populações. A PCA explicou 36% da variação ($PC1=21,6\%$ e $PC2=14,7\%$). A primeira comparação feita foi entre os sexos, com 298 fêmeas e 400 machos. A análise de componente principal (Figura 4a e 4b) mostra uma maior concentração de fêmeas no polo negativo do Componente Principal 2 (4a) com Distância de Mahalanobis (1,3427) estatisticamente significativa. O bloxspot (4b) referente ao tamanho do centróide demonstrou que as fêmeas foram maiores que os machos ($P < 0,0001$). O teste de validação cruzada classificou erroneamente 27-28% dos indivíduos de acordo com o sexo (4c). Assim, admite-se que o dimorfismo sexual possa ter influenciado na diferenciação. Por esse motivo, foi decidido trabalhar separadamente com os sexos para as próximas análises. O sexo masculino apresentou o maior N amostral ($N=407$) indivíduos, ao passo que o feminino foi composto por 303 insetos. Em seguida, as populações com menos

de cinco indivíduos foram excluídas do estudo para minimizar o viés estatístico. Para os machos, o resultado contou com 348 exemplares divididos em 24 populações (Tabela 1). Já para as fêmeas, o resultado contou com 275 exemplares de 26 populações (Tabela 2). A Figura 5 ilustra a variação em cada *landmark* por meio do PC1, podendo ser observado que as *landmarks* 6 e 8 apresentaram a maior variação.

Tabela 1 Amostragem para os machos de cada população para a morfometria geométrica. Em negrito são evidenciadas as populações com número amostral menor do que 5, as quais foram excluídas das análises.

#	População	Nº de indivíduos	Cidade	Ecótopo
1.	CC51S	25	Caicó	Silvestre
2.	CC52S	21	Caicó	Silvestre
3.	CC53S	38	Caicó	Silvestre
4.	CD46P	20	Condado	Peridomiciliar
5.	CD49S	2	Condado	Silvestre
6.	CN69P	34	Currais Novos	Peridomiciliar
7.	CN71P	4	Currais Novos	Peridomiciliar
8.	CN72S	1	Currais Novos	Silvestre
9.	CN73P	1	Currais Novos	Peridomiciliar
11.	CN75D	1	Currais Novos	Domiciliar
12.	CN76P	9	Currais Novos	Peridomiciliar
13.	CN77S	5	Currais Novos	Silvestre
14.	CN81P	2	Currais Novos	Peridomiciliar
15.	CN83S	35	Currais Novos	Silvestre
16.	CN86P	27	Currais Novos	Peridomiciliar
17.	CN87S	2	Currais Novos	Silvestre
18.	CZ15D	2	Cajazeiras	Domiciliar
19.	CZ16P	4	Cajazeiras	Peridomiciliar
20.	CZ18P	5	Cajazeiras	Peridomiciliar
21.	CZ19P	6	Cajazeiras	Peridomiciliar
22.	CZ21D	2	Cajazeiras	Domiciliar
23.	CZ23S	1	Cajazeiras	Silvestre
24.	CZ27S	20	Cajazeiras	Silvestre
25.	EM85D	2	Emas	Domiciliar
26.	EM86S	13	Emas	Silvestre
27.	EM87P	7	Emas	Peridomiciliar
28.	EM94P	7	Emas	Peridomiciliar
29.	EM95P	1	Emas	Peridomiciliar
30.	MV18P	7	Marcelino Vieira	Peridomiciliar
31.	MV21S	5	Marcelino Vieira	Silvestre
32.	MV29S	7	Marcelino Vieira	Silvestre
33.	MV92S	6	Marcelino Vieira	Silvestre
34.	SJ33P	15	S.J Espinharas	Peridomiciliar
35.	SJ36S	15	S.J Espinharas	Silvestre
36.	SJ41S	13	S.J Espinharas	Silvestre
37.	SJ89P	3	S.J Espinharas	Peridomiciliar
38.	SJ93S	6	S.J Espinharas	Silvestre
39.	SM13S	1	São Mamede	Silvestre
40.	ST30S	25	Santa Teresina	Silvestre

Tabela 2 Amostragem para as fêmeas de cada população para a morfometria geométrica. Em negrito são evidenciadas as populações com número amostral menor do que 5, as quais foram excluídas das análises.

#	População	Nº de Indivíduos	Cidade	Ecótopo
1.	CC51S	6	Caicó	Silvestre
2.	CC52S	8	Caicó	Silvestre
3.	CC53S	27	Caicó	Silvestre
4.	CD42P	1	Condado	Peridomiciliar
5.	CD45D	1	Condado	Domiciliar
6.	CD46P	27	Condado	Peridomiciliar
7.	CD49S	1	Condado	Silvestre
8.	CN69P	19	Currais Novos	Peridomiciliar
9.	CN71P	8	Currais Novos	Peridomiciliar
10.	CN72S	5	Currais Novos	Silvestre
11.	CN76P	5	Currais Novos	Peridomiciliar
12.	CN77S	2	Currais Novos	Silvestre
13.	CN81P	5	Currais Novos	Peridomiciliar
14.	CN83S	15	Currais Novos	Silvestre
15.	CN86P	14	Currais Novos	Peridomiciliar
16.	CN87S	6	Currais Novos	Silvestre
17.	CZ15D	1	Cajazeiras	Domiciliar
18.	CZ16P	15	Cajazeiras	Peridomiciliar
19.	CZ18P	6	Cajazeiras	Peridomiciliar
20.	CZ19P	8	Cajazeiras	Peridomiciliar
21.	CZ21D	4	Cajazeiras	Domiciliar
22.	CZ23S	6	Cajazeiras	Silvestre
23.	CZ27S	18	Cajazeiras	Silvestre
24.	EM85D	1	Emas	Domiciliar
25.	EM86S	6	Emas	Silvestre
26.	EM87P	10	Emas	Peridomiciliar
27.	MV18P	1	Marcelino Vieira	Peridomiciliar
28.	MV21S	3	Marcelino Vieira	Silvestre
29.	MV29S	4	Marcelino Vieira	Silvestre
30.	MV92S	4	Marcelino Vieira	Silvestre
31.	SJ33P	14	S.J Espinharas	Peridomiciliar
32.	SJ35P	3	S.J Espinharas	Peridomiciliar
33.	SJ36S	5	S.J Espinharas	Silvestre
34.	SJ41S	9	S.J Espinharas	Silvestre
35.	SJ89P	10	S.J Espinharas	Peridomiciliar
36.	SJ93S	7	S.J Espinharas	Silvestre
37.	ST30S	13	Santa Teresina	Silvestre

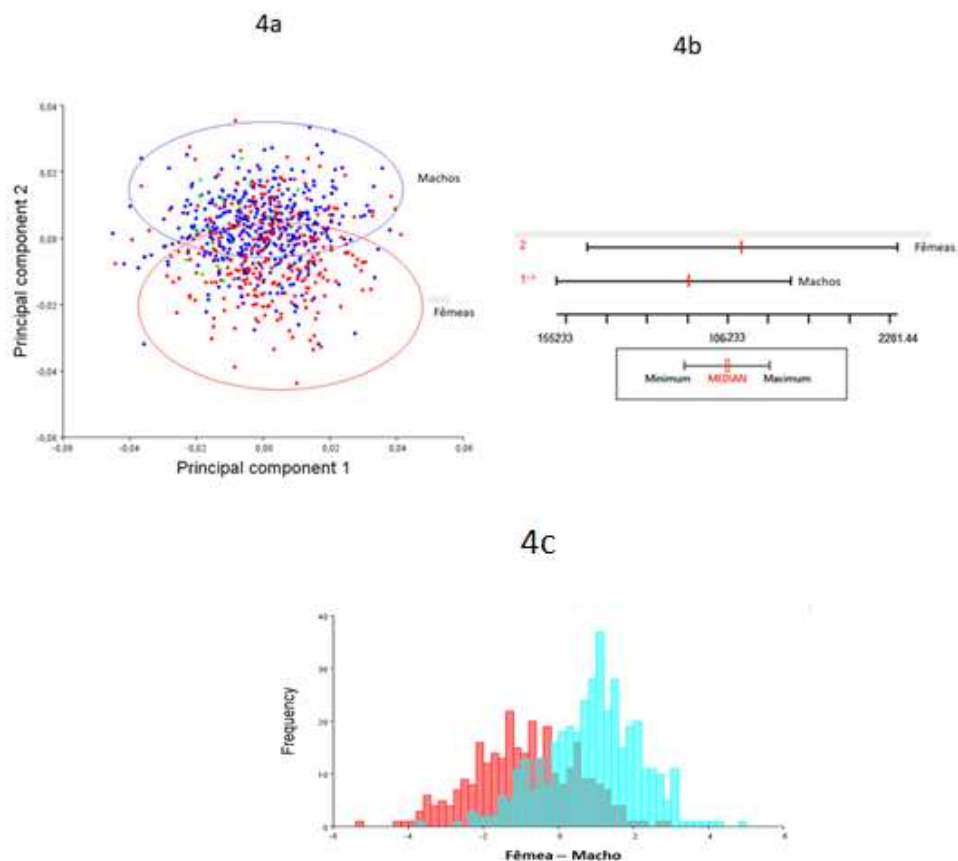


Figura 4: 4a) Análise de componentes principais (PCA) obtida pela variação morfométrica das asas de 698 *Triatoma brasiliensis* de diferentes municípios da Paraíba e Rio Grande do Norte (vide Figura 1). Ilustrações em vermelhos representam fêmeas (N=299) e azuis os machos (N=393). 4b) Boxplots representando variações no tamanho do centróide das asas. A Figura 4c demonstra a variável canônica usando a função discriminante da variação entre os sexos.

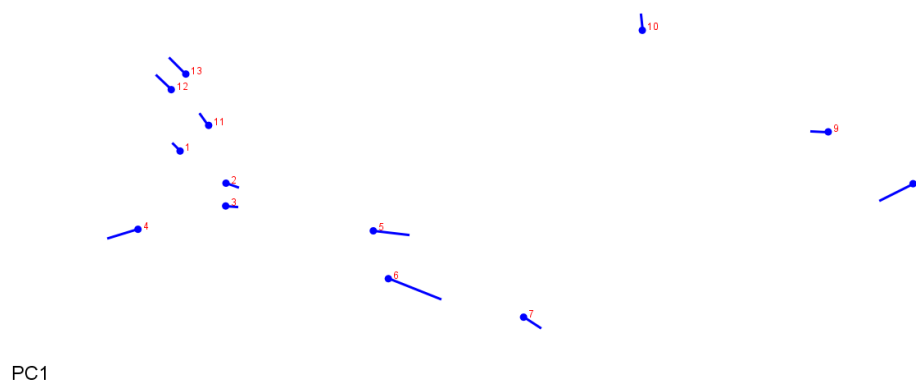


Figura 5: Ilustração da variação total em cada *landmark* de acordo com o componente principal 1 (PC1).

5.2. Distribuição da variação morfométrica

5.2.1. Variação populacional

Após as exclusões das populações com um número de indivíduos menor que cinco para ambos os sexos, foi construído um dendrograma de similaridade a partir da distância de Mahalanobis das populações analisadas. onde pode-se observar que houve relativo agrupamento ecotípico, o que está evidenciado nos círculos vermelhos (populações com sufixo “S”= silvestres). Já nos círculos negros podemos observar que houve tanto agrupamento ecotípico, quanto geográfico em nível municipal, mas com algumas exceções (Ex: SJ93S= população silvestre de S. J. dos Espinharas) (Figura 6).

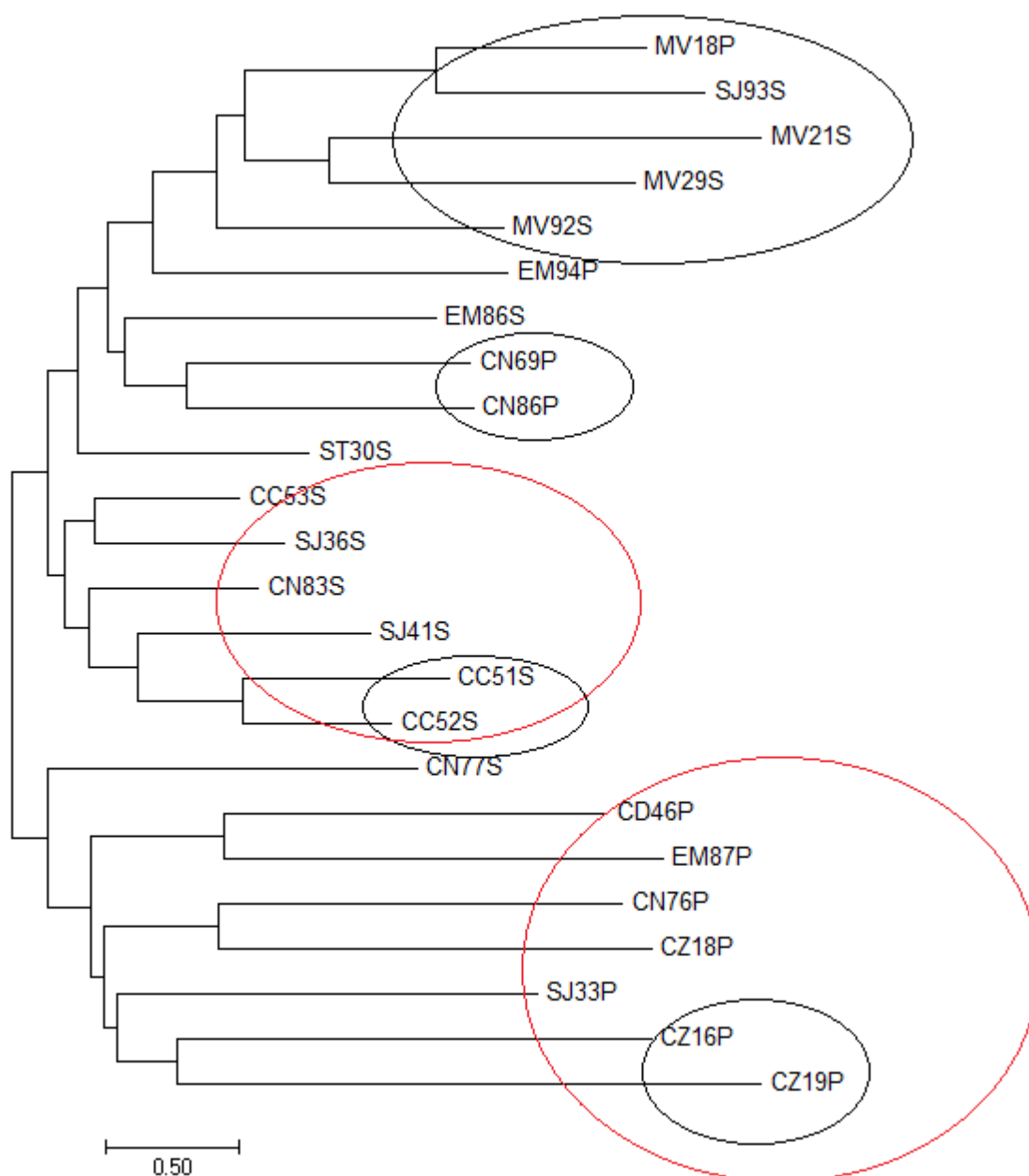


Figura 6: Dendrograma de similaridade construído a partir da matriz da distância de Mahalanobis entre as populações. Para visualizar a definição populacional, vide Tabela 1.

Tendo a pista da força ecotípica sobre a variação morfométrica, uma segunda análise foi feita separando os machos de acordo com seus ecótopos: domiciliar, peridomicilar e silvestre. Os indivíduos peridomiciliares foram significativamente maiores que os silvestres (Tabelas 3 e 4; $P < 0.0001$). Contudo, as DMs foram inferiores para as fêmeas.

Tabela 3 Distância de Mahalanobis entre os ecótopos dos indivíduos machos. P= peridomiciliar, S=Silvestre e D= domiciliar. Comparações com valores de P estatisticamente significantes estão em negrito

	D	P
P	2,0031	
S	2,2911	1,1659

Tabela 4 Distância de Mahalanobis entre os ecótopos dos indivíduos fêmeas. P= peridomiciliar, S=Silvestre e D= domiciliar. Comparações com valores de P estatisticamente significantes estão em negrito

	D	P
P	1,439	
S	1,6677	1,2109

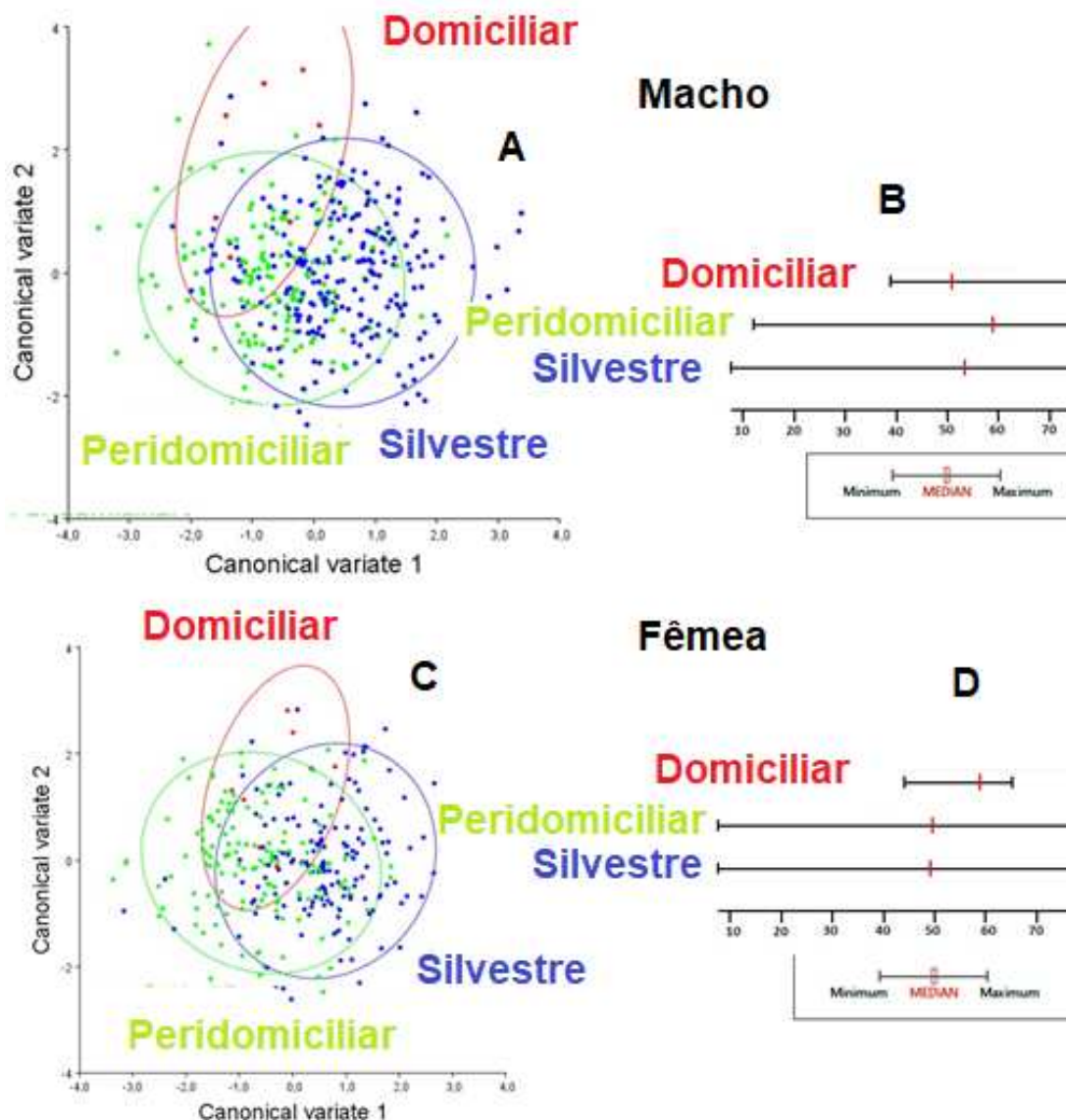


Figura 7. a) Análise de componente principal entre os ecótopos para os machos, onde os pontos vermelhos representam os indivíduos coletados no ecótopo domiciliar, os verdes no ecótopo peridomiciliar e o azul no ecótopo silvestre. b) Boxplots representando variações no tamanho do CS das asas. c) Análise de componente principal entre os ecótopos para as fêmeas, onde os pontos vermelhos representam os indivíduos coletados no ecótopo domiciliar, os verdes no ecótopo peridomiciliar e o azul no ecótopo silvestre. d) Boxplots representando variações no tamanho do CS das asas.

O direcionamento das populações ecotípicas para os machos em diferentes polos do gráfico é mostrado na Figura 7a. Os indivíduos machos do ecótopo silvestre se encontram majoritariamente no polo positivo do PC2

enquanto os indivíduos do ecótopo peridomiciliar se encontram majoritariamente no polo negativo do PC2. Já o grupo do ecótopo domiciliar se localiza majoritariamente no polo positivo do PC1. Padrão similar foi observado para as fêmeas (Figura 7c e 7d).

Foi feita também uma comparação agrupando as populações por cidades para cada sexo. Houve significância estatística entre todas as populações para os machos, exceto para o grupo de populações o município de Emas (EM) comparado com o de São José de Espinharas (SJ) ($MD=1,4045$, $P=0,0345$), bem como entre SJ e Santa Teresinha (ST) ($MD=1,5436$, $P=0,0211$), conforme pode ser observado nas Tabelas 5 e 6. Padrão semelhante foi observado para as fêmeas, com algumas exceções: (i) a população de Marcelino Vieira não apresentou diferenciação estatisticamente significativa das populações de SJ. O mapa apresentado na Figura 1 indica que os municípios de EM, SJ e ST, que são associados morfometricamente, são também associados geograficamente. A exceção é representada pelo município de Condado (CD). Devido a sobreposições populacionais, pouco agrupamento pode ser observado nos mapas de componentes principais para os ambos os sexos (Figura 8 e 9).

Tabela 5 Distância de Mahalanobis entre o agrupamento de população de machos por cidades. Em negrito estão as comparações que foram estatisticamente significantes em $P < 0,01$

Cidade (N)	CC	CD	CN	CZ	EM	MV	SJ
CD (52)	2,6809						
CN (201)	1,5200	2,3958					
CZ(98)	2,357	2,8501	2,3010				
EM(47)	2,2145	2,5369	1,8972	1,687			
MV(53)	2,2961	3,4172	2,1983	2,7247	2,5378		
SJ(100)	1,3173	2,487	1,4900	1,5818	1,4045	2,3507	
ST(38)	1,8938	2,6844	1,8179	1,9886	1,7715	2,3084	1,5436

Tabela 6 Distância de Mahalanobis entre o agrupamento de população de fêmeas por cidades. Em negrito estão as comparações que foram estatisticamente significantes em $P < 0,01$

Cidade (N)	CC (41)	CD	CN	CZ	EM	MV	SJ
CD (30)	2,3273						
CN (79)	1,49	1,7417					
CZ (58)	1,9607	2,448	2,0917				
EM (17)	2,0771	2,7241	2,3917	1,8526			
MV (12)	2,2574	3,494	2,6036	2,8537	2,5604		
SJ (48)	1,2117	2,6322	1,8406	1,5908	1,5937	2,2531	
ST (13)	2,1106	2,84	2,2483	2,3603	2,5756	2,3847	1,9257

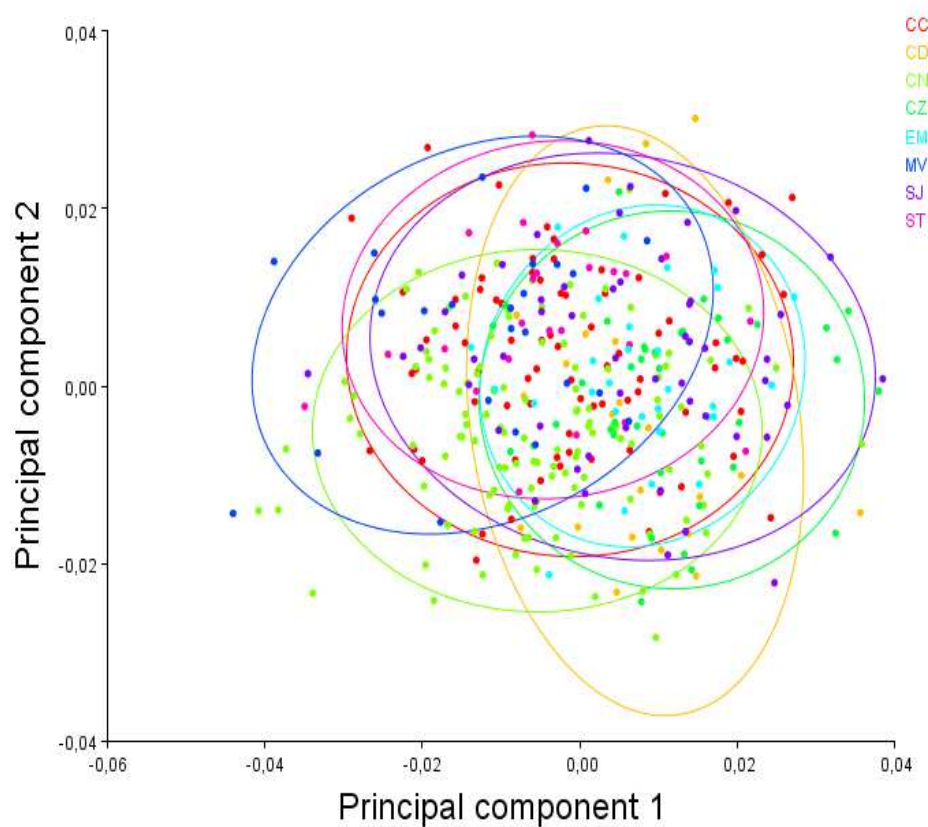


Figura 8: Gráfico de análise das variáveis canônicas construído a partir da morfometria geométrica das asas para insetos machos coletados em diferentes municípios (vide Figura 1).

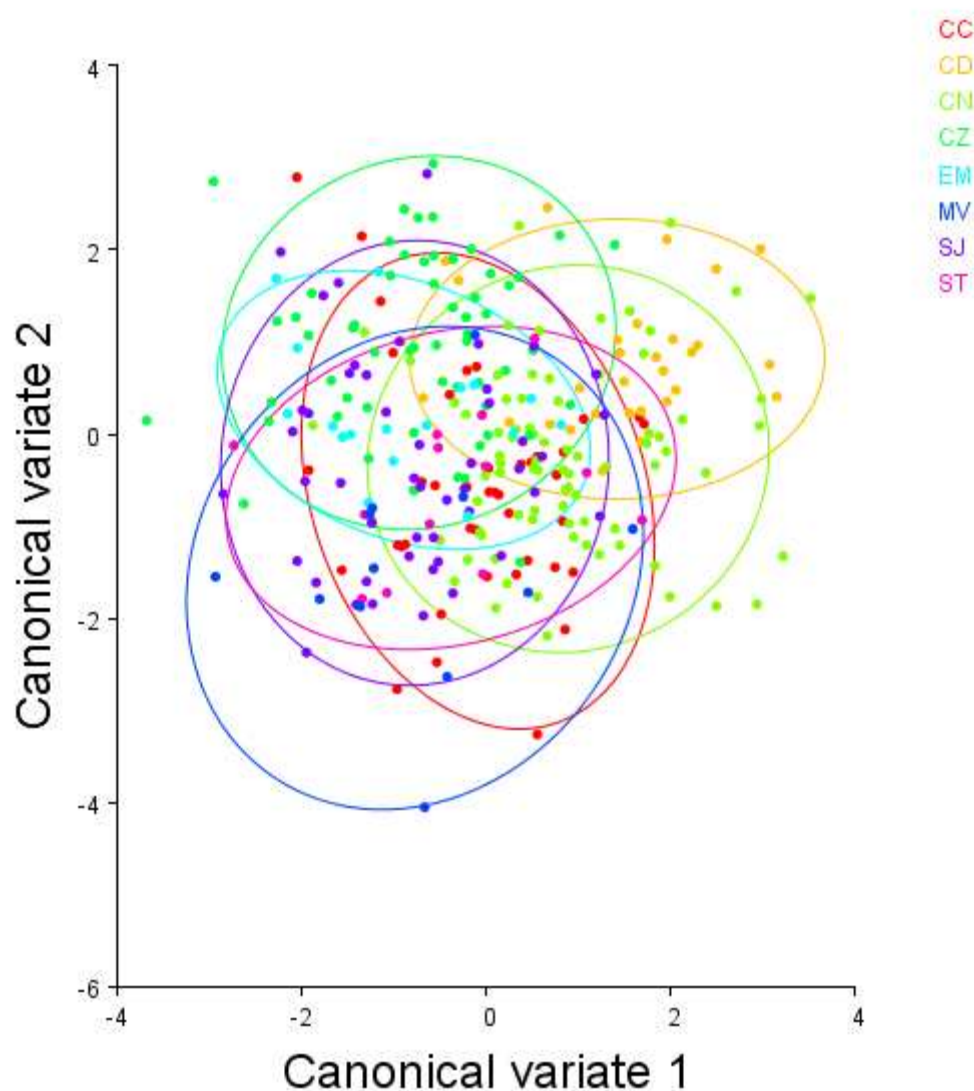


Figura 9: Gráfico de análise das variáveis canônicas construído a partir da morfometria geométrica das asas para insetos fêmeas coletados em diferentes cidades (vide Figura 1).

5.2.2. Análises das Variáveis Canônicas (CVAs) em microescala geográfica

A análise dos mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas (CVAs) mostrou uma estruturação populacional bem definida dentro de quase todos os municípios para aqueles que tiveram número robusto (<5) para determinado sexo. A exceção foi para os machos de Caicó e para as machos e fêmeas de Currais Novos e em menor escala para fêmeas de Cajazeiras. Não foi possível correlacionar esses agrupamentos com o ecótopo onde os insetos foram coletados. Por exemplo, para os machos, a população

silvestre de Emas EM86S se posicionou mais próxima da peridomiciliar EM94P (Figura 12). Neste mesmo sentido, a população peridomiciliar de machos de Marcelino Vieira, se posicionou próxima à silvestre MV21S (Figura 14). A população de machos peridomiciliares de São José dos Espinharas SJ33P ainda se posicionou próxima à duas silvestres: SJ41S e SJ36S (Figura 15). Padrão semelhante foi observado para as fêmeas que apresentaram definição de grupos, como é o caso da SJ33P, que foi associada à SJ93S e SJ41P (Figura 21).

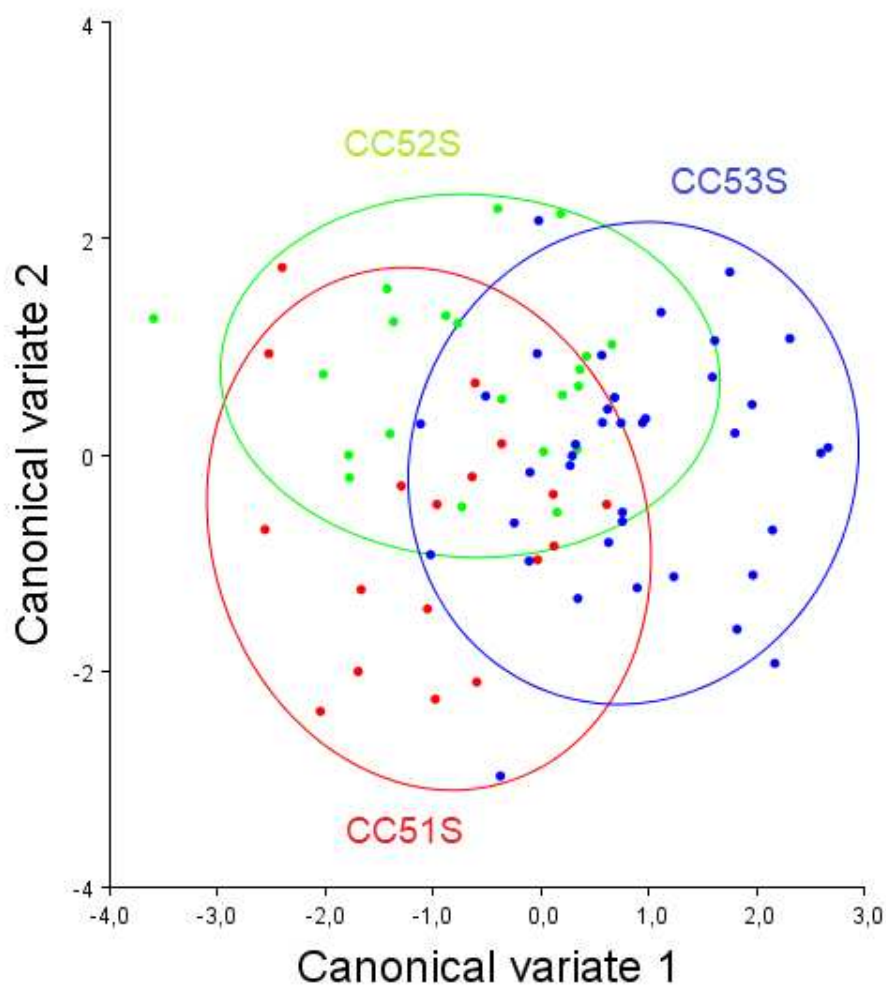


Figura 10: Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares machos de Caicó.

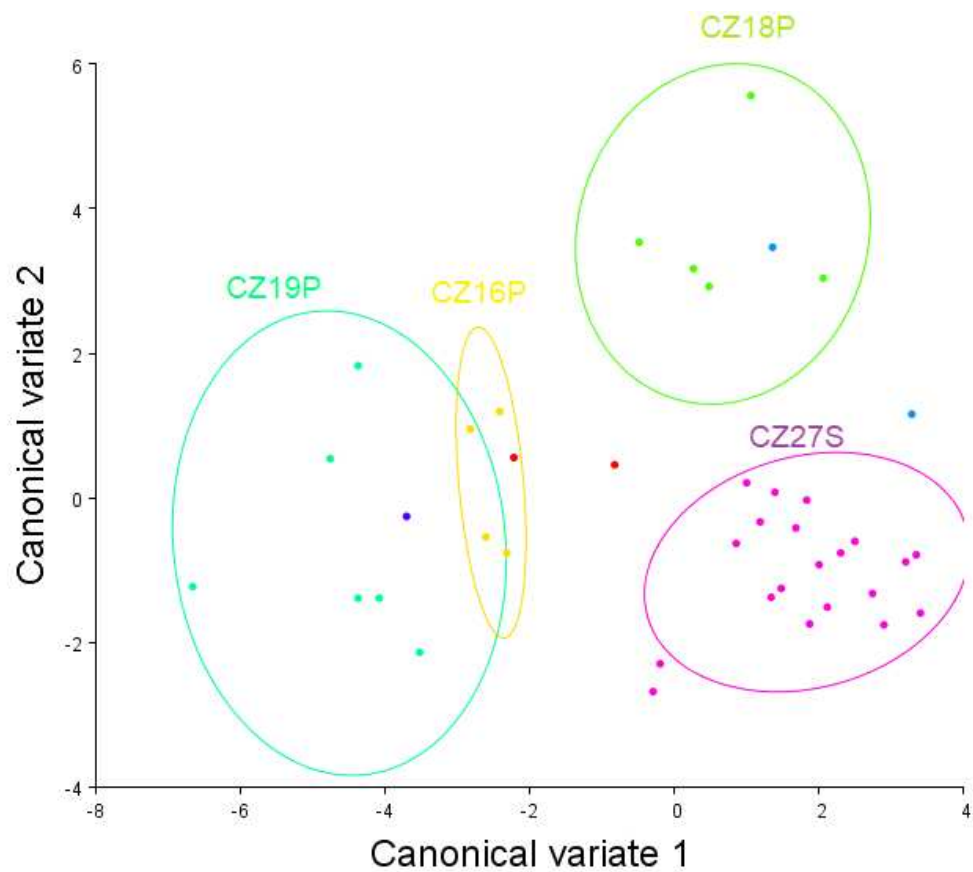


Figura 11:. Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares machos de Cajazeiras.

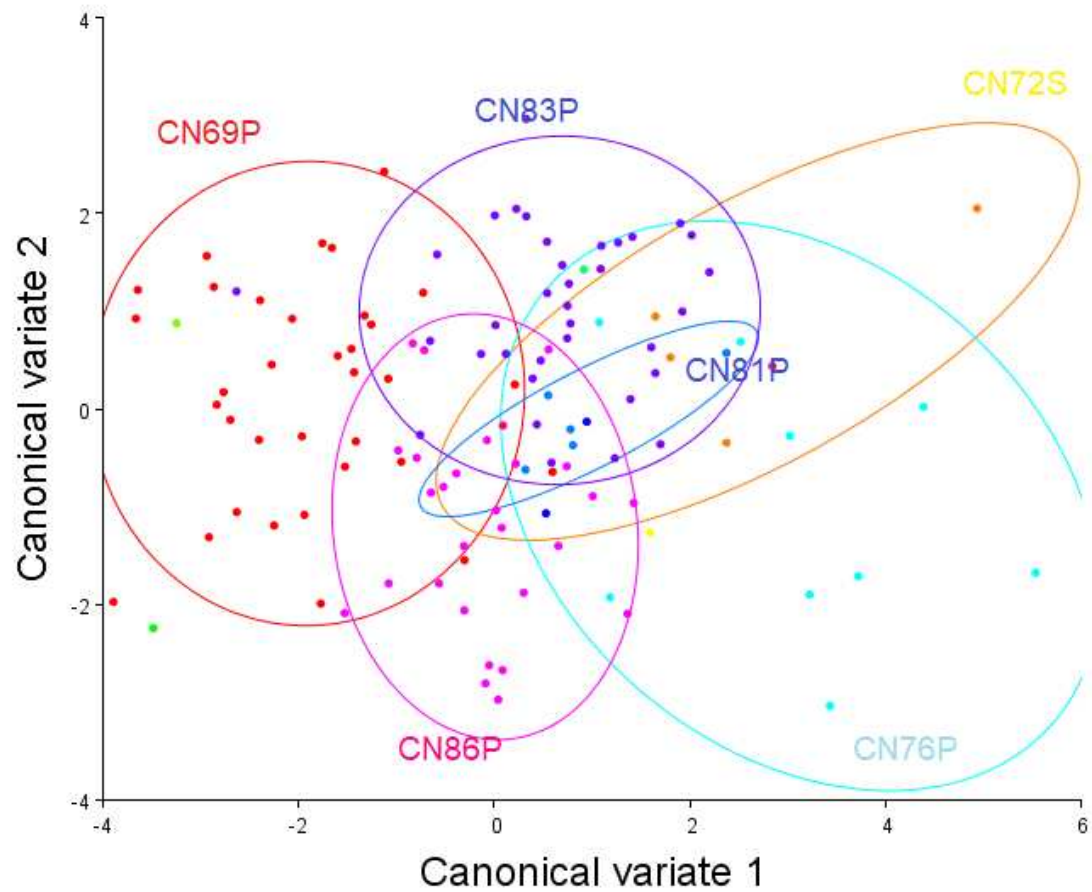


Figura 12: Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares machos de Currais Novos

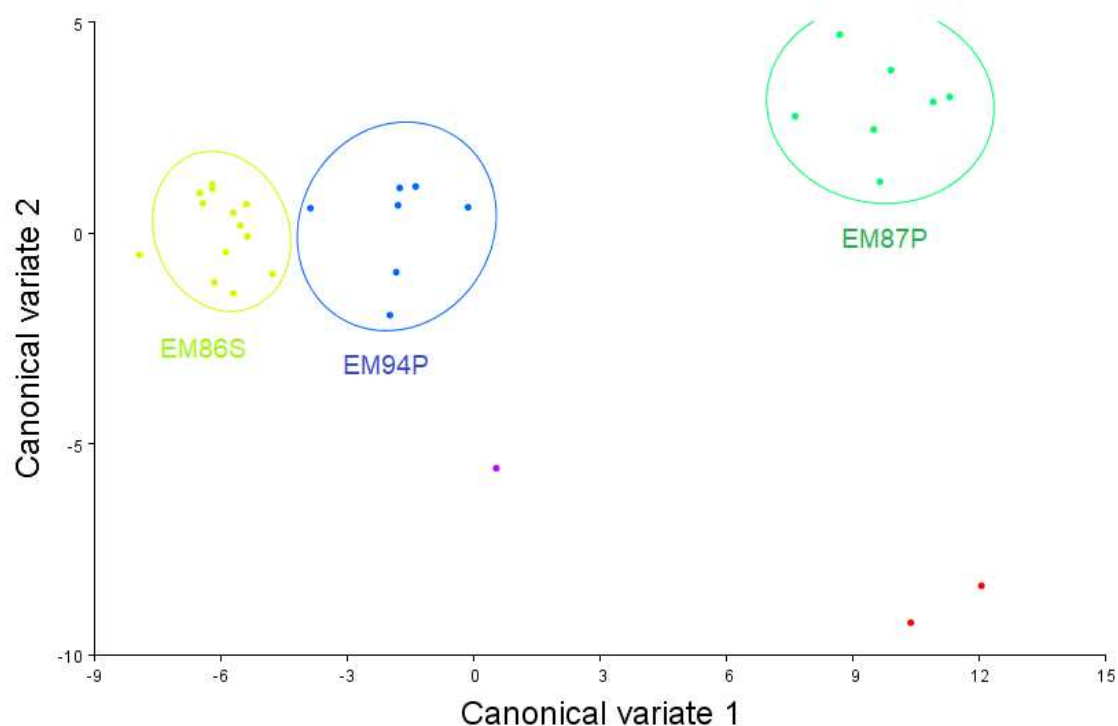


Figura 13: Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares machos de Emas.

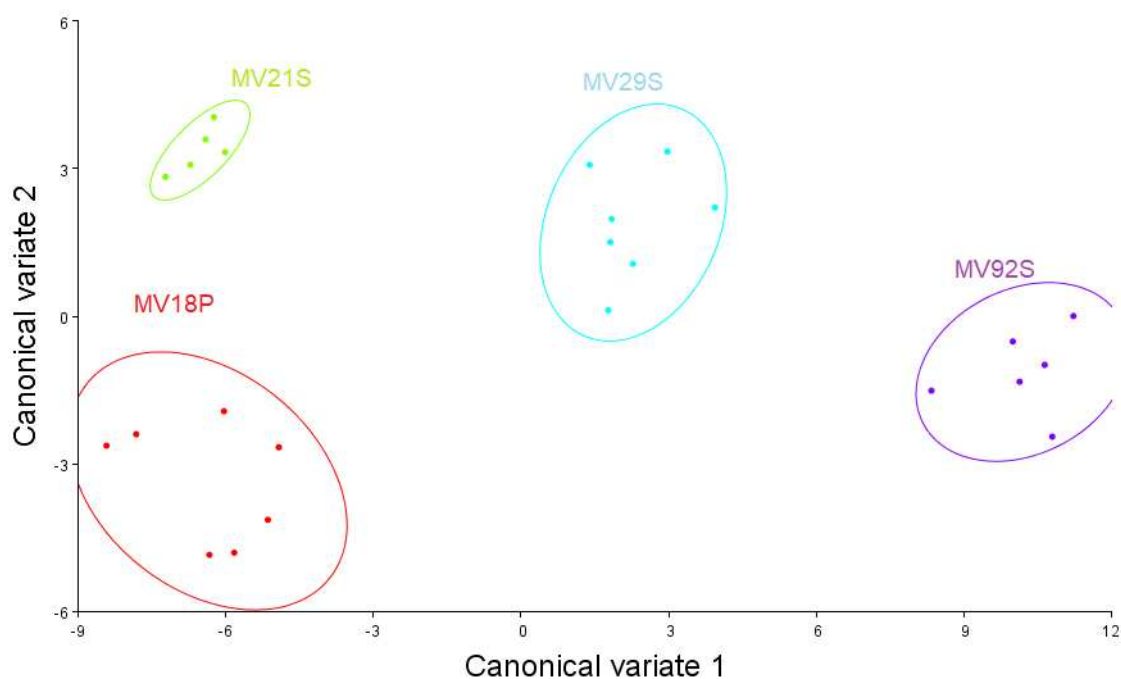


Figura 14: Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares machos de Marcelino Vieira.

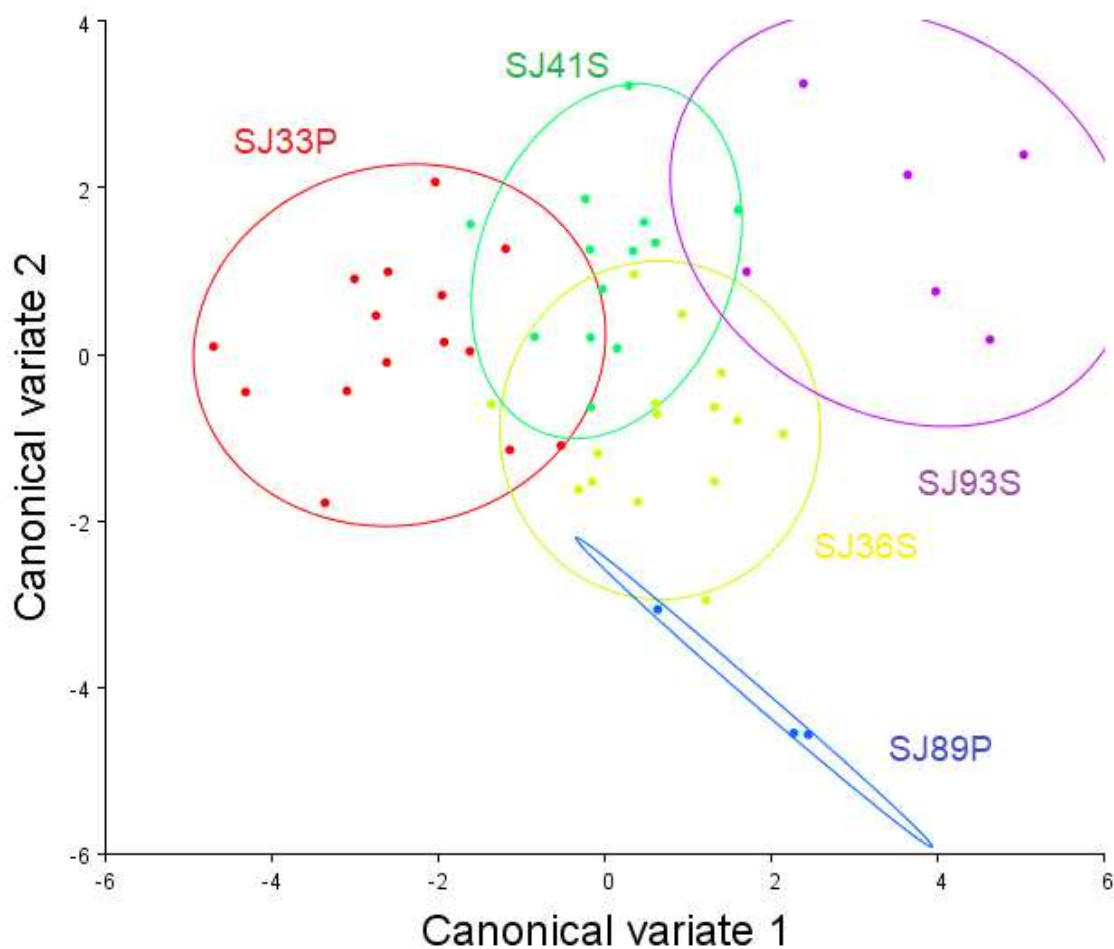


Figura 15:. Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares machos de São Jose dos Espinharas.

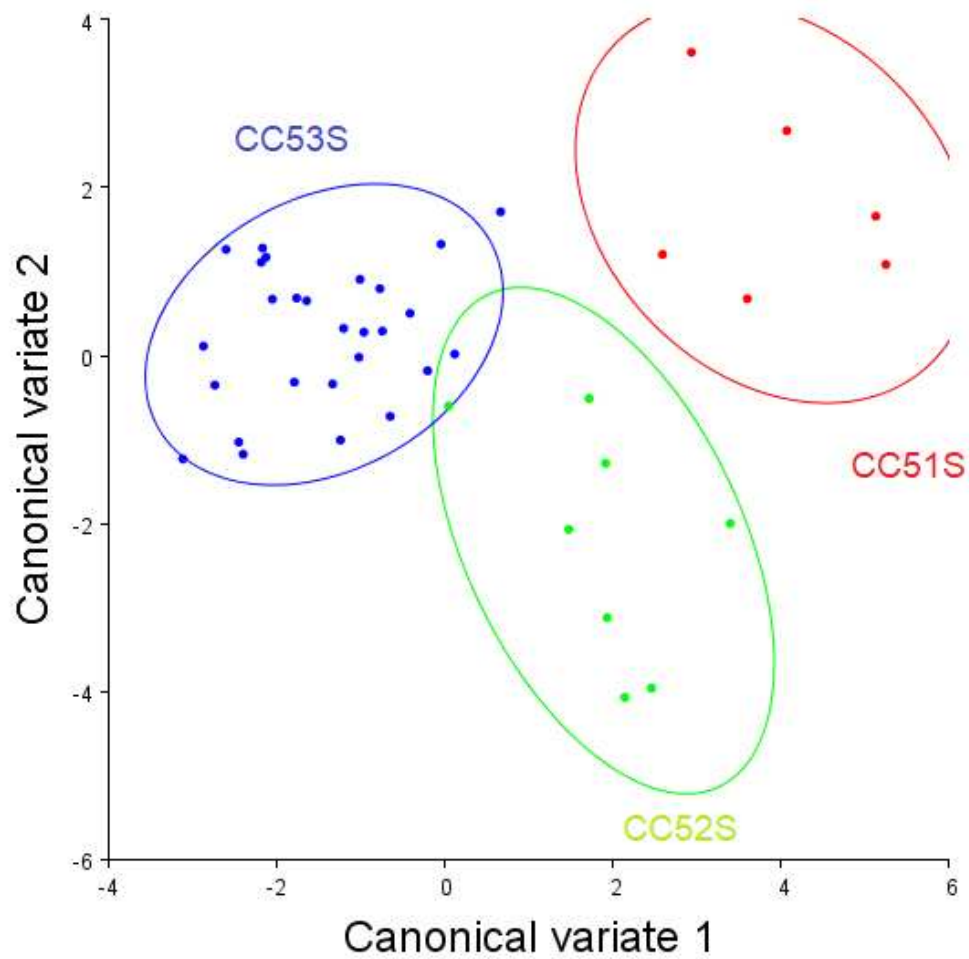


Figura 16: Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares fêmeas de Caicó.

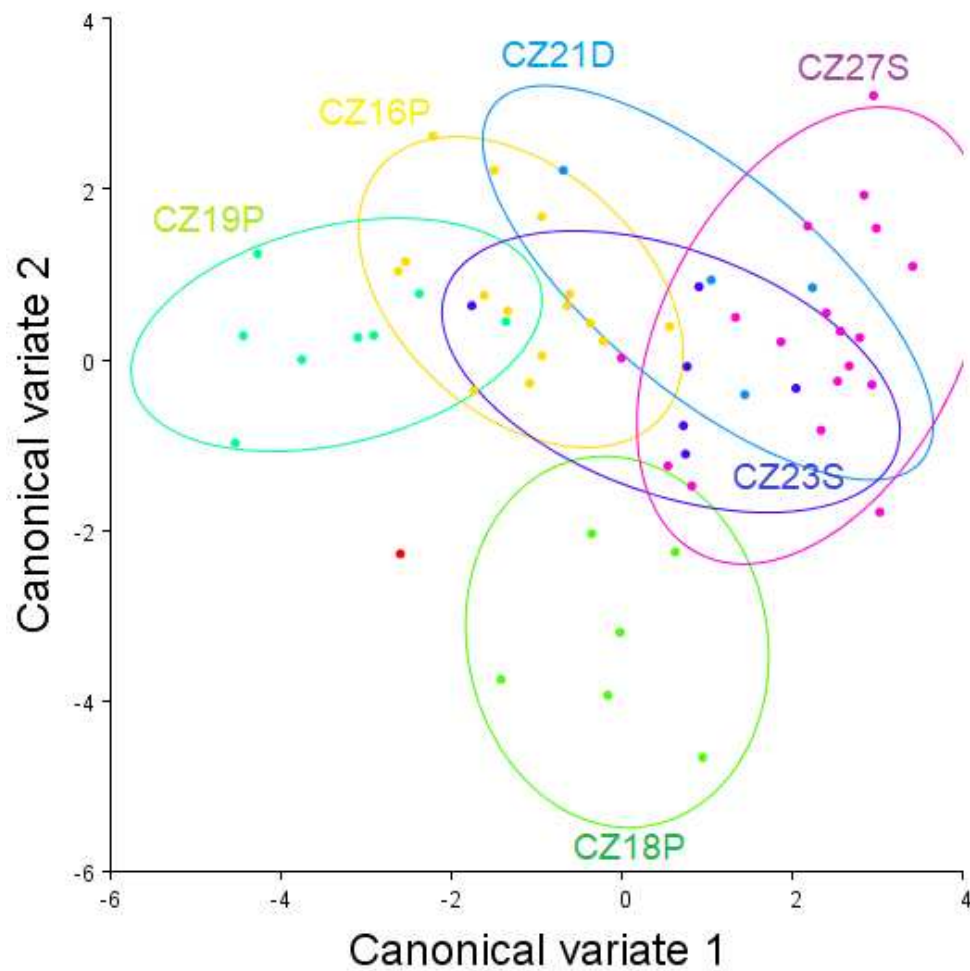


Figura 17:. Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares fêmeas de Cajazeiras.

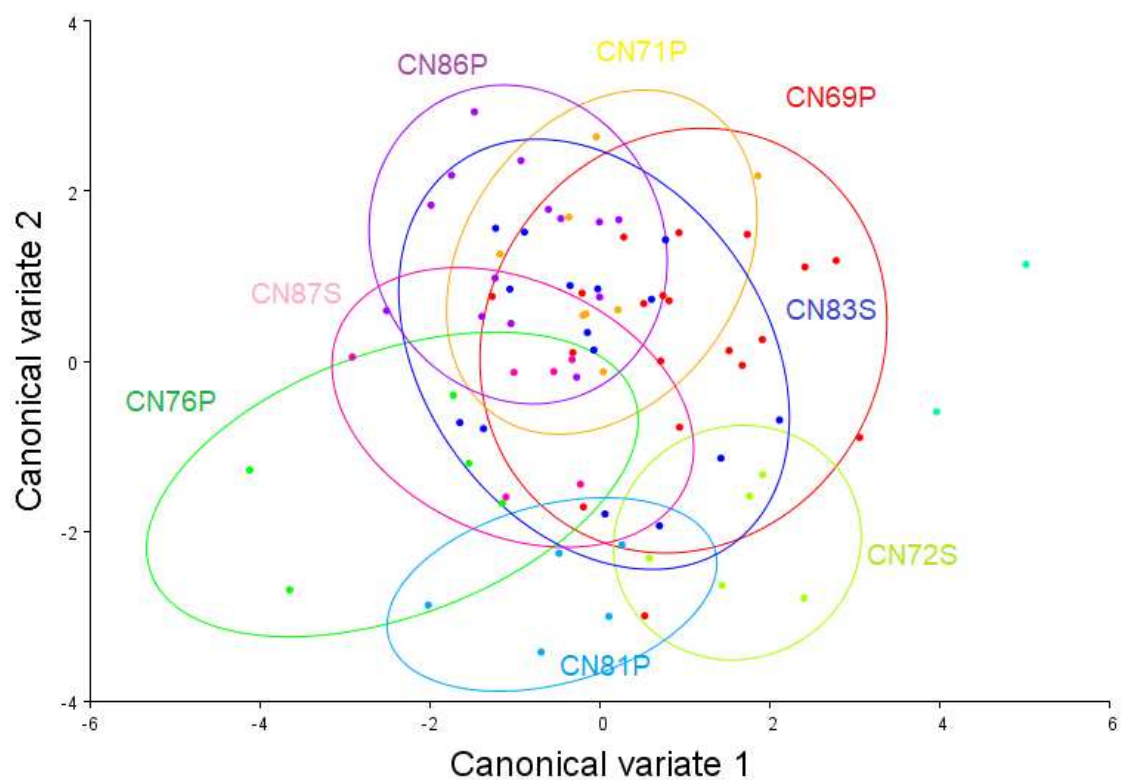


Figura 19: Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares fêmeas de Currais Novos.

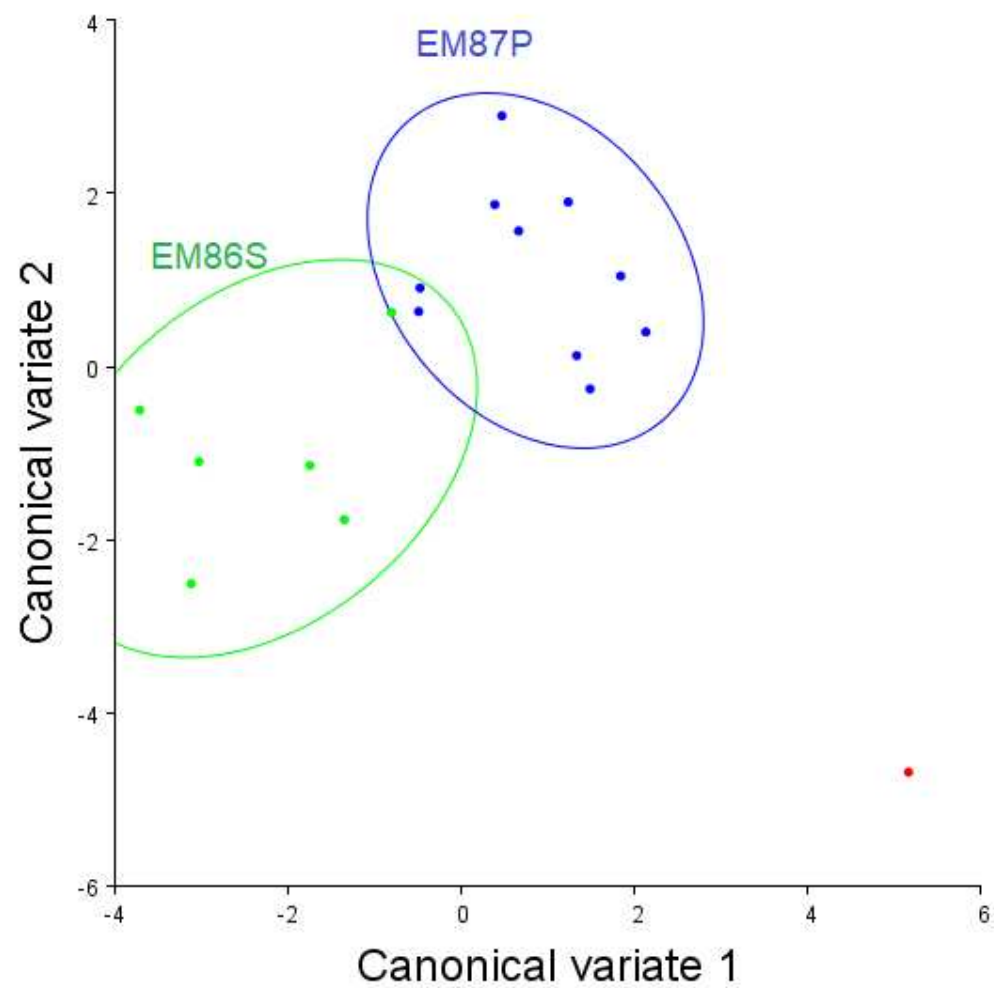


Figura 20: Mapas fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares fêmeas de Emas.

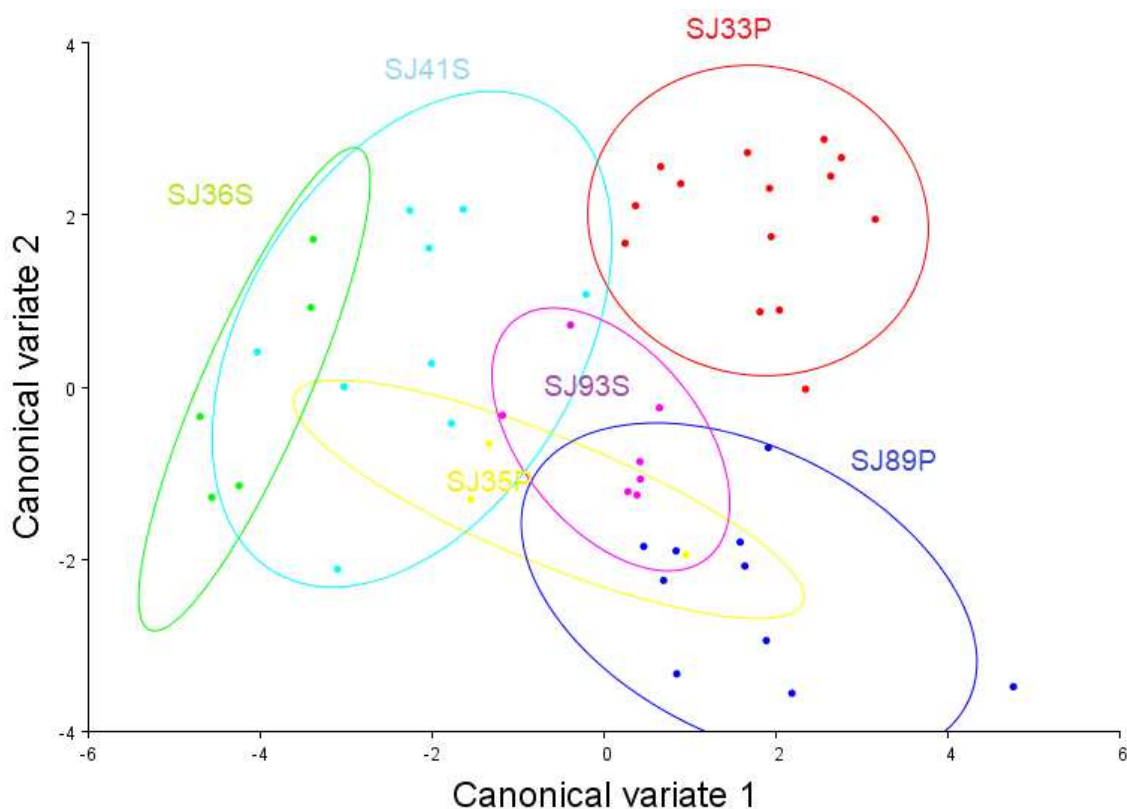


Figura 21: fatoriais construídos com as Análises das Variáveis Canônicas demonstrando o agrupamento entre as populações de exemplares fêmeas de São Jose dos Espinharas.

5.3. Resultados das análises moleculares

Ao total foram sequenciadas 220 indivíduos distribuídas em 30 populações, o número de indivíduos sequenciados por população variou de cinco à dez (Tabela 7). Para o total das sequências, foram observados 57 sítios segregantes, 52 haplótipos e uma diversidade haplotípica de 0,92. A diversidade nucleotídica foi 0,00601.

As sequências foram agrupadas de acordo com cada população e o resultado dos valores de Φ_{ST} par-a-par gerou uma matriz, que foi usada para construção de uma árvore de similaridade, que foi confrontada com os resultados morfométricos (Figura 22).

Tabela 7 Amostragem de cada população para os estudos moleculares

#	População	Nº de Sequencias	Cidade	Ecotopo
1	CC51S	9	Caicó	Silvestre
2	CC52S	4	Caicó	Silvestre
3	CN69P	10	Currais Novos	Peridomiciliar

4	CN71P	10	Currais Novos	Peridomiciliar
5	CN72S	10	Currais Novos	Silvestre
6	CN73P	1	Currais Novos	Peridomiciliar
7	CN74P	9	Currais Novos	Peridomiciliar
8	CN75D	1	Currais Novos	Domiciliar
9	CN76P	10	Currais Novos	Peridomiciliar
10	CN77S	8	Currais Novos	Silvestre
11	CN81P	10	Currais Novos	Peridomiciliar
12	CN83S	9	Currais Novos	Silvestre
13	CN84P	5	Currais Novos	Peridomiciliar
14	CN86P	10	Currais Novos	Peridomiciliar
15	CN87S	10	Currais Novos	Silvestre
16	CZ15D	4	Cajazeiras	Domiciliar
17	CZ16P	9	Cajazeiras	Peridomiciliar
18	CZ18P	10	Cajazeiras	Peridomiciliar
19	CZ19P	7	Cajazeiras	Peridomiciliar
20	CZ21D	10	Cajazeiras	Domiciliar
21	EM86S	3	Emas	Silvestre
22	EM87S	3	Emas	Silvestre
23	EM89P	4	Emas	Peridomiciliar
24	EM93S	3	Emas	Silvestre
25	EM94P	8	Emas	Peridomiciliar
26	MV188P	10	Marcelino Vieira	Peridomiciliar
27	MV216S	10	Marcelino Vieira	Silvestre
28	MV29P	10	Marcelino Vieira	Peridomiciliar
29	MV92P	4	Marcelino Vieira	Peridomiciliar
30	SJ41S	9	São Jose dos Espinharas	Silvestre

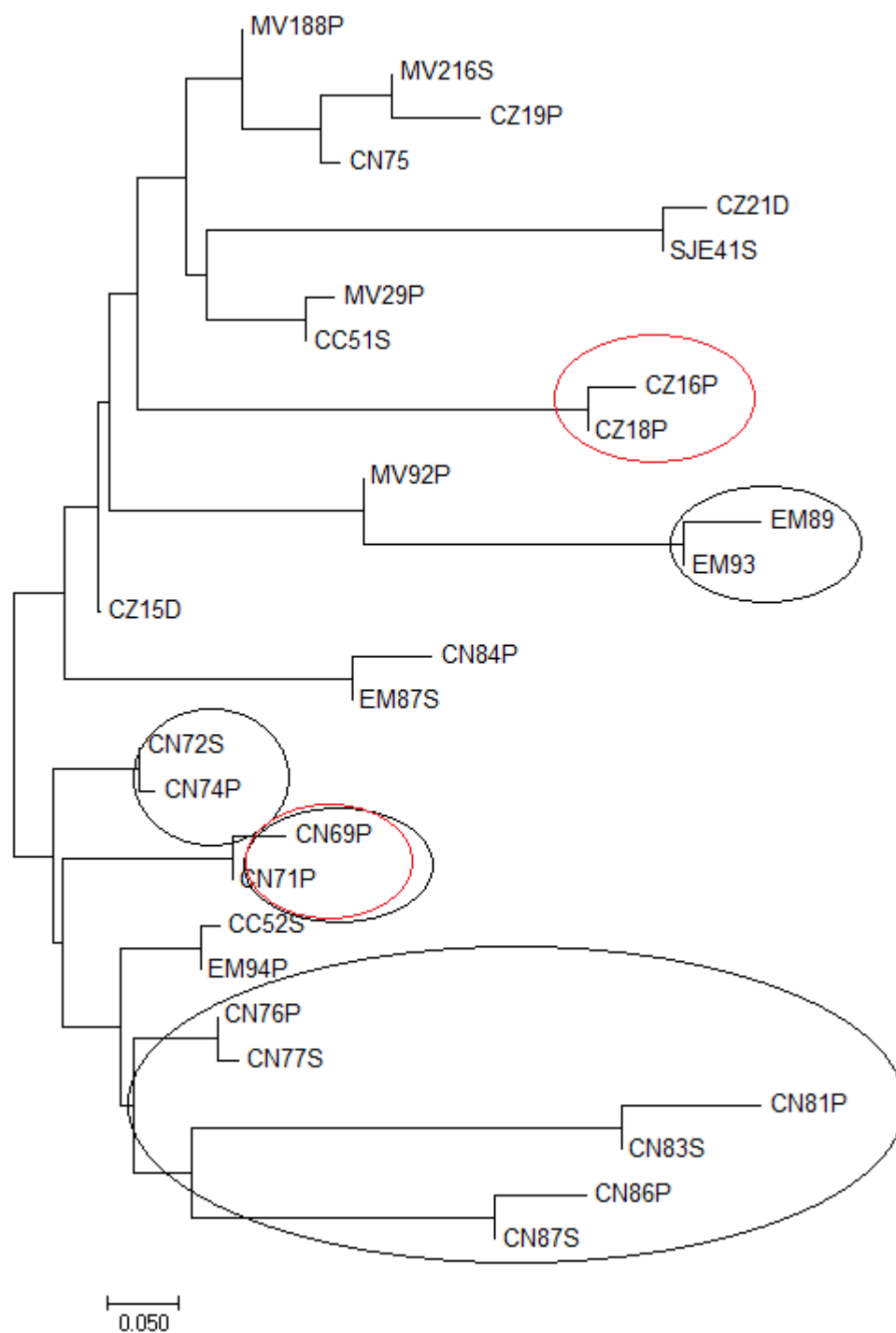


Figura 22: Árvore de semelhança construído com as populações formadas por sequências

A árvore de Φ_{ST} (Figura 21) evidenciou a força geográfica da distribuição da variação genética. Por exemplo, a maioria das populações de Currais Novos (CN#) estão associadas no mesmo ramo. Isso foi observado para algumas populações de Cajazeiras (CZ#) e Emas (EM#). A maior discrepância entre a árvore morfométrica e molecular foi que somente a morfométrica evidenciou associação entre as populações de Marcelino Vieira (MV#) (Figura 9 e 10).

5.3.1. Testes de neutralidade e estatísticas de variação molecular

Os testes de Tajima e FS de Fu indicaram que, em geral, as sequências de DNA estão evoluindo aleatoriamente ("neutra"). As exceções foram para as populações silvestres de Caicó (CC51S; Tajima D), peridomiciliares de Currais Novos (CC69P e CN86PFS de Fu e D de Tajima). As mais maiores diversidades haplotípicas foram observadas para as populações CC51S (0,9556 +/-0,0594), CN76P (0,8444 +/-0,0796), CZ15D (0,8333 +/-0,2224), CN74P (0,8056 +/-0,1196) e SJ41S (0,8056 +/-0,1196). O Π da população SJ41S também foi alto (0,003853 +/-0,002802), MV29P (0,002486 +/-0,001997) e MV216S (0,001491 +/-0,001424), sendo o restante abaixo de 0,001).

Tabela 8 Testes de Fu e Tajima para as populações

#	População	Nº de ind	Hd (s.d.)	π (s.d.)	FS	D	
1	CC51S	9	0,9556 +/-0,0594	0,005966 +/-0,003920	-1,08864	-3,97101	
2	CC52S	4	0,5000 +/-0,2652	0,003356 +/-0,002994	-0,75445	1,71605	
3	CN69P	10	0,6444 +/-0,1518	0,001690 +/-0,001529	-1,03446	-1,46598	
4	CN71P	10	0,5556 +/-0,0745	0,008700 +/-0,005390	2,42128	6,44791	
5	CN72S	10	0,5556 +/-0,1653	0,004474 +/-0,003149	-0,41031	1,79046	
6	CN73P	1	1,0000 +/-0,0000	0,000000 +/-0,000000	0		
7	CN74P	9	0,8056 +/-0,1196	0,006463 +/-0,004244	0,54268	-0,03639	
8	CN75D	1	1,0000 +/-0,0000	0,000000 +/-0,000000	0		
9	CN76P	10	0,8444 +/-0,0796	0,003629 +/-0,002642	-0,97273	-1,08351	
10	CN77S	8	0,6786 +/-0,1220	0,001758 +/-0,001614	0,06935	-0,2236	
11	CN81P	10	0,0000 +/-0,0000	0,000000 +/-0,000000	0		
12	CN83S	9	0,7500 +/-0,1121	0,004350 +/-0,003080	0,24121	0,33148	
13	CN84P	5	0,9000 +/-0,1610	0,006711 +/-0,004901	-0,74682	-0,33158	
14	CN86P	10	0,2000 +/-0,1541	0,000895 +/-0,001019	-1,40085	0,58622	
15	CN87S	10	0,8000 +/-0,1001	0,003778 +/-0,002725	-0,8427	-0,99008	
16	CZ15D	4	0,8333 +/-0,2224	0,003729 +/-0,003249	0,16766	-0,13331	
17	CZ16P	9	0,2222 +/-0,1662	0,000497 +/-0,000731	-1,08823	-0,26348	
18	CZ18P	10					
19	CZ19P	7	0,0000 +/-0,0000	0,000000 +/-0,000000	0		
20	CZ21D	10	0,2000 +/-0,1541	0,000447 +/-0,000681	-1,11173	-0,33931	
21	EM86S	3	1,0000 +/-0,2722	0,007457 +/-0,006482	0	-0,07696	
22	EM87S	3	0,6667 +/-0,3143	0,007457 +/-0,006482	0	2,35665	
23	EM89P	4	0,0000 +/-0,0000	0,000000 +/-0,000000	0		
24	EM93S	3	1,0000 +/-0,2722	0,007457 +/-0,006482	0	-0,07696	
25	EM94P	8	0,7857 +/-0,1127	0,004634 +/-0,003292	-0,48874	0,22617	
26	MV188P	10	0,5111 +/-0,1643	0,001690 +/-0,001529	-1,03446	-0,04647	
27	MV216S	10	0,4167 +/-0,1907	0,001491 +/-0,001424	-1,51297	-0,38021	
28	MV29P	10	0,6444 +/-0,1518	0,002486 +/-0,001997	-0,82229	-0,65694	
29	MV92P	4	0,0000 +/-0,0000	0,000000 +/-0,000000	0		
30	SJ41S	9	0,8056 +/-0,1196	0,003853 +/-0,002802	-0,27046	-1,18527	Sã

5.3.2. Estrutura genética

. As populações foram agrupadas de acordo com o município, observa-se que 18% da variação está entre os municípios e 36% entre populações dentro dos municípios, conforme evidenciado pelo teste AMOVA. Seguindo a hipótese de que a estrutura genética possa sofrer influência ecotípica (migração predominante entre mesmos ecótopos) um segundo teste foi feito formando grupos de populações definidas pelo seu ecótopo em cada município. Nesse agrupamento, o percentual de variação entre grupos foi ainda mais baixo (10%) e a variação dentro dos grupos foi mais elevada (41%). Em ambos os agrupamentos, a maior parte da variação foi notada dentro das populações (46-49%).

Tabela 9 Análise de Variância Molecular AMOVA. Percentual de variação explicada em cada nível espacial/ecotópico e índices de fixação para a amostragem agrupada de acordo com os municípios ou para populações ecotípicas dentro dos municípios

	d.f.	Componente da Variação	Percentual de variação	Índice de Fixação	<i>P</i>
Variação entre os municípios	3	0,29 Va	18%	0,17 FCT	0,0010
Entre populações dentro dos municípios	11	0,58 Vb	36%	0,76 FSC	<0,0001
Dentro das populações	115	0,76 Vc	46%	0,54 FST	<0,0001
Entre grupos de populações ecotípicas em cada município	4	0,16 Va	10%	0,10 FCT	0,050
Entre populações dentro dos grupos	10	0,63 Vb	41%	0,46 FSC 0,51327	<0,0001
Dentro das populações	115	0,76 Vc	49%	FST	<0,0001

5.4. Correlação entre matrizes

Todos os testes de Mantel, confrontando as matrizes mostraram correlação significativa ($P < 0,05$). A mais alta correlação ocorreu entre as distâncias de Mahalanobis entre machos e fêmeas ($R^2 = 0,74$). A segunda maior correlação foi observada entre as distâncias de Φ_{ST} e distância geográfica ($R^2 = 0,36$). Para ambos os sexos as correlações da distância de Mahalanobis com o Φ_{ST} foram baixas ($R^2 = 0,13-0,15$).

6. Discussão

As diferenças entre os padrões de distribuição da variação morfométrica e genética tem sido extensivamente exploradas (Nattero et al., 2017; Selnekovič and Kodada, 2019; Sontigun et al., 2019). Para o complexo *T. brasiliensis* as variações moleculares e morfométricas interespecíficas já foram também estudadas (Costa et al., 2009; Almeida et al., 2012; Oliveira et al., 2017). As variações populacionais baseadas na morfologia podem ser influenciadas pela variação ecotípica (ambiental), mas também ao sofrerem influência da carga genética do indivíduo, admite-se a possibilidade de que essa variação seja utilizada para reconhecer processos microevolutivos (Dujardin et al. 2017). O primeiro estudo neste sentido para *T. brasiliensis* lançou mão da morfometria clássica (Borges et al., 2005), que admite-se apresentar resolução limitada. O segundo estudo teve abrangência geográfica e número amostral restrito (N=97), mas foi pioneiro por lançar mão da morfometria geométrica (Batista et al., 2013). Este estudo traz o primeiro trabalho usando uma ampla amostragem (N inicial de 733 insetos) amostrada em uma mais larga escala geográfica – alcançando 240 km – para *T. brasiliensis*. Além disso, as informações morfométricas são aqui associadas com a variação genotípica. Gaspe et al., (2013) concluíram que informações morfométricas combinadas com dados genéticos e de campo, podem contribuir para a compreensão do processo de reinfestação e melhoria das estratégias de controle de vetores. Neste estudo, a variação molecular foi usada com uma forma de controle, pois o marcador escolhido (variação no gene mitocondrial Cyt B) não sofre efeito da variação ambiental. Assim, este trabalho também é pioneiro para a compreensão do efeito ecotípico na variação morfométrica.

Das 733 asas, 35 foram consideradas *outliers*, restando 698 amostras: 298 fêmeas e 400 machos. De acordo com Klingenberg (2011), os *outliers* representam dados discrepantes que podem ter diversas origens, como o efeito do usuário (ex: captura de *landmarks* em distintas ordens) ou má-formação do inseto. Devido à natureza plana das asas, elas são interessantes estruturas para estudos da morfometria com dados bidimensionais (Dujardin, 2007). Para *T. brasiliensis*, Batista et al. (2013) mencionaram que as asas foram mais informativas que as cabeças para estudos microevolutivos usando a morfometria geométrica. A comparação morfométrica baseada na geometria

alar entre os sexos demonstrou que as fêmeas são significativamente maiores que os machos, fato também conhecido para outros triatomíneos, como para *T. infestans* (Schachter-Broide et al., 2004; Gaspe et al., 2013).

Considerando toda a amostragem agrupada de acordo com o ecótopo e para cada sexo, pode-se observar no PCA que houve relativo agrupamento ecotípico. Batista et al. (2013) encontraram diferenças significantes entre *T. brasiliensis* coletados em diferentes ecótopos, o que foi também constatado neste estudo. Os indivíduos peridomiciliares foram significativamente maiores que os silvestres. Costa et al., (1998) mencionaram que populações silvestres de *T. brasiliensis* são encontradas geralmente famintas, o que pode explicar a diferença no tamanho. A morfometria geométrica minimiza fortemente o fator tamanho, mas não o elimina totalmente (Dujardin, 2017). O ecótopo parece influenciar na variação morfométrica, o que pode representar o viés da morfometria geométrica. Entretanto, como discutido a seguir, algumas populações peridomiciliares foram mais associadas morfometricamente a algumas silvestres do que outras peridomiciliares em microescala geográfica, indicando que essa metodologia pode ser usada para avaliar a estrutura populacional, ou processos microevolutivos.

Nos dendrogramas derivados das distâncias de Mahalanobis, foi possível observar alguns agrupamentos dirigidos pela força geográfica. A região de Patos é composta pelos municípios de Emas, São José dos Espinharas, Santa Teresinha, Condado, todos no estado da PB. Dentro dessa região, muitos grupos de populações não evidenciaram diferenciação significativa entre si. Baixas distâncias de Mahalanobis (e não significativas) foram observadas entre os grupos de Emas vs São José dos Espinharas e entre São José dos Espinharas e Santa Teresinha (ambas menores que 1,54), o que faz sentido sob o ponto de vista geográfico. Algumas distâncias mais baixas que essa podem ter sido causadas pela grande variabilidade intrapopulacional (Dujardin et al., 2009). Entretanto, o teste de Mantel evidenciou fraca correlação entre as matrizes de distância morfométrica e geográfica. Para *T. infestans* na Argentina, a resolução da morfometria geométrica para detectar diferenciações em macroescala geográfica foi mais evidente nas comparações dos indivíduos

separados por município (Gaspe et al., 2015). No entanto, os autores não aplicaram os testes de correlação entre matrizes.

De acordo com Klingenberg (2011), a PCA é o método mais popularmente utilizado para caracterizar a variação de forma. Entretanto, quando os dados contiverem subgrupos, a PCA deve ser usado como um método de ordenação dos grandes grupos, sendo a análise de variáveis canônicas (CVA) a mais adequada para os subgrupos. De fato, os mapas fatoriais construídos com as CVAs em populações definidas por ponto de coleta dentro de cada municípios (em microescala geográfica) foram os únicos a delimitar as populações. Testes pilotos com CVAs também não apontaram grupos definidos em macroescala geográfica. Para ambos os sexos a estruturação não foi definida para as populações de Currais Novos e para Caicó houve definição apenas para as fêmeas. A falta de correlação entre os mapas de CVAs entre os sexos pra Caicó pode indicar um padrão de migração diferente. Apesar dessa diferença, o teste de Mantel apontou 73% de correlação entre as distâncias de Mahalanobis de machos e fêmeas. Para *T. dimidiata* (Latreille, 1811) na Guatemala, Stevens et al. (2015) não encontraram diferenças significativas no fluxo gênico entre os sexos dos insetos usando microsatélites. Entretanto, para *T. juazeirensis* – um membro do complexo *T. brasiliensis* – Carbajal de la Fuente et al. (2007) encontraram mais machos do que fêmeas que foram coletados em armadilhas luminosas, as quais captura insetos voadores (dispersantes). Lillioso et al. (2017) também capturaram via busca ativa, em geral, mais que o dobro de machos do que de fêmeas. Essa relação foi inversa para insetos peridomiciliares. É importante reconhecer a diferença nos métodos de captura em ambientes peridomésticos e silvestres. Esses últimos autores relatam a captura noturna de insetos que estão se dispersando no ambiente silvestre, ao passo que para o ambiente peridoméstico as capturas são diurnas, sendo capturado os insetos inativos.

As 220 sequências do gene mitocondrial Cyt B de *T. brasiliensis* foram distribuídas em 30 populações. Para mosquitos, Lorenz et al. (2017) apresentaram pistas interessantes sobre padrões seletivos observados por marcadores moleculares, que foram corroborados por marcadores morfométricos. Entretanto, os testes de neutralidade apontaram, em geral, para

evolução aleatória ("neutra"). Ou seja, sem indícios de seleção direcional ou seleção de equilíbrio, expansão ou contração demográfica. Isso vai de encontro aos resultados de Almeida et al. (2008) – usando o mesmo gene. A análise de variância molecular hierárquica (AMOVA) foi conduzida para avaliar o papel das forças geográficas e ecotípicas na estrutura genética de *T. brasiliensis*. Neste caso, sabe-se que o ecótopo não influencia o genótipo, mas para outros vetores o fluxo gênico ocorre predominantemente entre os ecótopos, como o observado para *T. infestans* nos vales andinos (Piccinali et al., 2011). Nem a força geográfica tampouco a ecotípica explicou a distribuição da variação molecular, pois um maior percentual de variação foi notado dentro dos grupos e dentro das populações geográficas e ecotípicas. Esses resultados estão de acordo com Almeida et al. (2008), embora estes autores tenham notado uma maior influência da força ecotípica.

De acordo com Lorenz et al., (2014), a morfometria geométrica pode ser aplicada tanto para a compreensão de processos macroevolutivos quanto microevolutivos em insetos vetores. No que se refere aos processos microevolutivos, em geral, o dendrograma construído com as matrizes de Φ_{ST} revelaram a força geográfica da distribuição da variação genética. Por exemplo, a maioria das populações de Currais Novos (CN#) se posicionaram no mesmo ramo. Isso foi observado para algumas populações de Cajazeiras (CZ#) e Emas (EM#). Ambos os marcadores moleculares e morfométricos indicaram associação entre uma população silvestre (MV21S) e peridoméstica (MV18P) de Marcelino Vieira. É importante ressaltar que essa última foi coletada no sítio do engenho onde aconteceu o surto chagásico (Vargas et al. 2018).

O confronto dos resultados das ferramentas moleculares e morfométricas mostrou baixa conformidade. Mas em ambos os dendrogramas as populações de Cajazeiras e Currais Novos se agruparam em um mesmo ramo. Essa conformidade já foi testada por outros autores e para outras espécies, como é o caso do *T. dimidiata* na península de Ycantán no México (Dumonteil et al., 2007b) e para *T. infestans* na Argentina (Piccinali and Gurtler, 2015).

A estratégia de se observar as variações dentro de uma menor escala geográfica visou buscar pistas sobre os processos de infestação

(peri)domiciliar. Assim, no que se refere aos vetores da doença de Chagas no Brasil, este trabalho é a primeira tentativa de testar por meio da morfometria geométrica os processos de infestação (peri)domiciliar

Schachter-Broide et al. (2004) aplicaram essa abordagem para testar a infestação de *T. infestans* na Argentina e concluíram que a morfometria geométrica representa uma metodologia útil para essa finalidade. Entretanto, as populações avaliadas por esses autores provêm somente de ecótopos artificiais. Tendo em vista que foi notado previamente que o ecótopo parece exercer importante efeito na variação morfométrica, as associações morfométricas entre populações de distintos ecótopos podem ser encaradas como importantes pistas dos processos de infestação – quando analisados dentro de um mesmo município. Neste sentido, a morfometria geométrica foi mais sensível para delimitar as populações em microescala geográfica do que em macroescala (para grupos de populações) o que foi evidenciado nos mapas fatoriais. Por exemplo, nos mapas que ilustram as análises das variáveis canônicas – tanto para machos quanto para as fêmeas – as populações peridomiciliares de Cajazeiras e São José dos Espinharas apresentaram grupos bem definidos e diferenciados entre si, o que coloca em questão o papel do ecótopo na distribuição da variação morfométrica. Esses achados corroboram a linha de pensamento de que essa metodologia pode ser usada para a detecção dos focos de infestação (Dujardin et al. 2007).

É possível que o genoma da espécie *T. brasiliensis* carregue uma carga que permita igual plasticidade morfológica ao longo de todo o alcance da coleta. Entretanto, eventos demográficos, tais como gargalos ou efeito fundador, podem estar atuando para manter a homogeneidade em grupos de insetos coletados em um mesmo ponto. A retenção do caráter ancestral em todas as populações amostradas pode também auxiliar na explicação desses resultados. Essa retenção foi constatada neste trabalho também por análises moleculares: o haplótipo ancestral do Cyt B é o mais frequente em todo o alcance da coleta, sendo este fenômeno já bem conhecido para *T. brasiliensis* por outros autores (Monteiro et al., 2004; Almeida et al., 2008, 2016; Lima-Oliveira et al., 2020). O poder demonstrado pela morfometria geométrica para

delimitar populações pontuais em microescala geográfica indica que essa metodologia apresenta mais resolução do que o marcador molecular utilizado.

Em muitos casos, ambos marcadores sugeriram uma estruturação geográfica e ecotípica para *T. brasiliensis*. Mas houve exceções para quase todos os grupos de populações, o que foi refletido na baixa correlação da diferenciação genética/morfométrica vs distância geográfica. Entretanto, como houve resolução na delimitação populacional em microescala geográfica para a morfometria geométrica – que esteve em conformidade com resultados da variação molecular – a combinação destes marcadores pode auxiliar na tomada de decisão para medidas de controle mais racionais, direcionadas e com economia de recursos (como o aplicado nas borrifações domiciliares por inseticidas). A comparação da geometria da venação das asas dos triatomíneos é uma técnica barata e de rápida execução. Os resultados aqui apresentados indicam existir potencial aplicabilidade dessa técnica nas medidas de controle vetorial, como por exemplo priorizar os esforços de controle em áreas morfometricamente próximas por possuírem mais probabilidade de haver fluxos migratórios em comum entre essas populações.

7. Conclusões

- A força ecotípica parece influenciar a distribuição da variação morfométrica, mas não da variação molecular;
- As populações mostraram mais estruturação morfométrica em microescala geográfica do que em macroescala, o que pode ser resultado da plasticidade fenotípica da espécie, associada a processos demográficos – que levam a homogeneização morfológica nos pontos de coleta;
- Apesar do relativo agrupamento geográfico, o teste de Mantel indicou que a distância geográfica não explica a variação morfométrica e molecular;
- Os testes de Mantel indicaram discordâncias para a correlação entre as matrizes de diferenciação molecular e distâncias de Mahalanobis;
- Os achados indicam que a morfometria geométrica pode auxiliar na detecção de processos demográficos ou microevolutivos em microescala geográfica;
- Como a morfometria é uma técnica barata, de rápida execução e processamento, existe o potencial para sua aplicação nas medidas de controle vetorial.

Referências Bibliográficas

- Abad-Franch, F., Diotaiuti, L., Gurgel-Gonçalves, R., Gürtler, R.E., 2013. Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: Cui bono? Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 251–254. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013022>
- Almeida, C.E., Faucher, L., Lavina, M., Costa, J., Harry, M., 2016a. Molecular Individual-Based Approach on *Triatoma brasiliensis*: Inferences on *Triatomine Foci*, *Trypanosoma cruzi* Natural Infection Prevalence, Parasite Diversity and Feeding Sources. PLoS Negl. Trop. Dis. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004447>
- Almeida, C.E., Faucher, L., Lavina, M., Costa, J., Harry, M., 2016b. Molecular Individual-Based Approach on *Triatoma brasiliensis*: Inferences on *Triatomine Foci*, *Trypanosoma cruzi* Natural Infection Prevalence, Parasite Diversity and Feeding Sources. PLoS Negl. Trop. Dis. 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004447>
- Almeida, C.E., Marcet, P.L., Gumiel, M., Takiya, D.M., Cardozo-de-Almeida, M., Pacheco, R.S., Lopes, C.M., Dotson, E.M., Costa, J., 2009. Phylogenetic and Phenotypic Relationships Among *Triatoma carcavallo* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and Related Species Collected in Domiciles in Rio Grande do Sul State, Brazil. J. Vector Ecol. <https://doi.org/10.3376/038.034.0201>
- Almeida, C.E., Oliveira, H.L., Correia, N., Dornak, L.L., Gumiel, M., Neiva, V.L., Harry, M., Mendonça, V.J., Costa, J., Galvão, C., 2012. Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. Acta Trop. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.12.001>
- Almeida, C.E., Pacheco, R.S., Haag, K., Dupas, S., Dotson, E.M., Costa, J., 2008a. 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.
- Almeida, C.E., Pacheco, R.S., Haag, K., Dupas, S., Dotson, E.M., Costa, J., 2008b. 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.
- Barbosa-Silva, A.N., Da Câmara, A.C.J., Martins, K., Nunes, D.F., de Oliveira, P.I.C., de Azevedo, P.R.M., Chiari, E., Galvão, L.M. da C., 2016. Characteristics of triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 49, 57–67. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0300-2015>
- Batista, V.S.P., Fernandes, F.A., Cordeiro-Estrela, P., Sarquis, O., Lima, M.M., 2013. Ecotope effect in *Triatoma brasiliensis* (hemiptera: Reduviidae) suggests phenotypic plasticity rather than adaptation. Med. Vet. Entomol. 27, 247–254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01043.x>
- Borges, E.C., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Romanha, a J., Diotaiuti, L., 2000.

- Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) populations. J. Med. Entomol. 37, 872–7. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.6.872>
- Borges, É.C., Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Romanha, A.J., Diotaiuti, L., 2005. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceará State, Northeastern Brazil. Acta Trop. 93, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.10.002>
- Bouyer, J., Ravel, S., Dujardin, J.P., de Meeüs, T., Vial, L., Thévenon, S., Guerrini, L., Sidibé, I., Solano, P., 2007. Population structuring of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera: Glossinidae) according to landscape fragmentation in the Mouhoun river, Burkina Faso. J. Med. Entomol. 44, 788–795. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2007\)44\[788:PSOGPG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2007)44[788:PSOGPG]2.0.CO;2)
- Carbajal de la Fuente, A.L., Minoli, S.A., Lopes, C.M., Noireau, F., Lazzari, C.R., Lorenzo, M.G., 2007. Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. Acta Trop. 101, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.12.007>
- Chagas C (1909). Nova Tripanozomíaze humana. Estudos sôbre 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.
- Corrêa RR and Spínola HN (1964). Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral, Ceará (Hemiptera, Reduviidae). Arq. Hig. Saude Publica 29: 115-127
- Costa, J., Almeida, C.E., Dotson, E.M., Lins, A., Vinhaes, M., Silveira, A.C., Beard, C. Ben, 2003a. The Epidemiologic Importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas Disease Vector in Brazil: A Revision of Domiciliary Captures during 1993-1999. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000400002>
- Costa, J., Almeida, C.E., Dotson, E.M., Lins, A., Vinhaes, M., Silveira, A.C., Beard, C. Ben, 2003b. 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. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000400002>
- Costa, J., Almeida, C.E., Dujardin, J.P., Beard, C.B., 2003c. Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 637–639. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000500009>
- Costa, J., Almeida, C.E., Dupas, S., Dotson, E.M., Pacheco, R.S., Haag, K., 2018. 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. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.791>
- Costa, J., Argolo, A.M., Felix, M., 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).

Zootaxa 47–52.

- Costa, Jane, Bargues, M.D., Neiva, V.L., Lawrence, G.G., Gumiel, M., Oliveira, G., Cabello, P., Lima, M.M., Dotson, E., Provance, D.W., Almeida, C.E., Mateo, L., Mas-Coma, S., Dujardin, J.P., 2016. Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of *Triatoma brasiliensis* species complex. *Infect. Genet. Evol.* 37, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.025>
- Costa, J., Bargues, M.D., Neiva, V.L., Lawrence, G.G., Gumiel, M., Oliveira, G., Cabello, P., Lima, M.M., Dotson, E., Provance, D.W., Almeida, C.E., Mateo, L., Mas-Coma, S., Dujardin, J.P., 2016. Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of *Triatoma brasiliensis* species complex. *Infect. Genet. Evol.* 37, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.025>
- Costa, J., Cordeiro Correia, N., Neiva, V.L., Gonçalves, T.C.M., Felix, M., 2013. Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 785–789. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108062013016>
- Costa, J., Dornak, L.L., Almeida, C.E., Peterson, A.T., 2014. Distributional potential of the *Triatoma brasiliensis* species complex at present and under scenarios of future climate conditions. *Parasites and Vectors* 7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-238>
- Costa, J., Felix, M., 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 87–90. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000100015>
- Costa, J., Freitas-Sibajev, M.G.R., Marchon-Silva, V., Pires, M.Q., Pacheco, R.S., 1997. Isoenzymes Detect Variation in Populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 459–464. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000400002>
- Costa, J., Peterson, A.T., Dujardin, J.P., 2009. Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). *Infect. Genet. Evol.* 9, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.12.005>
- Costa, J., Ribeiro De Almeida, J., Britto, C., Duarte, R., Marchon-Silva, V., Pacheco, R.D.S., 1998. Ecotopes, Natural Infection and Trophic Resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761998000100002>
- Cucunubá, Z.M., Okuwoga, O., Basáñez, M.-G., Nouvellet, P., 2016. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasit. Vectors* 9, 42. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1315-x>
- de la Fuente, A.L.C., Jaramillo, N., Barata, J.M.S., Noireau, F., Diotaiuti, L., 2011. Misidentification of two Brazilian triatomines, *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi*, revealed by geometric morphometrics. *Med. Vet. Entomol.* 25, 178–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2010.00912.x>
- Dujardin, J.P. Al, Kaba, D., Henry, A.B., 2010. The exchangeability of shape.

- BMC Res. Notes. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-266>
- Dujardin, J.P., 2017. Modern Morphometrics of Medically Important Arthropods, in: Genetics and Evolution of Infectious Diseases: Second Edition. pp. 285–311. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00013-5>
- Dujardin, J.P., 2008. Morphometrics applied to medical entomology. Infect. Genet. Evol. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.011>
- Dujardin, J.P., Costa, J., Bustamante, D., Jaramillo, N., Catalá, S., 2009. Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. Acta Trop. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.026>
- Dumonteil, E., Tripet, F., Ramirez-Sierra, M.J., Payet, V., Lanzaro, G., Menu, F., 2007a. Assessment of *Triatoma dimidiata* dispersal in the Yucatan Peninsula of Mexico by morphometry and microsatellite markers. Am. J. Trop. Med. Hyg. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.930>
- Dumonteil, E., Tripet, F., Ramirez-Sierra, M.J., Payet, V., Lanzaro, G., Menu, F., 2007b. Assessment of *Triatoma dimidiata* dispersal in the Yucatan Peninsula of Mexico by morphometry and microsatellite markers. Am. J. Trop. Med. Hyg. 76, 930–937.
- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L., 2015. Arlequin v3.5 user manual. Mol. Ecol. Resour. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C., 1996. Introduction to quantitative genetics. Introd. to Quant. Genet. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.04.029>
- Galvão AB 1956. *Triatoma brasiliensis macromelasoma* n. subsp. (Reduviidae: Hemiptera). Rev Bras Mal D Trop 7: 455-457.
- Galvão, C., Jurberg, J., 2014. Introdução, Vetores da Doença de Chagas no Brasil. <https://doi.org/10.7476/9788598203096>
- Gardim, S., Almeida, C.E., Takiya, D.M., Oliveira, J., Araújo, R.F., Cicarelli, R.M.B., Da Rosa, J.A., 2014. Multiple mitochondrial genes of some sylvatic Brazilian *Triatoma*: Non-monophyly of the *T. brasiliensis* subcomplex and the need for a generic revision in the Triatomini. Infect. Genet. Evol. 23, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.024>
- Gaspe, M.S., Gurevitz, J.M., Gürtler, R.E., Dujardin, J.P., 2013. Origins of house reinfestation with *Triatoma infestans* after insecticide spraying in the Argentine Chaco using wing geometric morphometry. Infect. Genet. Evol. 17, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.044>
- Gaspe, M.S., Provecho, Y.M., Piccinali, R.V., Gürtler, R.E., 2015. Where do these bugs come from? Phenotypic structure of *Triatoma infestans* populations after control interventions in the Argentine Chaco. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140376>
- Kaba, D., Ravel, S., Acapovi-Yao, G., Solano, P., Allou, K., Bosson-Vanga, H., Gardes, L., Ngoran, E.K., Schofield, C.J., Koné, M., Dujardin, J.P., 2012. Phenetic and genetic structure of tsetse fly populations (*Glossina palpalis palpalis*) in southern Ivory Coast. Parasites and Vectors 5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-153>
- Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. Mol. Ecol. Resour. 11, 353–357.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>

- Klingenberg, C.P., 2009. Morphometric integration and modularity in configurations of landmarks: Tools for evaluating a priori hypotheses. *Evol. Dev.* 11, 405–421. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00347.x>
- Lee, B.Y., Bacon, K.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J., 2013. Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. *Lancet Infect. Dis.* 13, 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. museum Nat. Hist.* 163, 123–520.
- Lilioso, M., Folly-Ramos, E., Rocha, F.L., Rabinovich, J., Capdevielle-Dulac, C., Harry, M., Marcet, P.L., Costa, J., Almeida, C.E., 2017. High *Triatoma brasiliensis* densities and *Trypanosoma cruzi* prevalence in domestic and peridomestic habitats in the State of Rio Grande do Norte, Brazil: The source for Chagas disease outbreaks? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 1456–1459. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0823>
- Lima-Oliveira, T.M., Fontes, F. von H.M., Lilioso, M., Pires-Silva, D., Teixeira, M.M.G., Meza, J.G.V., Harry, M., Fileé, J., Costa, J., Valença-Barbosa, C., Folly-Ramos, E., Almeida, C.E., 2020. Molecular eco-epidemiology on the sympatric Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrochiae*: Ecotopes, genetic variation, natural infection prevalence by trypanosomatids and parasite genotyping. *Acta Trop.* <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105188>
- Lorenz, C., Almeida, F., Almeida-Lopes, F., Louise, C., Pereira, S.N., Petersen, V., Vidal, P.O., Virginio, F., Suesdek, L., 2017. Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured? *Infect. Genet. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.029>
- Lorenz, C., Marques, T.C., Sallum, M.A.M., Suesdek, L., 2014. Altitudinal population structure and microevolution of the malaria vector *Anopheles cruzii* (Diptera: Culicidae). *Parasites and Vectors.* <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0581-8>
- Lucena, D.D., 1970. Estudo sobre a doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Malariol. e Doenças Trop.* 22, 2–174.
- Mantel, N., Valand, R.S., 1970. A Technique of Nonparametric Multivariate Analysis. *Biometrics.* <https://doi.org/10.2307/2529108>
- Martins-Melo, F.R., Ramos Junior, A.N., Alencar, C.H., Heukelbach, J., 2012. Multiple causes of death related to Chagas' disease in Brazil, 1999 to 2007. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 591–596. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000500010>
- Mendonça, V.J., Da Silva, M.T.A., De Araújo, R.F., Martins, J., Bacci, M., Almeida, C.E., Costa, J., Graminha, M.A.S., Cicarelli, R.M.B., Da Rosa, J.A., 2009. Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 858–864. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0664>
- MENDONÇA, V.J.; ALEVI, K.C.C.; PINOTTI, H.; GURGEL-GONGALVES, R.;

- PITA, S.; GUERRA, A.L.; PANZERA, F.; ARAÚJO, R.F.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ROSA, J.A. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa*, v. 4107, p. 239-254, 2016.
- Monteiro, Fernando A, Donnelly, M.J., Beard, C.B., Costa, J., 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.12.011>
- Monteiro, Fernando A., Donnelly, M.J., Beard, C.B., Costa, J., 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol. Phylogenet. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.12.011>
- Nattero, J., Cecere, M.C., Gürtler, R.E., 2017. Temporal variations of fluctuating asymmetry in wing size and shape of *Triatoma infestans* populations from northwest Argentina. *Infect. Genet. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.012>
- Oliveira, J., Marcet, P.L., Takiya, D.M., Mendonça, V.J., Belintani, T., Barges, M.D., Mateo, L., Chagas, V., Folly-Ramos, E., Cordeiro-Estrela, P., Gurgel-Gonçalves, R., Costa, J., da Rosa, J.A., Almeida, C.E., 2017. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the *Brasiliensis* subcomplex. *Acta Trop.* 170. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.020>
- Oliveira, Jader, Marcet, P.L., Takiya, D.M., Mendonça, V.J., Belintani, T., Barges, M.D., Mateo, L., Chagas, V., Folly-Ramos, E., Cordeiro-Estrela, P., Gurgel-Gonçalves, R., Costa, J., da Rosa, J.A., Almeida, C.E., 2017. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the *Brasiliensis* subcomplex. *Acta Trop.* 170, 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.020>
- Ostermayer, A.L., Passos, A.D.C., Silveira, A.C., Ferreira, A.W., Macedo, V., Prata, A.R., 2011. O inquérito nacional de soroprevalência de avaliação do controle da doença de chagas no Brasil (2001-2008). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 108–121. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000800015>
- Piccinali, R.V., Gurtler, R.E., 2015. Fine-scale genetic structure of *Triatoma infestans* in the Argentine Chaco. *Infect. Genet. Evol.* 34, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.05.030>
- Piccinali, R. V., Marcet, P.L., Ceballos, L.A., Kitron, U., Gürtler, R.E., Dotson, E.M., 2011. Genetic variability, phylogenetic relationships and gene flow in *Triatoma infestans* dark morphs from the Argentinean Chaco. *Infect. Genet. Evol.* <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.013>
- Reynolds, J., Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics*.
- Rohlf, F.J., 1990. Morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 229–316. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sarquis, O., Borges-Pereira, J., Mac Cord, J.R., Gomes, T.F., Cabello, P.H., Lima, M.M., 2004. Epidemiology of chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection

- in four localities of a rural area. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 99, 263–270. <https://doi.org/S0074-02762004000300004>
- Schachter-Broide, J., Dujardin, J.-P., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. J. Med. Entomol. 41, 643–649. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.643>
- Selnekovič, D., Kodada, J., 2019. Taxonomic revision of *Mordellistena hirtipes* species complex with new distribution records (Insecta, Coleoptera, Mordellidae). Zookeys. <https://doi.org/10.3897/zookeys.854.32299>
- Silveira, A.C., Dias, J.C.P., 2011. O controle da transmissão vetorial. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 52–63. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000800009>
- Silveira, A.C., Vinhaes, M., Lira, E., Araújo, E., 2001a. O Controle de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*. II: Avaliação do Controle Físico, Pela Melhor Habitacional, e Caracterização do Ambiente Peridomiciliar Favorável à Persistência da Infestação e Reinfestação por *Triatoma brasiliensis* e *Tria. Brasilia*: Organização Pan-Americana da Saúde.
- Silveira, A.C., Vinhaes, M.C., Lira, E., Araújo, E., 2001b. O Controle de *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*. I: Estudo do Tempo de Reposição das Condições de Transmissão da Doença de Chagas por *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata* em Areas Submetidas ao Tratamento Químico Domiciliar, e de. Organização Pan-Americana da Saúde, Brasilia: Organização Pan-Americana da Saúde.
- Slatkin, M., 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. Evolution (N. Y). 39, 53–65. <https://doi.org/10.2307/2408516>
- Solano, P., Kaba, D., Ravel, S., Dyer, N.A., Sall, B., Vreysen, M.J.B., Seck, M.T., Darbyshir, H., Gardes, L., Donnelly, M.J., De Meeûs, T., Bouyer, J., 2010. Population genetics as a tool to select tsetse control strategies: Suppression or eradication of *Glossina palpalis gambiensis* in the niayes of senegal. PLoS Negl. Trop. Dis. 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000692>
- Sontigun, N., Samerjai, C., Sukontason, K., Wannasan, A., Amendt, J., Tomberlin, J.K., Sukontason, K.L., 2019. Wing morphometric analysis of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) in Thailand. Acta Trop. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.011>
- Stevens, L., Monroy, M.C., Rodas, A.G., Hicks, R.M., Lucero, D.E., Lyons, L.A., Dorn, P.L., 2015. Migration and gene flow among domestic populations of the chagas insect vector *Triatoma dimidiata* (hemiptera: Reduviidae) detected by microsatellite loci. J. Med. Entomol. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv002>
- Valença-Barbosa, C., Fernandes, F.A., Santos, H.L.C., Sarquis, O., Harry, M., Almeida, C.E., Lima, M.M., 2015. Molecular identification of food sources in triatomines in the brazilian northeast: Roles of goats and rodents in chagas disease epidemiology. Am. J. Trop. Med. Hyg. 93, 994–997. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0156>
- Valença-Barbosa, C., Lima, M.M., Sarquis, O., Bezerra, C.M., Abad-Franch, F.,

2014. Modeling Disease Vector Occurrence When Detection Is Imperfect II: Drivers of Site-Occupancy by Synanthropic *Triatoma brasiliensis* in the Brazilian Northeast. PLoS Negl. Trop. Dis. 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002861>
- Vargas, A., Malta, J.M.A.S., Costa, V.M. da, Cláudio, L.D.G., Alves, R.V., Cordeiro, G. da S., Aguiar, L.M.A., Percio, J., 2018. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. Cad. Saude Publica 34. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00006517>
- WHO, 2017. Integrating neglected tropical diseases. World Heal. Organ. Fact Sheet March 2017.
- WHO, 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Heal. Organ. 1–184. <https://doi.org/10.1177/1757913912449575>
- Wright, S., 1934. The Method of Path Coefficients. Ann. Math. Stat. <https://doi.org/10.1214/aoms/1177732676>
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D., Fink, W.L., 2004. Geometric morphometrics for biologists: A primer. Elsevier 457. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386903-6.00001-0>

8. Anexos

8.1. Declaração de bioética/biossegurança



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Cabea Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada ***“Estrutura populacional de *Triatoma brasiliensis* de distintos ecótopos e municípios dos estados do Rio Grande do Norte e Paraíba inferida pela variação morfométrica e molecular”***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura:

Nome do(a) aluno(a): Edgard Hiromi Kamimura

Assinatura:

Nome do(a) orientador(a): Carlos Eduardo Almeida

Data: 29/05/2020

8.2. Declaração de direitos autorais

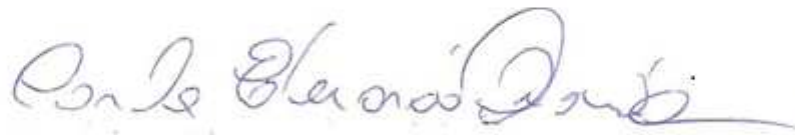
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicações em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação, intitulada "Estrutura populacional de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae) de distintos ecótipos e municípios dos estados brasileiros do Rio Grande do Norte e Paraíba inferida pela variação morfométrica e molecular" não infringem os dispositivos da Lei nº9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas 19/05/2020

Assinatura:  _____

Nome do autor: Edgard Hiromi Kamimura

RG: 37.939.911-8

Assinatura:  _____

Nome do orientador: Carlos Eduardo Almeida

RG: 090191297