

Rodrigo Gurgel Gonçalves

**Filogeografia, morfometria e distribuição geográfica potencial de populações
de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil**

Brasília

2008

Rodrigo Gurgel Gonçalves

**Filogeografia, morfometria e distribuição geográfica potencial de populações
de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil**

Tese de doutoramento aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, pelos membros componentes da banca examinadora:

Dr. César Augusto Cuba Cuba
Orientador

Dr. Fernando Abad-Franch
Avaliador - FIOCRUZ

Dra. Rosane Garcia Collevatti
Avaliadora - UCB

Dr. Reginaldo Constantino
Avaliador - UnB

Dr. Guarino Colli
Avaliador - UnB

Dr. Raúl Laumann
Avaliador - Emprapa/Cenargen

Pós-graduação em Ciências da Saúde

Universidade de Brasília

Brasília

2008

**Ao meu filho,
Eduardo Gurgel Lima**

Agradecimentos

Ao meu orientador e amigo **César Augusto Cuba Cuba**, pelo incentivo e confiança durante os últimos 10 anos de parceria. Seus conselhos foram fundamentais para a conclusão desta tese e sua trajetória como professor-pesquisador é um exemplo e inspiração para minha futura vida acadêmica;

Aos membros da banca: Dr. **Fernando Abad-Franch**, Dra. **Rosane Garcia Collevatti**, Dr. **Reginaldo Constantino**, Dr. **Guarino Colli** e Dr. **Raúl Laumann**; agradeço por aceitar o convite e participar desta importante etapa de minha vida acadêmica. Agradeço também aos Drs. **Paulo César Motta** e **Silviene Fabiana de Oliveira** por participarem da minha qualificação;

Ao **Fábio Oliveira Alves** pela amizade e companheirismo durante os trabalhos de campo. Nunca me esquecerei de nossas aventuras pelo Brasil afora, em busca dos “barbeiros dos buritis”;

Ao meu “fiel escudeiro”, **Jonatas Barbosa Cavalcante Ferreira**, obrigado pelo apoio constante durante o desenvolvimento do projeto. Desejo que você seja meu primeiro orientando de pós-graduação;

Aos estagiários **Saulo Gregory Luzzi** (análise filogeográfica) e **Jacqueline Starling** (análise morfométrica) pela ajuda no trabalho de laboratório; espero que tenham aprendido um pouco sobre filogeografia e morfometria de barbeiros;

Rosane Collevatti, agradeço mais uma vez pelo fundamental apoio durante a aplicação das ferramentas moleculares, incluindo trabalho de bancada e análises estatísticas. Agradeço também aos doutorandos **Natan** e **Lilian**, “companheiros de bancada” na UCB.

Fernando Abad-Franch, obrigado mais uma vez por ter me recebido em Manaus (Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ - AM) e separado parte de seu valioso tempo para discutir o andamento do projeto;

Ao Dr. **Fernando Monteiro** por permitir livre acesso ao Laboratório de Doenças Parasitárias (IOC, FIOCRUZ - RJ) e revisar a versão preliminar desta tese. Agradeço também aos mestrandos **Márcio** e **Sílvia** que me mostraram detalhes do funcionamento do laboratório;

À Dra. **Liléia Diotaiuti** e ao MSc. **Fernando Braga Stehling Dias** por me receberem no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da doença de Chagas (FIOCRUZ - MG) e fornecerem alguns espécimes de *Rhodnius neglectus* para o estudo morfométrico. Liléia, agradeço também pelo incentivo durante o desenvolvimento do projeto;

Ao Dr. **Cléber Galvão** por apresentar as coleções do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (Departamento de Entomologia, FIOCRUZ - RJ) e revisar a introdução desta tese.

Ao amigo Dr. **Alexandre R. T. Palma** (UFPB), pelas constantes discussões científicas e sugestões de artigos para discussão do trabalho;

Ao Dr. **Renato Caparroz** (UCB) pelas dicas valiosas nas análises moleculares;

Ao Dr. **David Gorla** (CRILAR, CONICET, Argentina) pela colaboração no trabalho de distribuição geográfica;

À MSc. **Daniella B. Santana**, MSc. **Daniella de Souza Mendes**, mestranda **Thaís de Castro** e técnica **Lurdinha**, sem vocês o Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores não seria o mesmo;

Aos técnicos dos Laboratórios da UCB, em especial à **Valéria Maria Gomes Barros**, meu braço direito nas atividades de pesquisa realizadas no Laboratório de Zoologia;

Ao Dr. **José Jurberg** (FIOCRUZ - RJ) e Dr. **Raúl Laumann** (Embrapa - DF) por revisar a versão preliminar do artigo “Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* Lent e *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil” publicado na Revista Brasileira de Zoologia em 2007;

Ao Dr. **Ricardo B. Machado** (Conservation International – Brasil) por permitir acesso à base de dados ambientais para as análises usando GARP; agradeço também à MSc. **Karen Schmidt** pelas dicas no uso desta ferramenta e ao doutorando **Gabriel Costa** (University of Oklahoma) pela revisão do texto da distribuição geográfica potencial usando GARP;

Aos Drs. **Chris J. Schofield, Jean-Pierre Dujardin, Michael A. Miles e Silvia Catalá** por revisarem versões preliminares do artigo “*Is Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil” em fase de publicação na revista *Acta Tropica*;

Ao Prof. Dr. **Michael A. Miles**, por ter me recebido na London School of Hygiene and Tropical Medicine, revisado a versão em inglês do artigo acima listado e incentivado a seguir com as pesquisas envolvendo populações de *Rhodnius* do Brasil;

Ao Dr. **José Roberto Pujol-Luz** por permitir o uso do estereoscópio e máquina digital para fotografar as cápsulas cefálicas dos espécimes;

Aos colegas professores do curso de biologia da UCB, pelo apoio dado durante o desenvolvimento do projeto, em especial **Lourdes El-moor Loureiro, Christiano Gati, Simoni Campos, Sarah Caldas, Cássia Munhoz, Luciana de Mendonça**;

A todos dos **técnicos e gerentes do Programa Brasileiro de Controle da Doença de Chagas** que me apoiaram durante o trabalho de campo nos municípios visitados; agradeço também àqueles que forneceram os espécimes problema, para realizar a análise morfométrica e genética;

A **FAP-DF, CNPq, UCB e UnB** pelo apoio financeiro e infra-estrutura durante o desenvolvimeto do projeto.

Finalmente, à **Keila** (esposa) e **Glória** (mãe) por compreender meu afastamento durante as várias viagens de campo e fins de semana “trancado no escritório”.

Muito obrigado!

Rodrigo Gurgel Gonçalves

Sumário

Resumo	11
Abstract	13
Lista de Tabelas	15
Lista de Figuras	17
1. Introdução	
1.1 Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vetores do <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>T. rangeli</i>	27
1.2 Sistemática e biogeografia das espécies do gênero <i>Rhodnius</i>	29
1.3 Distribuição geográfica e ecologia de <i>Rhodnius neglectus</i>	36
1.4 Métodos utilizados no estudo de populações de triatomíneos	
1.4.1 Morfometria.....	37
1.4.2 Modelagem de nicho ecológico e distribuição potencial.....	42
1.4.3 Métodos moleculares e estudos filogeográficos.....	46
1.5 Epidemiologia e controle da doença de Chagas.....	50
2. Objetivos	
2.1 Abordagens e enfoque da pesquisa.....	54
2.2 Objetivos específicos.....	55
3. Material e métodos	
3.1 Áreas de estudo.....	57
3.2 Coleta dos triatomíneos e índices entomológicos analisados.....	58
3.3 Morfometria	
3.3.1 Populações estudadas para a identificação das espécies de <i>Rhodnius</i> do grupo <i>R. prolixus</i>	62
3.3.2 Populações estudadas para a análise intra-específica de <i>Rhodnius neglectus</i>	64
3.3.3 Morfometria geométrica.....	64

	8
3.3.4 Variação de tamanho e forma.....	68
3.3.5 Variáveis ambientais usadas na análise de variação intra-específica de <i>Rhodnius neglectus</i>	68
3.3.6 Análises estatísticas	
3.3.6.1 Identificação as espécies de <i>Rhodnius</i> do grupo <i>R. prolixus</i>	69
3.3.6.2 Variação morfométrica intra-específica de <i>Rhodnius neglectus</i>	70
3.4 Distribuição geográfica potencial	
3.4.1 Obtenção dos registros de ocorrência de <i>Rhodnius neglectus</i> , palmeiras e aves...	71
3.4.2 Modelagem de nicho ecológico.....	72
3.5 Estrutura genética e filogeografia	
3.5.1 Populações estudadas.....	75
3.5.2 Extração, amplificação e seqüenciamento do DNA.....	75
3.5.3 Análise da estrutura genética.....	76
3.5.4 Análise filogeográfica.....	77
3.5.5 Análise filogenética.....	78
4. Resultados	
4.1 Identificação das espécies de <i>Rhodnius</i> que ocorrem em palmeiras e casas no Brasil central	
4.1.1 Variação de tamanho.....	81
4.1.2. Variação de forma e alometria.....	81
4.2 Variabilidade fenotípica de populações de <i>Rhodnius neglectus</i>	
4.2.1 Variação de tamanho.....	88
4.2.2 Variação de forma.....	93
4.2.3 Alometrias.....	94
4.2.5 Variação cromática.....	95

4.3 Infestação de <i>Mauritia flexuosa</i> por <i>Rhodnius neglectus</i> no Brasil central	
4.3.1 Frequência de palmeiras infestadas.....	99
4.3.2 Densidade de insetos por palmeira.....	99
4.3.3 Infecção por tripanossomatídeos.....	99
4.4 Predição da distribuição geográfica de <i>Rhodnius neglectus</i> usando modelagem de nicho ecológico	
4.4.1 Mapas de registros de ocorrência.....	104
4.4.2 Modelagem de nicho ecológico.....	104
4.4.3 Comparação das amplitudes de ocorrência.....	108
4.4.4 Comparação entre a distribuição de <i>Rhodnius neglectus</i> , palmeiras e aves.....	108
4.5 Estrutura genética e filogeografia de populações de <i>Rhodnius neglectus</i> baseadas no polimorfismo de seqüências de citocromo b	
4.5.1 Polimorfismo das seqüências de citocromo b e composição nucleotídica.....	112
4.5.2 Análise da estrutura genética.....	112
4.5.3 Análise filogeográfica.....	117
4.5.4 Análise filogenética.....	125
5. Discussão	
5.1 Identificação das espécies de <i>Rhodnius</i> que ocorrem em palmeiras e casas no Brasil central	
5.1.1 Variação de tamanho.....	130
5.1.2 Variação de forma e alometrias.....	131
5.1.3 Qual espécie de <i>Rhodnius</i> ocorre em casas do Brasil central?.....	133
5.2 Variação de tamanho entre as populações de <i>Rhodnius neglectus</i>	134
5.3 Comparação entre a análise morfométrica (asas/cápsulas cefálicas) e molecular (citocromo b) das populações de <i>Rhodnius</i>	136
5.4 O status taxonômico de <i>Rhodnius neglectus</i>	144

	10
5.5 Infestação de <i>Mauritia flexuosa</i> por <i>Rhodnius neglectus</i> no Brasil central	
5.5.1 Frequência de <i>R. neglectus</i> em <i>M. flexuosa</i>	145
5.5.2 Estrutura etária das populações.....	146
5.5.3 Fatores relacionados à variação da densidade de insetos por palmeira e índices de infecção por tripanossomatídeos.....	147
5.6 Influência de variáveis ambientais na distribuição geográfica de <i>Rhodnius neglectus</i>	149
5.7 Influência de fatores históricos na distribuição geográfica atual de <i>Rhodnius neglectus</i> .	151
5.8 Mecanismos de dispersão de <i>Rhodnius neglectus</i>	152
5.9 Análise filogeográfica de <i>Rhodnius neglectus</i>	153
5. 10 Potencial de <i>Rhodnius neglectus</i> como vetor de <i>Trypanosoma cruzi</i> no Brasil central.	161
6. Considerações finais e perspectivas	164
7. Conclusões gerais	169
8. Glossário	172
9. Referências	178
10. Apêndice	
10.1 Lista de publicações relacionadas ao trabalho de tese (2005-2008).....	207
11. Anexos	
11.1 Autorização do IBAMA para coleta e transporte de triatomíneos.....	211
11.2 Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético N° 032/2006.....	212

Resumo

Triatomíneos silvestres do gênero *Rhodnius* freqüentemente invadem casas na América Latina, mantendo o risco de transmissão da doença de Chagas. Nesta tese, foram feitas análises filogeográficas, morfométricas e de distribuição geográfica potencial de populações de *Rhodnius* no Brasil central, focando *Rhodnius neglectus*, a principal espécie encontrada em palmeiras no Cerrado. Os triatomíneos foram capturados em palmeiras (*Mauritia flexuosa*) de quatro bacias hidrográficas (Tocantins, São Francisco, Paraná e Paraguai) e os índices de infestação e infecção por tripanossomatídeos foram analisados. A morfometria geométrica foi aplicada para identificar quais espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* são encontradas em palmeiras e casas no Brasil central e para analisar a variação morfológica de populações silvestres de *R. neglectus*. A distribuição geográfica potencial de *R. neglectus* foi analisada usando modelagem de nicho ecológico (GARP) baseada na relação entre variáveis ambientais e os registros de ocorrência obtidos durante o estudo. A análise filogeográfica de *R. neglectus* foi baseada no polimorfismo de seqüências de citocromo b do DNA mitocondrial, testando a hipótese de diferenciação entre populações pelo processo de isolamento por distância. A freqüência de palmeiras infestadas variou de 11 a 100% nas 40 áreas amostradas, sendo coletados 1.581 espécimes em 177 palmeiras, principalmente em ninhos de pássaros; 3,8% dos triatomíneos examinados estavam infectados por tripanossomatídeos (*Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli*). As análises morfométricas permitiram uma reclassificação quase perfeita dos indivíduos em suas respectivas espécies. Os padrões de forma não revelaram diferenças consistentes entre a maioria dos espécimes coletados nas casas no Brasil central e *R. neglectus*, mostrando também que *R. robustus* e *R. neglectus* ocorrem simpatricamente ao sul da Amazônia. Esses resultados suportam fortemente a idéia que espécimes de *R. neglectus*, e não de *R. prolixus*, têm invadido as casas no Brasil central. Os métodos de morfometria geométrica aplicados para explorar a variação fenotípica em *R. neglectus* mostraram variação significativa de tamanho de asas e, principalmente, cápsulas cefálicas entre as populações analisadas. A temperatura foi a variável ambiental que mais

influenciou o tamanho, sendo os menores espécimes encontrados nas áreas mais frias. Entretanto, nenhuma variação significativa de forma foi observada entre populações de diferentes bacias hidrográficas. Os modelos de nicho ecológico foram capazes de prever, com alta probabilidade, áreas de ocorrência de *R. neglectus* no bioma Cerrado. Áreas de Caatinga, savanas amazônicas, Pantanal e Chaco boliviano apresentaram menores probabilidades de ocorrência da espécie. Uma grande sobreposição foi observada entre a distribuição de *R. neglectus*, palmeiras e pássaros. Ao incluir novos registros de *R. neglectus*, o presente estudo revelou um aumento da distribuição a oeste e nordeste do Brasil na ‘diagonal de ecorregiões abertas/secas da América do Sul’. O seqüenciamento da porção 5’ do citocromo b em 144 indivíduos de 33 populações resultou em um fragmento de 567pb, revelando a existência de 13 haplótipos únicos e 22 sítios variáveis. Os haplótipos obtidos formaram um grupo monofilético bem suportado, sendo identificados como *R. neglectus* e separados claramente das outras espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*. Os dois haplótipos mais freqüentes ocorreram em áreas separadas por distâncias maiores que 1.700 km e de três bacias hidrográficas. Haplótipos compartilhados foram observados em áreas de ambas as margens dos principais rios e ambos os lados da Serra Geral de Goiás. As populações de Alto Paraíso-GO e da bacia do Paraguai (Mato Grosso) apresentaram haplótipos únicos e altos níveis de diversidade nucleotídica e divergência entre populações. A rede de haplótipos apresentou dois grupos geograficamente distintos (oeste e leste), mas não houve evidência de isolamento por distância (Mantel, $p = 0,446$). A dispersão de espécimes de *R. neglectus* entre no Brasil central poderia ocorrer a partir de um mecanismo passivo de transporte por aves. Finalmente, esses resultados podem auxiliar os programas de vigilância vetorial da doença de Chagas, visto que a invasão das casas por espécimes de *Rhodnius* mantém o risco de transmissão e limita a eficiência das estratégias de controle.

Palavras-chave: *Rhodnius neglectus*; filogeografia; morfometria geométrica; GARP; distribuição geográfica; Cerrado; vigilância entomológica; doença de Chagas; Brasil.

Abstract

Sylvatic triatomines of the genus *Rhodnius* commonly fly into houses in Latin America, maintaining the risk of Chagas disease transmission. In this thesis, phylogeographical, morphological and potential geographical distribution analyses of *Rhodnius* populations in central Brazil were carried out, focusing in *R. neglectus*, the major species found in palm trees in the Brazilian Savannah. Bugs were captured in *Mautitia flexuosa* palm trees from four hydrogeographic basins (Tocantins, São Francisco, Parana and Paraguay); the infestation and trypanosomatid infection indices were analyzed. Geometric morphometric methods were applied to identify the *Rhodnius* species of the *R. prolixus* group and to analyze the morphometric variation among *R. neglectus* populations from these basins. The hypothesis of phenotypic plasticity related to some environment variables was also tested. The potential geographical distribution of *R. neglectus* was analyzed by using ecological niche modeling (GARP) based on the relation of environmental variables and occurrence records. The phylogeographic analyses of *R. neglectus* populations were based on polymorphisms of cytochrome b sequences, testing the hypotheses of differentiation and isolation by distance. The frequency of infested palms varied from 11 to 100% in the 40 sampled areas, and 1,581 specimens were collected in 177 palms, mainly in bird nests; 3.8% of the examined bugs were infected by trypanosomatids (*Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*). Morphometric analyses of shape variation allowed for an almost perfect reclassification of individuals to their putative species. Shape patterning revealed no consistent differences between most specimens collected inside houses in central Brazil and *R. neglectus*, and also showed that *R. robustus* and *R. neglectus* occur sympatrically in southern Amazonia. These results strongly support the idea that *R. neglectus*, and not *R. prolixus*, is the species invading houses in central Brazil. The geometric morphometric methods applied to assess the intraspecific phenotypic variation in *R. neglectus* showed significant size variation among populations. Wing and head size were influenced by temperature: the smallest specimens

were found in the coldest areas. Nevertheless, no significant shape variation was observed among populations of different geographical basins. The ecological niche models were able to predict the occurrence of *R. neglectus* as a characteristic (although not endemic) species of the *Cerrado* biome. Meanwhile, *Caatinga*, Amazonian savannas, *Pantanal*, and the Bolivian *Chaco* appear as areas with lower predicted presence probability for the species. A high overlap was observed among the distributions of *R. neglectus*, some palm trees and birds. By including new records for *R. neglectus*, the present study has revealed a wider distribution towards the west and northeast areas of Brazil in the ‘diagonal of open/dry ecoregions of South America’. The sequencing of 5’- end of the cytochrome b gene in 144 individuals from 33 populations resulted in a fragment of 567bp, revealing the existence of 13 different haplotypes and 22 variable sites. These haplotypes formed a well-supported monophyletic group identified as *R. neglectus* and clearly separated for other *Rhodnius* species of the ‘*R. prolixus* group’. The two more frequent haplotypes occurred in areas separated by a distance over 1,700 km and from three different hydrogeographic basins. Shared haplotypes were also observed in areas from both sides of large rivers and both sides of ‘Serra Geral de Goiás’. The populations from Alto Paraíso-GO and from the Paraguay basin (Mato Grosso) presented unique haplotypes and higher levels of nucleotide diversity and divergence among populations. The haplotype network analysis showed two geographically distinct groups (western and eastern) but there was no evidence of isolation by distance (Mantel, $p = 0,446$). The dispersal of *R. neglectus* specimens among the basins may occur through passive carriage by birds. Finally, these results should help the Chagas disease vector surveillance program, given that household invasion by *Rhodnius* species maintains disease transmission risk and limits the effectiveness of control strategies.

Keywords: *Rhodnius neglectus*; phylogeography; Geometric morphometrics; GARP; Geographical distribution; Cerrado; vector surveillance; Chagas disease; Brazil.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição, ecótopos, fontes alimentares e biomas preferenciais das espécies de <i>Rhodnius</i> do grupo <i>R. prolixus</i> no Brasil.....	33
Tabela 2. Código, coordenadas geográficas, altitude, bacia hidrográfica, microhabitat, temperatura máxima (Tmax.), temperatura mínima (Tmin.) e precipitação (Prec.) das áreas de coleta.....	61
Tabela 3. Origem, habitats, coordenadas geográficas e número de asas e cápsulas cefálicas das populações de <i>Rhodnius</i> sp. usadas nas análises morfométricas.....	63
Tabela 4. Código, bacia hidrográfica e número de asas e cápsulas cefálicas das populações de <i>Rhodnius neglectus</i> analisadas no estudo morfométrico.....	65
Tabela 5. Descrição, origem e grupo das variáveis ambientais usadas na modelagem de nicho ecológico.....	74
Tabela 6. Espécie, código, bacia hidrográfica e número de seqüências das populações de <i>Rhodnius</i> analisadas no estudo filogeográfico e filogenético.....	79
Tabela 7. Porcentagem de reclassificações corretas de asas e cápsulas cefálicas de <i>Rhodnius neglectus</i> , <i>R. prolixus</i> e <i>Rhodnius</i> sp. de Mambaí (Goiás, Brasil) após a análise discriminante com as variáveis de forma.....	86
Tabela 8. Porcentagem de reclassificações corretas de asas e cápsulas cefálicas de <i>Rhodnius neglectus</i> , <i>R. robustus</i> e <i>R. nasutus</i> após a análise discriminante com as variáveis de forma.....	87
Tabela 9. Índices de infestação nas palmeiras e infecção de <i>Rhodnius neglectus</i> por tripanossomatídeos nas bacias e áreas amostradas.....	101
Tabela 10. Parâmetros estatísticos para os dez melhores modelos resultantes da modelagem de nicho ecológico (GARP) usando todas as variáveis e somente as variáveis climáticas.....	106
Tabela 11 Sítios variáveis para o fragmento de 567pb de gene citocromo b observados em 13 haplótipos de <i>Rhodnius neglectus</i>	114

Tabela 12. Estimativas de diversidade genética das populações <i>Rhodnius neglectus</i> de diferentes bacias hidrográficas do Brasil. N=número de indivíduos; H=número de haplótipos; h=diversidade haplotípica; n=número de substituições; π =diversidade nucleotídica; P_i =número médio de diferenças nucleotídicas (modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros).....	115
Tabela 13. Localidades, bacia hidrográfica e frequência dos 13 haplótipos (seqüências do gene citocromo b, 567pb) observados em <i>Rhodnius neglectus</i>	119
Tabela 14. Valores dos testes de neutralidade de Tajima (1989) e Fu (1997) para o fragmento de 567pb do gene citocromo b das populações de <i>Rhodnius neglectus</i>	123
Tabela 15. Divergência (Kimura 2 parâmetros) e tempo estimado de separação de populações de <i>R. neglectus</i> , <i>R. prolixus</i> e <i>R. robustus</i> com base no polimorfismo de seqüências do citocromo b.....	128

Lista de Figuras

Figura 1. Espécies de <i>Rhodnius</i> do grupo <i>R. prolixus</i>	34
Figura 2. Distribuição geográfica conhecida das espécies de <i>Rhodnius</i> do grupo <i>R. prolixus</i> segundo Carcavallo <i>et al.</i> (1999).....	35
Figura 3. Distribuição geográfica das populações estudadas em quatro bacias hidrográficas do Brasil. As linhas azuis claras representam os principais rios. Áreas da bacia do Tocantins/Araguaia (em verde): AE (Estação Ecológica Águas Emendadas-DF), RA (Planaltina-DF), CA (Cabeceiras-GO), AP (Alto Paraíso-GO), TZ (Terezina-GO), MA (Mambai-GO), PO (Posse-GO), ML (Monte Alegre-GO), TG (Taguatinga-TO), PA (Palmas-TO), CO (Colinas do Tocantins-TO) e AR (Araguaína-TO), GO (Cidade de Goiás-GO), MO (Mozarlândia-GO), SM (São Miguel do Araguaia-GO), NP (Novo Planalto-GO), RC (Riberão Cascalheira-MT), NX (Nova Xavantina-MT) e VP (Vila Paredão-MT); Áreas da bacia do Paraná (em azul): IB (Paranoá, DF), AL (Alphaville, Divisa DF/GO), CR (Cristalina-GO), CL (Campo Alegre-GO), IT (Ituiutaba-MG), UB (Uberlândia-MG), BL (Buritizal-SP), QU (Quirinópolis-GO), AO (Aporé-GO), AC (Acreúna-GO); Áreas da bacia do São Francisco (em vermelho): SJ (São José dos Buritis-MG), BO (Buritizeiro-MG), MI (Mirabela-MG), PN (Parque Nacional Cavernas do Peruaçu-MG), SD (São Desidério-BA) e ST (Santa Rita de Cássia-BA). Áreas da bacia do Paraguai: AG (Alto Garça-MT), PL (Primavera do Leste-MT), NS (Nossa Senhora do Livramento-MT), DI (Diamantino-MT) e PE (Porto Esperidião-MT).....	60
Figura 4. Asa direita de <i>Rhodnius neglectus</i> com sete marcos anatômicos usados nas análises morfométricas. De acordo com Bookstein (1991), o ponto 4 corresponde a um marco anatômico do tipo II (ponto de máxima curvatura) e os restantes são do tipo I (intersecção das veias).....	66

- Figura 5.** Cápsula cefálica de *Rhodnius prolixus* ilustrando os oito marcos anatômicos usados nas análises morfométricas. De acordo com Bookstein (1991), os pontos 1, 2, 5 e 6 são marcos anatômicos do tipo I (justaposição de tecidos) e os pontos 3, 4, 7 e 8 são marcos anatômicos do tipo II (pontos de máxima curvatura)..... 67
- Figura 6.** Variação do tamanho do centróide de asas e cápsulas cefálicas entre sexos e populações de *Rhodnius*. Os diagramas de caixas mostram a média, o erro padrão e o desvio padrão para cada população. Legenda: Rna (*R. nasutus* Ceará), RneSP (*R. neglectus* São Paulo), RneTO (*R. neglectus* Tocantins), Rp (*R. prolixus*) e Rr (*R. robustus*). Letras acima de cada diagrama de caixa indicam populações estatisticamente diferentes usando o teste de Tukey ($p < 0,01$). 83
- Figura 7.** Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma (CV1 e CV2) de asas e cápsulas cefálicas, mostrando a distribuição dos espécimes das populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. Os polígonos correspondem aos grupos analisados no modelo discriminante. Os símbolos representam a origem dos espécimes de *Rhodnius* capturados nas casas. A porcentagem de contribuição de cada fator discriminante está entre parênteses. As figuras ao lado dos mapas fatoriais representam a configuração consenso das asas e cápsulas cefálicas de *R. prolixus* e *R. neglectus*. As setas indicam as modificações de forma..... 84
- Figura 8.** Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma (CV1 e CV2) de asas e cápsulas cefálicas, mostrando a distribuição dos espécimes das populações de *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus* e *R. robustus*. Os polígonos correspondem aos grupos analisados no modelo discriminante. Os símbolos representam a origem dos espécimes de *Rhodnius* capturados nas casas. A porcentagem de contribuição de cada fator discriminante está entre parênteses. As figuras ao lado dos mapas fatoriais representam a configuração consenso das asas e cápsulas cefálicas de *R. robustus* e *R. neglectus*. As setas indicam as modificações de forma..... 85

- Figura 9.** Variação do tamanho do centróide de cápsulas cefálicas e asas entre populações de *Rhodnius neglectus*. Os círculos abertos representam a média e as linhas os intervalos de confiança (95%) para cada uma das populações, organizadas em um gradiente de temperatura (de acordo com os valores de temperatura máxima, ver Tabela 2). Legenda: NS (Nossa Senhora do Livramento-MT), ST (Santa Rita de Cássia-BA), NX (Nova Xavantina-MT), DI (Diamantino-MT), RC (Ribeirão Cascalheira-MT), MZ (Mozarlândia-GO), IT (Ituiutaba-MG), TG (Taguatinga-TO), SD (São Desidério-BA), AR (Araguaína-TO), BO (Buritizeiro-MG), QU (Quirinópolis-GO), PN (Parque Nacional Cavernas do Peruaçu), MI (Mirabela-MG), MA (Mambaí-GO), GO (Cidade de Goiás-GO), CL (campo Alegre-GO), UB (Uberlândia-MG), CR (Cristalina-GO), CA (Cabeceiras-GO), RA (Rajadinha, Planaltina-DF), BL (Buritizal-SP) e AP (Alto Paraíso-GO). Populações marcadas com letras diferentes foram estatisticamente diferentes usando teste de Tukey ($p < 0,01$)..... 89
- Figura 10.** Variação do tamanho de asas e cápsulas cefálicas entre duas populações de *Rhodnius neglectus*. A. São Desidério-BA. B. Cabeceiras-GO..... 90
- Figura 11.** Relações entre o tamanho do centróide de cápsulas cefálicas de machos e fêmeas de *Rhodnius neglectus* e temperatura máxima nas áreas de coleta. Fêmeas: $y = 0,068x + 0,36$; $R^2 = 0,147$; $n = 352$; $p < 0,01$. Machos: $y = 0,068x + 0,33$; $R^2 = 0,146$; $n = 322$; $p < 0,01$ 91
- Figura 12.** Variação do tamanho de asas de espécimes de *Rhodnius neglectus* de acordo com a densidade de triatomíneos por palmeira. Os pontos representam os valores médios para cada categoria de densidade e as linhas o intervalo de confiança (95%)..... 92
- Figura 13.** Mapas fatoriais mostrando a variação de forma de cápsulas cefálicas e asas de populações de *Rhodnius neglectus* de diferentes bacias hidrográficas. Para cada mapa, os eixos representam os componentes principais 1 e 2 derivados da análise multivariada das deformações parciais. Os polígonos correspondem às diferentes populações estudadas: São Francisco (linha preta contínua), Paraguai (linha preta pontilhada), Paraná (linha cinza contínua) e Tocantins (linha cinza pontilhada). A forma esperada para cápsula cefálica e asa

associada a valores mínimos (negativos) e máximos (positivos) de PC1 e PC2 está representada abaixo e ao lado de cada mapa fatorial..... 95

Figura 14. Análise de variância dos componentes principais 1 e 2 que sumarizam a variação de forma de cápsulas cefálicas de *Rhodnius neglectus*. PC 1 (acima) explicou 52,9% e PC 2 (abaixo) 15,4% da variação de forma da cápsula cefálica. Os pontos representam a média e as linhas os intervalos de confiança (95%) para cada população. A forma esperada para cápsula cefálica associada a valores mínimos (negativos) e máximos (positivos) de PC1 e PC2 está representada ao lado do gráfico. PC1 está relacionado com o alongamento da região anteocular; valores negativos estão associados a cápsulas cefálicas mais curtas e largas e valores positivos a cápsulas cefálicas mais longas e estreitas. PC2 está relacionado com o alongamento da região pós-ocular; valores negativos estão relacionados a uma região pós-ocular mais curta e valores positivos a uma região pós-ocular mais longa. Códigos das populações conforme a Figura 9..... 96

Figura 15. Análise de variância dos componentes principais 1 e 2 que sumarizam a variação de forma de asas de *Rhodnius neglectus*. PC1 (acima) explicou 25,6% e PC2 (abaixo) 19,5% da variação de forma da asa. Os pontos representam a média e as linhas os intervalos de confiança (95%) para cada população. A forma esperada para asa associada a valores mínimos (negativos) e máximos (positivos) de PC1 e PC2 está representada ao lado do gráfico. PC1 está relacionado com a posição relativa dos pontos 2 e 3 (ver Figura 4 com marcadores anatômicos), ou seja, a veia de ligação das veias cubital e média; valores negativos estão associados às asas com veias de ligação mais curtas e valores positivos a asas com veias de ligação mais longas. PC2 está relacionado com a posição relativa do ponto 5 (ver Figura 4), o encontro da veia radial com a sub-costa; nas asas com valores negativos o encontro ocorre numa região mais posterior da asa e nas asas com valores positivos esse encontro ocorre mais anteriormente. Códigos das populações conforme Figura 9..... 97

- Figura 16.** Variação cromática na região dorsal e ventral em *Rhodnius neglectus*. A) Rajadinha-DF; B) Aporé-GO e C) Araguaína-TO. Notar mancha ventral longitudinal clara no espécime A em comparação com o espécime B; notar patas com coloração uniforme no espécime C em comparação aos espécimes A e B, que apresentam coxas, trocânteres e articulação fêmur/tíbia mais claros..... 98
- Figura 17.** Número de espécimes de *Rhodnius neglectus* (logaritmo) coletados em diferentes microhabitats na copa da palmeira *Mauritia flexuosa* nas áreas de estudo..... 103
- Figura 18.** Distribuição dos registros de ocorrência de *Rhodnius neglectus* no Brasil. A área em cinza representa os limites do bioma Cerrado. Os quadrados pretos são registros de *R. neglectus* em palmeiras (*Mauritia flexuosa*) usados na modelagem de nicho ecológico. Os círculos vazios são registros de *R. neglectus* em ambiente domiciliar obtidos pelo Programa de Controle da Doença de Chagas. Os quadrados brancos são registros de *R. neglectus* em ambiente silvestre obtidos na literatura..... 105
- Figura 19.** Distribuição geográfica potencial predita de *Rhodnius neglectus* na América do Sul e estados brasileiros usando modelagem de nicho ecológico (GARP). A escala colorida ao lado do mapa representa distribuição predita considerando um (azul) a dez modelos (vermelho escuro). As áreas em branco representam a ausência predita pelos modelos e os círculos abertos os registros de ocorrência usados na modelagem..... 107
- Figura 20.** Amplitude de distribuição de *Rhodnius neglectus* adaptada de Carcavallo *et al.* (1999) (A), em ambiente domiciliar e silvestre (B) e baseada na distribuição potencial usando GARP (C). A área em cinza representa os limites do bioma Cerrado..... 109
- Figura 21.** Sobreposição entre os registros de ocorrência de *Rhodnius neglectus* (pontos pretos) e as amplitudes de distribuição das espécies de palmeiras já descritas como hábitat da espécie. Linha verde: *Mauritia flexuosa*; Linha azul pontilhada: *Attalea speciosa*; Linha vermelha: *Syagrus oleracea*; Linha preta pontilhada: *Acrocomia aculeata*..... 110

Figura 22. Sobreposição entre os registros de ocorrência de *Rhodnius neglectus* (pontos pretos) e as amplitudes de distribuição das espécies de aves já descritas como fontes alimentares da espécie. Linha azul: *Phacellodomus ruber*; Linha vermelha: *Pseudoseisura cristata*. 111

Figura 23. Relações genéticas entre as populações amostradas inferidas a partir da análise hierárquica da diversidade nucleotídica. Os valores significativos de G_{st} são apresentados antes de cada nó do dendrograma e representam a proporção da diversidade genética total explicada pelo agrupamento..... 116

Figura 24. Rede de haplótipos (Median-joining) mostrando as relações entre os haplótipos de citocromo b (567pb) de *Rhodnius neglectus*. Os haplótipos são representados por círculos (o tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos em cada haplótipo). As linhas conectando os círculos mostram a relação entre os haplótipos e as mutações até o aparecimento do próximo haplótipo (e.g. CH13 entre os haplótipos Rne1 e Rne4). As cores representam a origem dos indivíduos de *R. neglectus* de acordo com as bacias hidrográficas: Amarelo: São Francisco, Verde: Tocantins, Azul: Paraná, Vermelho: Paraguai. O ponto preto mostra um haplótipo intermediário (median vector) que pode ser um haplótipo ancestral extinto ou não amostrado no estudo (Forster *et al.* 2000)..... 120

Figura 25. Distribuição geográfica dos 13 haplótipos (seqüências do gene citocromo b, 567pb) observados em *Rhodnius neglectus* em quatro bacias hidrográficas do Brasil. As linhas azuis claras representam os principais rios. As siglas das áreas estão descritas na Figura 3. As linhas representam os agrupamentos de haplótipos do “Oeste” (linha rosa), do “Leste” (linha bege) e do “Sul” (linha azul). Os quadrados de diferentes cores representam os haplótipos: Rne1 (preto), Rne2 (amarelo), Rne3 (verde), Rne4 (azul), Rne5 (branco), Rne6 (vermelho), Rne7 (bege), Rne8 (laranja), Rne9 (rosa), Rne10 (roxo), Rne11 (azul claro), Rne12 (marrom) e Rne13 (rosa choque). As setas indicam potenciais barreiras geográficas para populações próximas: seta 1 (Serra Geral de Goias), seta 2 (rio São

Francisco), seta 3 (rio Grande), seta 4 (rio Araguaia) e seta 5 (rio São Lourenço)..... 121

Figura 26. Rede de haplótipos (Median-joining) mostrando as relações entre os haplótipos de citocromo b (567pb) de *Rhodnius neglectus*. Os haplótipos são representados por círculos (o tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos em cada haplótipo). As linhas conectando os círculos mostram a relação entre os haplótipos e as mutações até o aparecimento do próximo haplótipo (e.g. CH13 entre os haplótipos Rne1 e Rne4). As cores representam a origem dos indivíduos de *R. neglectus* de acordo com a estrutura sugerida pela análise hierárquica da diversidade nucleotídica usando o programa Nucleodiv (ver Figura 23). Azul: populações da Serra Geral, Minas Gerais e Sul de Goiás; Verde: populações do norte de Tocantins; Amarelo: população de Alto Paraíso (Chapada dos Veadeiros) e Vermelho: populações do Mato Grosso e oeste de Goiás. O ponto preto mostra um haplótipo intermediário (median vector) que pode ser um haplótipo ancestral extinto ou não amostrado no estudo (Forster *et al.* 2000)..... 122

Figura 27. Frequência relativa do número de diferenças par a par resultante do teste de ‘mismatch distribution’ dos haplótipos de *R. neglectus* (linha pontilhada). A linha contínua mostra a distribuição esperada em populações estáveis, ou seja, com tamanho populacional constante (Rogers & Harpending 1992)..... 124

Figura 28. Árvore filogenética (Neighbour-joining) baseada no modelo de distância genética Kimura 2 parâmetros de seqüências do citocromo b (567pb) das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) e *R. pictipes* (grupo externo). Os números indicam o suporte estatístico a partir de 1000 pseudoréplicas..... 126

Figura 29. Cladograma de consenso proveniente da análise de parcimônia de seqüências do citocromo b (567pb) das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) e *R. pictipes* (grupo externo). Comprimento = 114, CI = 0,56. Os números indicam o suporte estatístico a partir de 1000 pseudoréplicas..... 127

Figura 30. Mapa fatorial mostrando a variação de forma de asas de espécimes de *Rhodnius neglectus* com diferentes haplótipos do gene citocromo b (mt DNA). Os eixos representam as variáveis canônicas CV1 e CV2 derivadas da análise discriminante das variáveis de forma (deformações parciais e componentes uniformes). A distribuição geográfica dos haplótipos e respectivas populações estão apresentadas na Tabela 13..... 139

Figura 31. Dendrogramas UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) derivados das distâncias de Mahalanobis calculadas a partir das variáveis de forma resultantes da morfometria geométrica de cápsulas cefálicas (acima) e asas (abaixo) das populações de *R. neglectus* (Alto Paraíso-GO, Buritizal-SP, Taguatinga-TO, Diamantino-MT e Nossa Senhora do Livramento-MT) e outras espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*: *R. robustus* [Marabá-PA, linhagem III segundo mapa biogeográfico de Abad-Franch & Monteiro (2007)], *R. prolixus* (Colômbia) e *R. nasutus* (Sobral-CE)..... 142

Figura 32. Dendrograma UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) baseado no modelo de distância genética Kimura 2 parâmetros de seqüências do citocromo b (567pb) das populações e espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*: *R. neglectus* (Alto Paraíso-GO, Buritizal-SP, Taguatinga-TO, Diamantino-MT e Nossa Senhora do Livramento-MT), *R. robustus* [linhagens I, II, III e IV segundo Abad-Franch & Monteiro (2007)], *R. prolixus* (Colômbia) e *R. nasutus* (Sobral-CE)..... 143

Figura 33. Hipótese de origem das linhagens de *Rhodnius* de ecorregiões semi-áridas na América do Sul a partir da genealogia baseada no citocromo b e tempos de divergência. A linhagem de *R. neglectus* (Cerrado, Brasil central) compartilha um ancestral comum mais recente com a linhagem *R. prolixus/R. robustus* I, ao norte da Amazônia (Llanos Venezuelanos/Colombianos); o tempo estimado de separação entre *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus* I foi entre 2,6 e 3,8 milhões de anos atrás (Maa) no Plioceno. Durante o final do Terciário, movimentos de placas tectônicas e mudanças no nível do mar resultaram em

um alargamento extensivo da América do Sul, principalmente nas planícies amazônicas (Frailey *et al.* 1988). Segundo esse cenário, populações ancestrais de *Rhodnius neglectus* no escudo brasileiro podem ter ficado isoladas das populações do escudo guianense (ancestrais de *R. prolixus/R. robustus* I). No escudo brasileiro, os ancestrais de *R. neglectus* devem ter evoluído em espécies de palmeiras de áreas secas no Cerrado (*Acrocomia aculeata*, *Syagrus oleracea*), colonizando também *M. flexuosa* em áreas úmidas (veredas). No escudo guianense, as linhagens de *Rhodnius* evoluíram em palmeiras de ecorregiões semi-áridas nos Llanos (e.g. *Acrocomia aculeata*, *Copernicia tectorum*)..... 159

Figura 34. Hipótese de diversificação das populações de *Rhodnius* do Brasil central a partir da genealogia baseada no citocromo b. A alta diversidade nucleotídica observada nos haplótipos das populações do Mato Grosso e Alto Paraíso (norte de Goiás), principalmente no Rne 9, sugere que esse seja o haplótipo ancestral de *R. neglectus*, que foi observado nas populações do oeste (O, círculo pontilhado) e leste (L, círculo contínuo). Essas populações podem ter tido contato secundário com as linhagens de *Rhodnius* de savanas amazônicas e dos Llanos venezuelanos via corredores transamazônicos secos contínuos no Pleistoceno, principalmente no norte do Mato Grosso e de Tocantins. A área contínua cinza indica o corredor seco transamazônico; os círculos presentes no corredor indicam a localização aproximada de savanas amazônicas de acordo Sombroek (2001). As setas contínuas finas indicam as áreas onde *R. neglectus* é encontrada atualmente no Brasil..... 160

1. Introdução

1.1 Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vetores do

Trypanosoma cruzi e *T. rangeli*

A Tripanossomíase Americana é uma zoonose **endêmica**¹ do continente americano tendo como agente etiológico o parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), que é transmitido pelas fezes de insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). Cerca de 200 espécies de mamíferos (Barretto 1979) são susceptíveis à infecção pelo parasito. Gambás, roedores, tatus e cães são conhecidos reservatórios em ambientes silvestres e domésticos (Yeo *et al.* 2005). Outro tripanossomatídeo que infecta humanos (porém sem ação patogênica comprovada), mamíferos e triatomíneos silvestres em algumas regiões da América Central e do Sul, incluindo o Brasil é o *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* (Tejera 1920). A comprovada co-existência de *T. rangeli* com *T. cruzi* nos mesmos hospedeiros vertebrados e invertebrados em uma extensa região geográfica e as semelhanças morfológicas entre esses parasitos apresentam importantes implicações epidemiológicas, principalmente no que diz respeito ao diagnóstico específico da doença de Chagas (Cuba Cuba 1998).

A subfamília Triatominae compreende atualmente 141 espécies, classificadas em seis tribos e 18 gêneros (Lent & Wygodzinky 1979, Galvão *et al.* 2003, Poinar Jr. 2005, Jurberg & Galvão 2006, Galvão & Angulo 2006, Costa *et al.* 2006, Berenguer & Blanchet 2007, Costa & Felix 2007, Sandoval *et al.* 2007, Martinez *et al.* 2007). A maioria dessas espécies é predominantemente silvestre, apresentando pouca relevância epidemiológica no contexto da doença de Chagas. Entre as espécies consideradas vetores importantes devido à capacidade de invadir e/ou colonizar o ambiente domiciliar e transmitir *T. cruzi* ao homem estão: *Triatoma infestans* (Klug 1834), *Rhodnius prolixus* (Stål 1859), *Panstrongylus megistus* (Burmeister 1835), *T. dimidiata* (Latreille 1811) e *T. brasiliensis* (Neiva 1911).

¹ Palavras destacadas no texto em negrito fazem parte do Glossário (página 172).

Os triatomíneos são encontrados principalmente na região Neotropical, apesar de algumas espécies serem encontradas na Índia, China, Malásia, Indonésia e Austrália (Poinar Jr. 2005, Patterson 2007). Gaunt & Miles (2002) estimaram a divergência entre as duas principais tribos de triatomíneos (Rhodniini e Triatomini) entre 99,7 e 93,6 milhões de anos (Cretáceo) coincidindo com a formação da América do Sul após a fragmentação de Gondwana e com o aparecimento dos primeiros fósseis de palmeiras. Alguns autores sugerem que os triatomíneos evoluíram de reduvídeos predadores de ninhos (Schofield 2000, Schaefer 2003). Porém, não há consenso se a adaptação à hematofagia ocorreu uma vez e todas as espécies compartilham um ancestral comum (Lent & Wygodzinsky 1979, Gaunt & Miles 2000, Hypša *et al.* 2002) ou originaram de diferentes linhagens de predadores resultando em um **grupo polifilético** (Dujardin *et al.* 1999, Lyman *et al.* 1999, Marcilla *et al.* 2001, Bargues *et al.* 2000, Paula *et al.* 2005). No último caso, é argumentado que o monofiletismo do grupo seria inconsistente com os padrões de distribuição e especialização das espécies de triatomíneos e com a análise filogenética, que claramente separa duas tribos: Rhodniini e Triatomini (Monteiro *et al.* 2000, Bargues 2000). Essa divisão também é suportada por padrões morfológicos de antenas (Catalá 1997), variação de proteínas salivares (Soares *et al.* 2000), arquitetura de ovos (Barata 1998) e isoenzimas (Dujardin *et al.* 1999a). Do ponto de vista polifilético, as características compartilhadas seriam resultado de convergência durante a passagem da vida predatória para a hematofágica (Schofield 2000).

Os triatomíneos são classificados pela morfologia (e.g. local de inserção das antenas, tamanho dos olhos, proporções de tamanho de segmentos de antenas e rostro, região anteocular e pós-ocular da cápsula cefálica) e características cromáticas do exoesqueleto (pigmentação e cor das patas, pronoto e conexivo) que definem as tribos, gêneros e espécies (Lent & Wygodzinsky 1979). Apesar dessa abordagem permitir a identificação da maioria das espécies, variações cromáticas intra-específicas são observadas, como em *T. infestans* (Noireau *et al.* 1997). Outras espécies são muito similares, como *R. prolixus* e *R. robustus*, dificultando a identificação

específica (Monteiro *et al.* 2003). Em alguns casos, a estrutura da genitália é aplicável para identificação das espécies. A genitália masculina já foi empregada para caracterizar e separar espécies similares; porém, nem sempre é eficiente, como, por exemplo, para separar *R. neglectus* e *R. nasutus* (Lent & Wygodzinsky 1979, Harry 1993).

Nesse sentido, novas ferramentas morfométricas e moleculares têm sido usadas para a classificação dos triatomíneos e resolução de problemas taxonômicos (Abad-Franch & Monteiro 2005). É importante ressaltar que a correta identificação das espécies é fundamental para a vigilância entomológica da doença de Chagas e tem importância operacional nas atividades de controle e/ou erradicação de espécies domiciliadas e de silvestres que apresentam tendências de domiciliação.

1.2 Sistemática e biogeografia das espécies de *Rhodnius*

O gênero *Rhodnius* (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae, Triatominae, Rhodniini) é composto atualmente por 16 espécies (Lent & Wygodzinsky 1979, Barretto 1979, Galvão *et al.* 2003). A maioria dessas espécies encontra-se em habitats arbóreos, vivendo na copa de palmeiras, cavidades em árvores e bromélias epífitas, podendo alimentar-se em grande variedade de animais, incluindo pássaros, marsupiais, roedores, répteis e anfíbios (Carcavallo *et al.* 1997). O gênero é amplamente distribuído em 28 províncias biogeográficas na América de Sul e Central (Abad-Franch & Monteiro 2007) e inclui espécies sinantrópicas com marcada tendência à domiciliação, sendo importantes vetores da doença de Chagas, como *R. prolixus* na Venezuela e Colômbia, *R. pallescens* no Panamá e *R. ecuadoriensis* no Ecuador e, provavelmente, norte do Peru (Dujardin *et al.* 2002, Cuba Cuba *et al.* 2007).

No Brasil, algumas espécies de *Rhodnius* apresentam capacidade de invadir domicílios, como *R. neglectus* na região Centro-Oeste (Garcia-Zapata *et al.* 1985, Oliveira & Silva 2007), *R. nasutus* na região nordeste (Bento *et al.* 1992, Sarquis *et al.* 2004, 2006) e *R. robustus* na região

norte (Miles *et al.* 1983, Naiff *et al.* 1998). Espécimes adultos dessas espécies, infectados por *T. cruzi*, têm sido registrados no intradomicílio e, portanto, possuem potencial vetorial.

Estudos sobre a **filogenia** de Rhodniini sugerem que a tribo representa um **grupo monofilético** com origem na bacia Amazônica. Evidências morfométricas e isoenzimáticas de espécies do gênero *Rhodnius* revelaram agrupamentos consistentes, mostrando uma forte estrutura geográfica separando espécies a oeste e leste dos Andes (Dujardin *et al.* 1999a, Chávez *et al.* 1999, Schofield & Dujardin 1999, Monteiro *et al.* 2000).

Em revisão recente, Abad-Franch & Monteiro (2007) suportam a existência de dois grupos monofiléticos na tribo Rhodniini: as linhagens *pictipes* e *robustus*. A primeira, dando origem a um grupo de espécies trans-andino (grupo *R. pallescens*) e outro amazônico (grupo *R. pictipes*); a segunda, diversificando-se na Amazônia (grupo *R. robustus*) e sofrendo uma radiação para ecorregiões vizinhas (Orinoco, Cerrado-Caatinga-Chaco e Mata Atlântica). Segundo esses autores, várias evidências sugerem a origem das espécies de *Rhodnius* na bacia Amazônica: i) apenas três das espécies conhecidas são totalmente trans-andinas (*R. ecuadoriensis*, *R. pallescens* e *R. colombiensis*); ii) onze espécies foram registradas na Amazônia (incluindo os rios das bacias do Tocantins/Araguaia e Orinoco) e iii) as palmeiras (ecótopos principais das espécies de *Rhodnius*) evoluíram primeiro em florestas tropicais úmidas de Gondwana durante o Cretáceo e ocuparam áreas secas posteriormente (Cox & Moore 2000). Adicionalmente, a estimativa de divergência entre as duas linhagens mais distantes filogeneticamente (*R. pictipes* e *R. robustus*) excede 20% sugerindo que o ancestral comum dessas espécies viveu entre 10 e 12 milhões de anos atrás (Maa), quando as florestas úmidas alagadas (similares à várzea) prevaleciam na Amazônia.

Genealogias baseadas em citocromo b sugerem que *R. pictipes* e *R. pallescens-colombiensis* compartilharam um ancestral comum que viveu no Mioceno (~6 Maa, antes que os Andes alcançassem 4.000 m de altitude (Cox & Moore 2000, Abad-Franch *et al.* 2003). A diversificação das linhagens de *Rhodnius* na Amazônia provavelmente ocorreu em sincronia com

mudanças hidrográficas e flutuações climáticas no Plioceno e Pleistoceno (Rossetti *et al.* 2005, Haffer 1969). Algumas linhagens de *Rhodnius* podem ter dispersado para ecorregiões áridas ou semi-áridas, particularmente os Llanos Venezuelanos-Colombianos (*R. prolixus*/*R. robustus* I ao norte) e Cerrado/Caatinga (*R. neglectus*/*R. nasutus* ao sul), estabelecendo associações ecológicas com espécies de palmeiras de áreas secas. Outras linhagens (e.g. *R. domesticus*, restrita à Floresta Atlântica) ficaram isoladas das linhagens amazônicas (e.g. *R. robustus*) quando os corredores de floresta úmida que ligavam essas regiões desapareceram (Abad-Franch & Monteiro 2007).

A distribuição geográfica de algumas espécies de *Rhodnius* não é precisa devido à dificuldade de identificação morfológica, particularmente das espécies *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus* (Barrett 1991) (Tabela 1, Figuras 1 e 2). Monteiro *et al.* (2000) sugeriram que os caracteres morfológicos usados tradicionalmente na identificação dessas espécies não são totalmente confiáveis e indicaram a necessidade de outras ferramentas de identificação. Os erros de identificação podem dificultar o estabelecimento dos limites de distribuição geográfica dessas espécies, prejudicando as estratégias de controle vetorial.

Rhodnius neglectus e *R. nasutus* estão mais adaptadas à vegetação aberta, com estações secas longas, como os **biomas** Cerrado e Caatinga; *R. neglectus* ocorre mais freqüentemente em áreas de Cerrado, no Brasil central, e *R. nasutus* ocupa áreas da Caatinga no nordeste do Brasil. *R. prolixus* ocorre ao norte da Amazônia nos Llanos Venezuelanos e América Central; as linhagens de *R. robustus* estão mais adaptadas à florestas tropicais úmidas, com maior precipitação, como a Amazônia (Lent & Wygodzinsky 1979, Abad-Franch & Monteiro 2007). A distinção entre *R. neglectus* e *R. nasutus* e entre ambos e as outras espécies do complexo, baseada em morfologia (Harry 1994, Dujardin *et al.* 1999a) é mais fácil que a separação entre *R. prolixus* e *R. robustus*, que pode ser muito problemática (Harry 1993, Monteiro *et al.* 2003).

Atualmente a relação entre populações de *R. prolixus* e *R. robustus* é mais conhecida do que entre populações de outras espécies do grupo *R. prolixus*. Um estudo filogeográfico baseado

no polimorfismo de seqüências do citocromo b dessas duas espécies mostrou 21 **haplótipos** em 26 populações de 7 países e indicou que *R. prolixus* e *R. robustus* são espécies muito similares, porém claramente separadas geneticamente (Monteiro *et al.* 2003). O estudo mostrou que as populações de *R. prolixus* são muito homogêneas, com apenas três haplótipos, quando comparadas com as populações altamente heterogêneas de *R. robustus*, com vários haplótipos e estruturação filogeográfica, sugerindo a existência de um complexo *R. robustus*. As árvores filogenéticas consistiram de cinco clados, um composto por *R. prolixus* e 4 clados de *R. robustus*, o clado I representativo da Venezuela e os clados II a IV da Amazônia. A análise mostrou ainda que o clado I foi mais próximo de *R. prolixus* que os outros clados de *R. robustus*, sugerindo parafiletismo em *R. robustus* e mostrando que há a necessidade de reavaliar a situação taxonômica dessa espécie.

Tabela 1. Distribuição, ecótopos, fontes alimentares e biomas preferenciais das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* no Brasil.

Espécie	Distribuição	Ecótopos	Fontes alimentares	Bioma
<i>Rhodnius neglectus</i>	GO, DF, MT, MS, MG, SP, TO, BA, PR, MA, PI, PE	Palmeiras: <i>Attalea</i> , <i>Mauritia</i> , <i>Acrocomia</i> , <i>Syagrus</i>	Aves, principalmente furnarídeos, marsupiais, roedores, morcegos. Galinhas em ambiente doméstico	Cerrado
<i>Rhodnius nasutus</i>	CE, PI, RN, PB, MA	Palmeiras: <i>Copernicia prunifera</i>	Roedores, marsupiais. Galinhas em ambiente doméstico	Caatinga
<i>Rhodnius prolixus</i> ^a	AM	Palmeiras: <i>Attalea</i> , <i>Mauritia</i> , <i>Acrocomia</i> , <i>Cocos</i> , <i>Leopoldina</i> , bromélias, pteridófitas, ninhos de aves e mamíferos	Furnarídeos, carcarás, marsupiais, tamanduás, roedores, tatus, lagartos. Pombos e galinhas em ambiente doméstico.	Amazônia
<i>Rhodnius robustus</i>	AM, PA, MA, TO	Palmeiras: <i>Attalea</i> , <i>Acrocomia</i> , <i>Mauritia</i> ; Bromélias (<i>Aechmea</i>)	Roedores, marsupiais, morcegos e aves.	Amazônia

^aA ocorrência dessa espécie é questionada ao sul da Amazônia (Dujardin *et al.* 1991, Abad-Franch & Monteiro 2007). Fontes: Carcavallo *et al.* (1997, 1999), Gurgel-Gonçalves *et al.* (2004).

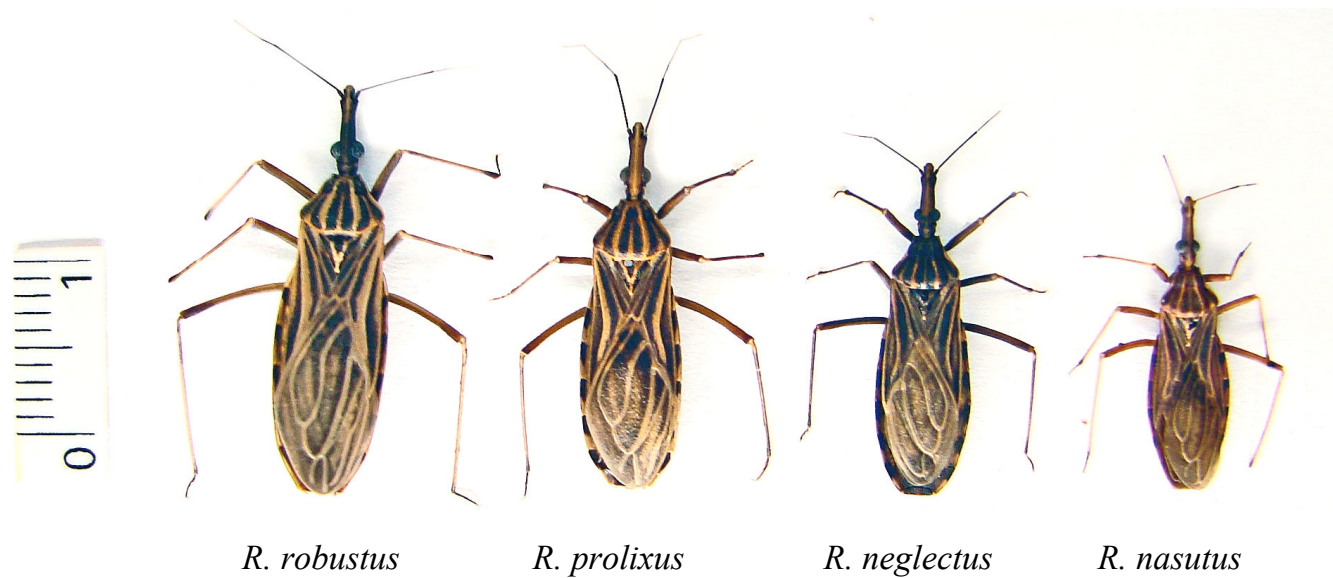


Figura 1. Espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*.

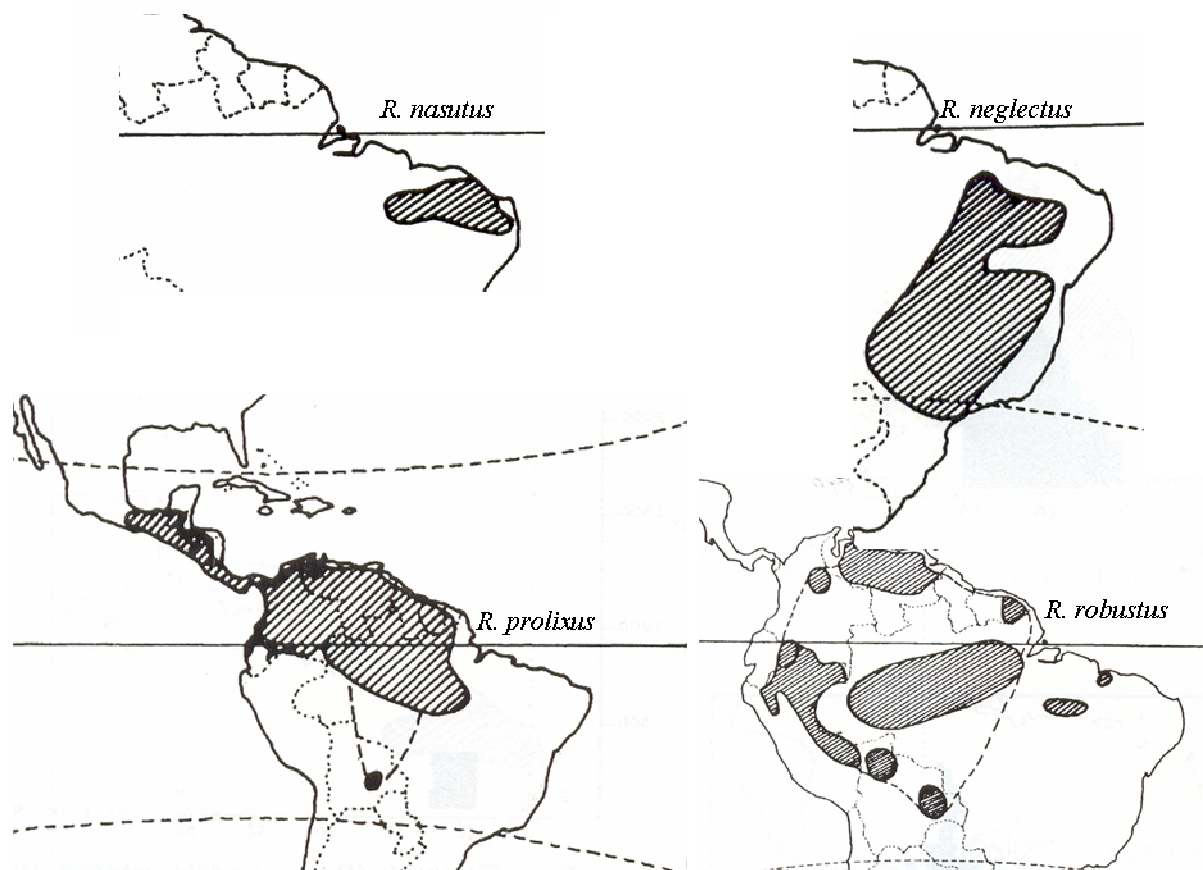


Figura 2. Distribuição geográfica conhecida das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* segundo Carcavallo *et al.* (1999).

1.3 Distribuição geográfica e ecologia de *Rhodnius neglectus*

A primeira referência de *R. neglectus* em ambiente silvestre deve-se a Lent (1954), que descreveu a espécie a partir de exemplares coletados em palmeiras do gênero *Attalea* em Minas Gerais. Posteriormente, vários trabalhos indicaram a presença da espécie em palmeiras no Brasil (Barretto *et al.* 1969, Diotaiuti & Dias 1984, Gurgel-Gonçalves *et al.* 2003, 2004).

Entre as espécies do gênero *Rhodnius*, *R. neglectus* é a que possui maior distribuição geográfica no Brasil, ocorrendo no Distrito Federal e 11 estados (GO, MS, MT, BA, PI, PE, MA, TO, MG, PR, SP), sendo uma espécie característica do bioma Cerrado. *R. neglectus* ocorre freqüentemente em palmeiras de diferentes gêneros (Tabela 1), mas pode ser encontrada em ninhos de pássaros da família Furnariidae (*Phacellodomus*) e refúgios de mamíferos como *Didelphis* (Carcavallo *et al.* 1997). Adicionalmente, não há registros de ocorrência de *R. neglectus* fora do Brasil.

A distribuição geográfica conhecida de *R. neglectus* (Figura 2) baseia-se na ocorrência domiciliar da espécie baseada somente em registros do Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas, Ministério da Saúde. Essa distribuição pode apresentar problemas devido a possíveis erros de identificação de *R. neglectus*, pertencente ao grupo *R. prolixus*, que inclui espécies similares como *R. nasutus*, *R. prolixus* e *R. robustus*. O esclarecimento da distribuição dessas espécies é de grande importância epidemiológica, visto que apresentam diferentes graus de adaptação ao ambiente domiciliar: *R. prolixus* é o principal vetor da doença de Chagas na América Central, Venezuela e Colômbia e tem sido alvo das campanhas de controle (Guhl 2007); em contraste, *R. neglectus* tem sido classificada como uma espécie de importância secundária na transmissão do *T. cruzi* no Brasil (Dujardin *et al.* 2002) devido ao fato de ser predominantemente silvestre, ocorrendo em palmeiras no Brasil central (Diotaiuti & Dias 1984, Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004) e, eventualmente, colonizando o ambiente domiciliar, com baixos índices de infecção por *T. cruzi* (Oliveira & Silva 2007).

Dujardin *et al.* (1991) discutiram o risco de domiciliação de populações de *Rhodnius* no Brasil central, questionando qual espécie desse gênero era encontrada em casas no município de Mambai-GO; colônias de *R. prolixus* e espécimes peridomésticos de *R. neglectus* de Mambai apresentaram padrões isoenzimáticos idênticos e ambos diferiram da população de referência de *R. neglectus* da FIOCRUZ. Entretanto, a maioria dos estudos tem registrado a invasão de *R. neglectus* no peridomicílio e intradomicílio em Goiás, Minas Gerais, Tocantins, São Paulo e Paraná (Silveira *et al.* 1984, Silva *et al.* 1999, Guilherme *et al.* 2001, Oliveira & Silva, 2007). Os fatores que influenciam a domiciliação desses triatomíneos ainda são pouco conhecidos, sendo que a infestação das casas poderia estar associada à distância entre o ambiente domiciliar e as palmeiras (Forattini *et al.* 1971). Finalmente, Oliveira & Silva (2007) mostraram que *R. neglectus* foi a segunda espécie mais capturada em ambiente domiciliar nos municípios de Goiás, destacando a sinantropia dessa espécie no Brasil central.

1.4 Métodos utilizados no estudo de populações de triatomíneos

1.4.1 Morfometria

A descrição e a análise da **forma** das espécies sempre foram usadas na classificação dos organismos (Adams *et al.* 2004). Inicialmente, a morfometria era baseada na comparação de valores médios de uma ou mais medidas da estrutura analisada. Entretanto, novas técnicas modernizaram a morfometria, permitindo a descrição da variação de forma entre grupos de indivíduos e entre os indivíduos de cada grupo, além da análise das causas das diferenças de forma entre os organismos, sejam elas ecológicas ou filogenéticas (Monteiro & Reis 1999).

A **morfometria geométrica** é baseada no uso de coordenadas cartesianas de marcos anatômicos e métodos de superposição para analisar a variação de forma entre espécimes (Rohlf & Marcus 1993, Slice 2007). A partir da amostragem de um conjunto de pontos homólogos (marcos anatômicos) de uma determinada estrutura a **configuração consenso** desses pontos em vários indivíduos é obtida. A técnica permite analisar a forma das estruturas, assim como

apresentar de maneira gráfica e clara as diferenças de forma, além de indicar com maior precisão em quais regiões se concentra a sua variação.

Para remover os efeitos de tamanho, orientação e posição ao comparar uma determinada estrutura, os marcos anatômicos de diferentes espécimes são sobrepostos usando a **Análise Generalizada de Procrustes (AGP)** (Adams *et al.* 2004) a partir do método dos mínimos quadrados (Bookstein 1991). Ao utilizar a AGP, um estimador de tamanho chamado **Tamanho do Centróide (TC)** é extraído a partir da raiz quadrada da soma das distâncias elevada ao quadrado entre o centro de gravidade de cada estrutura (centróide) e os marcos anatômicos que a definem. Dessa maneira, a forma e o tamanho das estruturas podem ser analisados separadamente.

As divergências de forma das estruturas comparadas são medidas a partir das diferenças na posição relativa dos pontos de um espécime em relação à configuração consenso do grupo, gerando variáveis de forma (deformações parciais e componentes uniformes) invariantes em relação à posição, orientação e tamanho. As mudanças de forma nas estruturas analisadas são visualizadas em grides de deformação usando a função “Thin Plate Spline – TPS” (Rohlf 1999) amplamente utilizada em computação gráfica para transformar suavemente uma estrutura em outra. As deformações parciais dos espécimes de diferentes populações ou espécies podem ainda ser analisadas em análises multivariadas, como por exemplo, **Análise de Componentes Principais (ACP)** e **Análise de Funções Discriminantes (AFD)**.

As análises multivariadas tradicionais têm como objetivo representar os indivíduos em um espaço de variáveis reduzido (Sorensen & Footit 1992). Em uma ACP, o objetivo é verificar se alguns componentes podem explicar a maior parte da variância dos dados originais, verificando se há estrutura nas matrizes de dados e a natureza dessa estrutura. Se existe uma estrutura, com uma tendência de formação de grupos de indivíduos, uma AFD pode ser feita para testar a diferença entre eles. A AFD é um tipo de análise multivariada em que os grupos são previamente definidos e as diferenças entre esses grupos (populações ou espécies) são analisadas

a partir da magnificação da variação entre os grupos em relação à variação dentro de cada grupo. Quando as variáveis de forma são usadas na AFD, cada função discriminante representa um único padrão de variação de forma e pode ser usada para plotar indivíduos em um espaço discriminante de forma (Monteiro & Reis 1999). No mapa fatorial resultante dessa análise, os pontos (espécimes) que possuem uma forma similar são agrupados. A distância discriminante entre os grupos se associa a uma probabilidade de pertencer a um grupo específico. Essa probabilidade tem uma utilidade taxonômica, pois se os grupos estão naturalmente bem definidos a probabilidade de reclassificação em um grupo original é alta. A AFD gera funções discriminantes que permitem classificar posteriormente um indivíduo de origem desconhecida em um grupo mais provável. Essas reclassificações podem ser testadas pela estatística Kappa (Landis & Koch 1977), gerando um índice que avalia o poder estatístico do modelo discriminante. Dessa forma, a morfometria geométrica aliada à análise multivariada permite identificar espécimes de espécies similares a partir da comparação com grupos de referência previamente identificados. Essa abordagem pode ser muito útil quando espécies crípticas não são reconhecidas em estudos de sistemática qualitativa. Nesse sentido, a abordagem quantitativa da morfometria geométrica, mostrando padrões detalhados de diferenças de forma entre os organismos com grande poder estatístico, acaba sendo uma ferramenta muito eficiente para estudar problemas taxonômicos complexos (Baylac *et al.* 2003).

A morfometria geométrica também tem sido aplicada para estudar a variabilidade intra-específica. A diferenciação entre populações e a variação de forma e tamanho em relação às variações ambientais ao longo da distribuição geográfica de uma espécie podem ser exploradas usando essa técnica. Para isso, matrizes de dados ambientais (e.g. temperatura, umidade, precipitação, altitude, latitude e longitude) podem ser relacionadas com a variação de tamanho e forma da espécie por meio de análises de regressão. Este tipo de análise, aplicada a espécies com ampla distribuição geográfica, pode ser usada para testar regras ecogeográficas ou tendências morfológicas ao longo de gradientes ambientais, como, por exemplo, a **regra de Bergmann**

(Atkinson & Sibly 1997). Esta análise ecogeográfica permite também estudar a **plasticidade fenotípica**, a capacidade de organismos geneticamente semelhantes apresentarem diferentes fenótipos em resposta às condições ambientais (Scheiner 1993). Bitner-Mathé & Klasczo (1999) mostraram que a temperatura e a densidade populacional podem alterar a morfologia de asas de *Drosophila melanogaster*, a primeira influenciando o tamanho e a segunda a forma. O efeito da temperatura no tamanho também foi observado em *Musca domestica* (Chapman & Goulson 2000). O microhabitat também pode influenciar o tamanho dos insetos; Carreira *et al.* (2006) mostraram diferentes tamanhos de asas em moscas (*Drosophila* spp.) vivendo em diferentes espécies de cactos e Stillwell *et al.* (2007) observaram que o tamanho corporal do besouro *Stator limbatus* é influenciado pela variação do tamanho da semente hospedeira. Finalmente, o tamanho do corpo de insetos pode ainda ser influenciado pela altitude (Rosemary *et al.* 2000).

Antes da década de 1990, somente a morfometria clássica, baseada em medidas lineares e razões entre as mesmas, era usada na classificação das espécies de triatomíneos. Posteriormente, técnicas morfométricas tradicionais baseadas em análises multivariadas foram introduzidas. Gorla *et al.* (1993) mostraram diferenças morfométricas entre *Triatoma sordida*, *T. guasayana* e *T. patagonica*, salientando a utilidade da técnica para resolver problemas taxonômicos. Diferenças entre populações de *Rhodnius prolixus* e *R. robustus* na Venezuela também foram detectadas mediante a aplicação de análises multivariadas (Galíndez Girón *et al.* 1994, Harry 1994). Estudos sobre a variabilidade morfométrica de outras espécies de *Rhodnius* mostraram diferenciação entre *R. pictipes*, *R. neglectus* e *R. nasutus* (Harry 1994). Em seguida, estudos morfométricos apresentaram diferenciação métrica de populações de *T. infestans* (Dujardin *et al.* 1997), *R. robustus* (Galíndez Girón & Torres 1999) e *P. rufotuberculatus* (Dujardin *et al.* 1998a). A partir destes últimos estudos, a morfometria foi usada como ferramenta para estudar diferenças métricas entre populações domésticas e silvestres, tendo aplicação para a vigilância e controle vetorial da doença de Chagas.

Ainda no final da década de 1990, outros estudos morfométricos foram realizados mostrando relações filogenéticas entre espécies de triatomíneos (Gorla *et al.* 1997, Dujardin *et al.* 1999a) e variação intra-específica (Dujardin *et al.* 1998a,b, 1999b, Soares *et al.* 1999). A morfometria tradicional ainda tem sido utilizada em análises de variação geográfica e ecológica de espécies de triatomíneos (Bustamante *et al.* 2004, Borges *et al.* 2000, Fernández *et al.* 2005) e para abordar questões sistemáticas (Patterson *et al.* 2001). Entretanto, o uso das técnicas de morfometria geométrica em estudos com triatomíneos tem aumentado nos últimos anos. A técnica tem sido aplicada para resolver problemas taxonômicos (Matías *et al.* 2001, Villegas *et al.* 2002, Gumiel *et al.* 2003, Patterson 2007), para estudar a variação morfológica intra-específica (Jaramillo *et al.* 2002, Gumiel *et al.* 2003, Schachter-Broide *et al.* 2004, Vargas *et al.* 2006) e para analisar o fenômeno de re-infestação (Dujardin *et al.* 2007, Feliciangeli *et al.* 2007). Entretanto, poucos estudos foram desenhados para relacionar a forma e o tamanho de populações silvestres de uma espécie com características ambientais ao longo de sua distribuição, apesar de existirem alguns exemplos de plasticidade fenotípica em triatomíneos (Dujardin *et al.* 1999c).

Os triatomíneos são capazes de desenvolver mudanças morfológicas rápidas como adaptações a novos habitats. Durante a transição do ambiente silvestre para o artificial observa-se diminuição de tamanho corporal, da densidade de sensores de antena, do dimorfismo sexual e da simetria, com aumento dos valores de assimetria flutuante (Dujardin *et al.* 1999b). Populações de *R. ecuadoriensis* habitando diferentes ecótopos silvestres apresentaram tamanhos e padrões cromáticos diferentes apesar de geneticamente semelhantes (Abad-Franch *et al.* 2003), e populações de *R. nasutus* provenientes de diferentes espécies de palmeiras apresentaram significativa variação morfológica (Diotaiuti *et al.* 2005). Por outro lado, linhagens de triatomíneos geneticamente diferentes podem apresentar morfologia similar ao habitar ecótopos semelhantes, como observado em linhagens de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*, habitando as mesmas espécies de palmeiras (Dujardin *et al.* 1999c).

Estudar a variabilidade morfológica de espécies e populações de triatomíneos cuja identificação é problemática usando taxonomia clássica (e.g. espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*) tem aplicações importantes relacionadas à vigilância entomológica da doença de Chagas, principalmente nos casos onde as espécies têm diferentes capacidades de domiciliação. Dessa forma, os métodos de morfometria geométrica podem ser aplicados para a identificação das espécies de *Rhodnius* que ocorrem em palmeiras e casas no Brasil central, respondendo a uma pergunta formulada na década de 1990 (Dujardin *et al.* 1991): qual espécie de *Rhodnius* ocorre em casas no Brasil?

1.4.2 Modelagem de nicho ecológico e distribuição potencial

O sensoriamento remoto é um processo de aquisição de informações à distância sobre um objeto, área ou fenômeno. A disponibilidade de informações geográficas fornecidas por **sensores remotos** a bordo de satélites em órbita ao redor da Terra e os avanços nas técnicas de geoprocessamento têm permitido analisar de forma eficiente a distribuição geográfica de vários organismos (Silva & Zaidan, 2004). Esta abordagem tem sido aplicada em estudos epidemiológicos (Hay 2000, Herbreteau *et al.* 2005), incluindo análise da distribuição potencial de vetores com interesse médico como mosquitos (e.g. Achee *et al.* 2006), caramujos (e.g. Kristensen *et al.* 2001) e triatomíneos (e.g. Gorla 2002).

A distribuição geográfica dos organismos é afetada por variáveis ambientais que são estudadas usando sensoriamento remoto, geoprocessamento e modelagem de nicho ecológico. Os sensores remotos detectam e medem a intensidade da radiação eletromagnética emitida e refletida por qualquer objeto na superfície terrestre. Essa informação é transmitida para estações especializadas na Terra, onde os dados são processados as imagens de satélite são geradas. Dependendo das características do sensor, a imagem pode ter baixa, média ou alta resolução espacial (o tamanho do pixel da imagem pode variar desde 1 m até mais que 1 km), resolução espectral (número de canais em que a energia eletromagnética é discriminada) e resolução temporal (frequência com que o satélite passa sobre um mesmo ponto da superfície terrestre)

(Hay 2000). Atualmente, as informações de vários sensores em satélites em órbita ao redor da Terra estão disponíveis na 'internet', como Landsat (<http://landsat.gsfc.nasa.gov>), SPOT (<http://www.spotimage.fr>), MODIS (<http://modis.gsfc.nasa.gov>) e NOAA-AVHRR ([http://daac.gsfc.nasa.gov/avhrr/global_8 km/](http://daac.gsfc.nasa.gov/avhrr/global_8km/)). A partir de **algoritmos** baseados nos dados registrados por esses sensores e nas informações de estações meteorológicas, as variáveis (temperatura, precipitação, cobertura do terreno, altitude) são estimadas (Goetz *et al.* 2000).

O NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) é muito usado no estudo da distribuição potencial de vetores (Herbreteau *et al.* 2005) por ser uma variável que integra efeitos da temperatura, da precipitação e de algumas propriedades do terreno. O cálculo desse índice é baseado nas propriedades espectrais de diferentes tipos de solo e vegetação, representando a capacidade de fotossíntese da área medida; como consequência, os biomas apresentam diferentes perfis de NDVI (Hay 2000). Este índice foi o que melhor explicou a distribuição geográfica de *Triatoma infestans* na América Latina (Gorla 2002) em comparação com as outras variáveis estudadas (temperatura do ar, temperatura de superfície, radiação infravermelha e déficit de pressão de vapor).

O uso da informação de imagens de satélite no contexto da epidemiologia das doenças transmitidas por vetores inclui: i) a elaboração de mapas com a distribuição do vetor e casos da doença, ii) o uso de dados registrados pelos sensores remotos para estudar a distribuição de características bióticas e abióticas que podem influenciar a distribuição dos vetores, iii) a seleção de variáveis que estão mais fortemente associadas com a distribuição geográfica e iv) a projeção da distribuição das variáveis identificadas em outras áreas para realizar previsões acerca da distribuição geográfica do vetor (modelagem de nicho ecológico e distribuição potencial) e/ou o risco de transmissão da doença nessas áreas (Gorla *et al.* 2005). Nesse contexto, a coleta, armazenamento e análise dos pontos de ocorrência dos triatomíneos pode ser um instrumento fundamental para a avaliação e orientação das atividades de controle vetorial da doença de Chagas.

A distribuição geográfica de *R. neglectus* foi descrita por Lent & Wygodzinsky (1979) incluindo os estados brasileiros de Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso. A partir dos dados de infestação domiciliar obtidos no Programa de Controle da Doença de Chagas no período de 1975/83, Silveira *et al.* (1984) listaram doze estados com ocorrência de *R. neglectus*. Entretanto, apenas oito estados foram citados por Galvão *et al.* (2003). De acordo com os mapas de distribuição geográfica de triatomíneos do gênero *Rhodnius* propostos por Carcavallo *et al.* (1999), *R. neglectus* é a espécie com a maior distribuição no Brasil, ocorrendo desde o nível do mar até cerca de 1000 m de altitude, entre 3 e 25° de latitude sul. Entretanto, essa distribuição pode ser inexata devido a possíveis erros de identificação. Adicionalmente, não há registro de mapas de distribuição de *R. neglectus* preditos usando variáveis ambientais. A relação entre a distribuição geográfica e variáveis ambientais (e.g. temperatura, precipitação e altitude) foi apresentada de forma qualitativa para algumas espécies de triatomíneos (e.g. Carcavallo *et al.* 1999). Outros estudos também relacionaram qualitativamente a distribuição dos triatomíneos com características da vegetação, por exemplo, a associação entre espécies de *Rhodnius* e palmeiras (e.g. Lent & Wygodzinsky 1979, Carcavallo *et al.* 1997, Romaña *et al.* 1999, Gaunt & Miles 2000, Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004). Entretanto, poucos estudos analisaram a influência de variáveis ambientais na distribuição de triatomíneos (Costa *et al.* 2002, Gorla, 2002, Rodriguero & Gorla 2004).

Vários métodos têm sido usados para prever a distribuição potencial de espécies usando a modelagem de nicho ecológico, baseados nos pontos de ocorrência e análise de variáveis ambientais, apresentando geralmente bons resultados (ver referências em Tsoar *et al.* 2007). A modelagem de nicho ecológico é particularmente relevante no estudo de vetores, sugerindo áreas potenciais de ocorrência do vetor e, conseqüentemente, áreas de risco de transmissão dos patógenos. Essa abordagem tem sido usada para estudar a distribuição potencial de vetores como mosquitos, carrapatos, flebótomos (ver referências em Herbreteau *et al.* 2005) e triatomíneos (Costa *et al.* 2002, Peterson *et al.* 2002).

Entre os algoritmos de modelagem do nicho ecológico desenvolvidos, destaca-se o “Genetic Algorithm for Rule-set Production” (**GARP**) (Stockwell & Noble 1992, Stockwell & Peters 1999). A modelagem de nicho ecológico usando GARP produz modelos de distribuição geográfica de espécies com boa acurácia e sensibilidade (Peterson & Cohoon 1999, Anderson *et al.* 2003, Tsoar *et al.* 2007). O GARP inclui vários algoritmos distintos (e.g. BIOCLIM, regressão logística) em uma abordagem iterativa. Estes algoritmos relacionam as condições ambientais (climáticas, topográficas, índices de vegetação) observadas nos pontos de ocorrência conhecidos da espécie com aquelas de pontos amostrados aleatoriamente na região de estudo, desenvolvendo uma série de regras que explicam os fatores associados à presença da espécie (Stockwell & Peters 1999). Como resultado, mapas de distribuição geográfica potencial da espécie são gerados. Alguns estudos têm confirmado a capacidade do GARP de produzir mapas de distribuição potencial de espécies de vetores de patógenos (Peterson *et al.* 2002, Levine *et al.* 2004, Peterson *et al.* 2004, Sweeney *et al.* 2006). A modelagem de nicho ecológico também já foi aplicada para diferenciar as condições ecológicas de populações de *Triatoma brasiliensis* no nordeste do Brasil (Costa *et al.* 2002) e para verificar relações entre a distribuição de mamíferos reservatórios (*Neotoma* spp.) e vetores do *T. cruzi* (grupo *Triatoma proctata*) no México (Peterson *et al.* 2002).

Observações de campo (Gurgel-Gonçalves obs. pess.) sugerem que a distribuição geográfica de *R. neglectus* no Brasil pode ser mais ampla que a proposta por Carcavallo *et al.* (1999) e Galvão *et al.* (2003). Analisar e predizer a distribuição geográfica desta espécie permitiria planejar estratégias de vigilância vetorial da doença de Chagas, esclarecendo os seus limites de distribuição geográfica e os fatores que influenciam a sua distribuição.

1.4.3 Métodos moleculares e estudos filogeográficos

Ferramentas moleculares têm sido amplamente usadas no estudo dos triatomíneos, incluindo o seqüenciamento de genes do DNA mitocondrial (mtDNA) (ver referências em Abad-Franch & Monteiro 2005). O uso de genes do mtDNA como marcadores moleculares é atrativo por vários motivos: grande número de cópias por célula, herança materna, frequência extremamente baixa de rearranjos por recombinação e presença de regiões altamente variáveis. Além disso, iniciadores universais podem ser usados para amplificar os genes mitocondriais de interesse. Os genes mitocondriais também apresentam rápidas taxas de evolução quando comparados com os nucleares e, conseqüentemente, são muito úteis para estudos de grupos com divergência recente (Avisé 2001).

O genoma mitocondrial foi seqüenciado para uma das espécies de triatomíneos, *Triatoma dimidiata*, com um comprimento de 17.019 pares de bases e contendo genes que codificam proteínas para a respiração celular (Dotson & Beard 2001). Os genes mitocondriais estudados incluem fragmentos de genes codificadores de proteínas como citocromo b, citocromo oxidase I e subunidades do RNA ribossômico (12S e 16S). Alguns estudos usando seqüenciamento de mtDNA examinaram a variabilidade genética e relações evolutivas em Triatominae (Stothard *et al.* 1998, Garcia & Powel 1998, Lyman *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2000, Hypsa *et al.* 2002, Sainz *et al.* 2004). Esses estudos têm confirmado a separação entre as tribos Triatomini e Rhodniini e a diferenciação de espécies morfológicamente similares como *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*. O seqüenciamento de genes mitocondriais também tem sido usado para analisar a variabilidade genética de populações de triatomíneos (Abad-Franch 2002, Garcia *et al.* 2003, Monteiro *et al.* 1999, 2003, Monteiro *et al.* 2004, Fitzpatrick 2005), permitindo detectar complexos de **espécies crípticas** em *R. robustus* (Monteiro *et al.* 2003) e *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.* 2004), sendo uma ferramenta muito útil em estudos de sistemática e filogeografia de espécies de triatomíneos.

Vários métodos moleculares já foram aplicados para separar *R. neglectus* das outras espécies de *Rhodnius*, como eletroforese de proteínas salivares (Soares *et al.* 2000), padrões isoenzimáticos (Chavez *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2002) e seqüenciamento de genes do DNA mitocondrial (Lyman *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2000). Soares *et al.* (1999) estudaram duas populações silvestres de *R. neglectus* (de Minas Gerais e Goiás) usando isoenzimas, porém não documentaram diferenças nos padrões enzimáticos. Embora vários métodos tenham sido utilizados para estudar e diferenciar *R. neglectus* das outras espécies de *Rhodnius*, pouco se sabe sobre a estrutura genética e filogeografia dessa espécie no Brasil.

A filogeografia é um campo de estudo relacionado com os princípios e processos que governam a distribuição de linhagens genealógicas, especialmente as intra-específicas. Os estudos filogeográficos analisam a influência de fatores históricos na distribuição geográfica das linhagens de genes ou haplótipos; a análise e interpretação da distribuição de linhagens requerem o uso de ferramentas da genética molecular, demografia, sistemática filogenética, paleontologia e geologia, o que faz da filogeografia uma disciplina integradora (Avice 2001).

Fatores biogeográficos históricos e contemporâneos (comportamentais e ecológicos) dos organismos têm importante papel na estrutura genética das populações (Avice *et al.* 1987). Isso permitiu formular as principais hipóteses filogeográficas conhecidas atualmente: i) as espécies com estrutura filogeográfica limitada ou fraca têm história de vida associada à **dispersão** e ocupam áreas livres de barreiras geográficas e ii) existem grupos intra-específicos monofiléticos diferenciados por grandes distâncias genéticas que usualmente são resultantes da existência de barreiras geográficas duradouras impedindo o **fluxo gênico** (Avice 2001). Essas hipóteses aplicadas a vetores de patógenos podem contribuir para entender mudanças na epidemiologia das doenças, pois a capacidade de dispersão desses vetores e sua habilidade de cruzar barreiras geográficas podem ser estudadas usando métodos filogeográficos (Fairley *et al.* 2002). Por exemplo, estudos de estrutura genética de *Culex tarsalis* (Venkatesan *et al.* 2007) mostraram fraco **isolamento por distância** e **panmixia**, evidenciando expansão populacional desse

mosquito na região do rio Nilo (África), resultado que tem importantes implicações epidemiológicas.

As principais hipóteses para explicar a formação de barreiras separando populações e causando diferenciação de espécies na América do Sul são baseadas em diferentes fatores históricos de **vicariância**, entre eles: i) transgressão marinha do Mioceno (Räsänen *et al.* 1995, Webb 1995), ii) rios como barreiras geográficas no Pleistoceno (Wallace 1853) e iii) flutuações climáticas do Pleistoceno e suas conseqüências (Haffer 1969). Essas hipóteses já foram examinadas em estudos de genética de populações de diferentes grupos como vertebrados (Moritz *et al.* 2000, Bates 2001, Aleixo 2004), borboletas (Brown *et al.* 1974, Brower 1994, Hall & Harvey 2002), besouros (Erwin & Pogue 1988, Erwin 1998, Scataglini *et al.* 2006) e abelhas (Dick *et al.* 2004).

Segundo a hipótese de transgressão marinha, houve um alagamento extensivo da América do Sul, principalmente nas planícies amazônicas, deixando três **escudos** relativamente isolados: o Planalto Central Brasileiro, o Guianense e o Andino (Frailey *et al.* 1988). Para aves brasileiras (Bates 2001) foi proposto que as populações ancestrais desses escudos começaram a divergir e eventualmente especiar, resultando em grandes áreas de endemismo. Entre as predições dessa hipótese estariam i) monofiletismo de linhagens presentes nos três escudos acima citados, ii) populações ancestrais encontradas nesses escudos e iii) populações recentemente derivadas encontradas nas planícies amazônicas.

A hipótese de rios como barreiras geográficas (Wallace 1853) sugere que os rios poderiam impedir a dispersão das populações de cada margem, eventualmente resultando em especiação. Esse processo poderia ter ocorrido entre o Plioceno/Pleistoceno, durante o desenvolvimento do rio Amazonas (Campbell *et al.* 2006). Em termos filogeográficos, clados intra-específicos irmãos deveriam existir ao longo dos rios neotropicais em vez de ocorrerem em áreas separadas pelos rios. Essa hipótese tem sido testada examinando os padrões de

diferenciação genética entre populações de diferentes **táxons** (ver referências em Gascon *et al.* 2000, Funk *et al.* 2007) incluindo insetos de interesse médico (Fairley *et al.* 2002).

A hipótese dos refúgios do Pleistoceno foi proposta por Haffer (1969) para explicar a diversificação de aves na Amazônia. Segundo essa hipótese, mudanças climáticas durante o Pleistoceno levaram a retração de áreas de floresta e respectivas populações, que ficaram isoladas e rodeadas por vegetação mais seca e aberta (savanas). Durante períodos mais quentes essas ilhas de floresta (refúgios) e suas populações se expandiam. As retrações e expansões ocorriam ciclicamente e resultavam em cladogênese. Entre as predições dessa hipótese estariam: i) sinais de efeito “gargalo de garrafa” (**bottleneck**) associados à retração e isolamento dos refúgios, ii) expansão demográfica associada com expansão do refúgio, iii) baixa variabilidade genética e pouca estrutura filogeográfica.

Conn & Mirabello (2007) examinaram os padrões de divergência e distribuição de espécies de vetores neotropicais (triatomíneos, flebótomos e mosquitos) em relação às três hipóteses acima listadas. Apenas uma espécie de triatomíneo (*R. prolixus*) apresentou padrão coincidente com a hipótese dos refúgios. A estrutura filogeográfica de *R. robustus* esteve de acordo com as predições da hipótese de transgressão marinha. Os flebótomos e mosquitos apresentaram elementos das hipóteses de transgressão marinha e refúgios, sugerindo uma interação de fatores determinando seus padrões de distribuição. A hipótese de rios como barreiras geográficas foi levantada para o mosquito-prego *Anopheles aquasalis* (Fairley *et al.* 2002). Neste estudo, o seqüenciamento do gene citocromo oxidase I de cinco populações de *A. aquasalis* da Amazônia foi realizado, incluindo as margens direita e esquerda do rio Amazonas, mostrando compartilhamento de haplótipos entre as populações e sugerindo que o rio não seria uma barreira importante para o fluxo gênico de populações dessa espécie.

O processo de dispersão de indivíduos e o fluxo gênico entre populações em uma região dependem de fatores intrínsecos das espécies (mobilidade e tolerância a fatores bióticos e abióticos), fatores ambientais (qualidade, distribuição e características ecológicas dos habitats) e

fatores evolutivos (McKenna 1973, Haffer 1969). No Cerrado, espécies de *Rhodnius* estão associadas principalmente às palmeiras dos gêneros *Attalea*, *Acrocomia* e *Mauritia* (Barretto 1979), sendo que a dispersão de indivíduos (e conseqüentemente potencial fluxo gênico) poderia ocorrer ao longo das veredas, campos úmidos onde são encontradas populações de *Mauritia flexuosa*. Dessa forma, a similaridade genética entre duas populações em uma mesma bacia seria proporcional à distância entre elas ao longo da bacia pelo mecanismo de isolamento por distância (Wright 1943).

Alguns estudos sobre a distribuição de triatomíneos em diferentes regiões biogeográficas têm sido publicados nas últimas décadas (e.g. Forattini *et al.* 1983, Carcavallo *et al.* 1998, Abad-Franch & Monteiro 2007), mas ainda há a necessidade de informações mais detalhadas sobre a origem e dispersão de espécies de triatomíneos do Cerrado. Estudos sistemáticos e filogeográficos de espécies de *Rhodnius* no Cerrado e **ecótonos** (áreas de transição com os biomas Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga) devem ser explorados. Esses estudos, além de testar hipóteses biogeográficas, devem esclarecer a origem e a diversificação das populações de *Rhodnius* no Brasil central.

1.5 Epidemiologia e controle da doença de Chagas

O controle da doença de Chagas é baseado em três tipos de intervenção: i) prevenção da transmissão vetorial do *T. cruzi* a partir da eliminação dos triatomíneos domiciliados, ii) prevenção da transfusão sanguínea com sangue contaminado e da transmissão congênita e iii) a partir da educação em saúde, tratamento dos infectados e melhoria das moradias em áreas endêmicas. Entre as intervenções mais eficientes está o controle das populações domiciliadas de triatomíneos usando inseticidas residuais (piretróides). Esse método continua sendo usado com sucesso nos programas de controle da América Latina. A melhoria das moradias também é um meio eficiente para prevenir a colonização dos triatomíneos, porém tem um custo mais elevado e

depende de políticas governamentais, o que reduz a aplicabilidade dessa estratégia (Dias & Schofield 1999, Dias 2007).

Entre as estratégias de controle bem sucedidas na América Latina está a iniciativa multinacional do cone sul, estabelecida em 1991 para o controle da transmissão do *T. cruzi* nos países participantes (Brasil, Argentina, Chile, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Peru). O objetivo da iniciativa foi erradicar populações domésticas e peridomésticas do principal vetor, *Triatoma infestans* (Schofield *et al.* 2006). Iniciativas internacionais como estas reduzem as chances de reinvasão a partir de focos não tratados pelo movimento de pessoas através das fronteiras, que tem sido apontado como principal mecanismo de dispersão de *T. infestans* a partir dos focos primários na Bolívia.

O número de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* na América Latina foi estimado entre 16 e 18 milhões em 1990 (WHO 1991). Atualmente, essa estimativa caiu para 9,8 milhões, evidenciando o sucesso das campanhas de controle vetorial com a significativa redução das populações domiciliadas do principal vetor, *T. infestans*. Recentemente, o Brasil foi declarado livre da transmissão vetorial do *T. cruzi* por essa espécie de triatomíneo (Schofield *et al.* 2006). Entretanto, ainda há o risco de transmissão do parasito por espécies de vetores silvestres que podem invadir o ambiente doméstico e iniciar novos focos. Alternativamente, há também a possibilidade de ocorrer a transmissão oral, há bastante tempo conhecida e que tem sido observada recentemente na Amazônia e outras regiões do Brasil, a partir da ingestão de alimentos contaminados (e.g. caldo de cana, açaí), resultando em formas agudas graves e potencialmente letais da doença de Chagas.

Populações de várias espécies de *Rhodnius* apresentam capacidade de colonização de ambientes artificiais em diferentes regiões; uma delas, *R. prolixus* é o principal vetor da doença de Chagas cuja presença foi questionada no Brasil Central (Dujardin *et al.* 1991). Populações de triatomíneos sinantrópicos tem sido o alvo dos programas de controle baseados no uso de inseticidas (e.g. Dias, 2007). Entretanto, a presença de populações silvestres próximas das casas

limita as intervenções de controle em muitas regiões. Triatomíneos adultos repetidamente invadem as casas, mantendo o risco de transmissão da doença e eventualmente originando novas colônias em ambiente domiciliar (Miles *et al.* 2003). Essa fenômeno é comum na Amazônia (Aguilar *et al.* 2007) e em ecorregiões mais secas no Brasil (Barretto *et al.* 1968, Silveira *et al.* 1984, Garcia-Zapata *et al.* 1985, Silva *et al.* 1992, Silva *et al.* 1999, Guilherme *et al.* 2001, Oliveira & Silva, 2007). Grande parte desses vetores pertence ao grupo *R. prolixus*, que inclui *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. nasutus* e *R. neglectus* (Barrett, 1991). Essas quatro espécies são morfológicamente similares e suas distribuições geográficas (nem sempre definidas precisamente) se sobrepõem parcialmente. Além disso, elas apresentam diferentes capacidades vetoriais. Considerando o caráter enzoótico da infecção por *T. cruzi*, o conhecimento da ecologia, biologia, comportamento e sistemática das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* é fundamental para a adequação da vigilância vetorial da doença de Chagas.

2. Objetivos

2.1 Abordagens e enfoque da pesquisa

O estudo de populações de *Rhodnius* no Brasil central foi abordado de quatro formas, focando na principal espécie encontrada no bioma Cerrado: *Rhodnius neglectus*. Na primeira abordagem, foi feita a identificação das espécies de *Rhodnius* que ocorrem em palmeiras (*Mauritia flexuosa*) e casas no Brasil central e uma análise da variação morfológica de populações de *R. neglectus* a partir de técnicas de morfometria geométrica. Na segunda abordagem, foi feita uma análise da infestação e dos índices de infecção por tripanossomatídeos das populações capturadas em 40 áreas de quatro bacias hidrográficas no Brasil. A terceira abordagem foi realizada utilizando modelagem de nicho ecológico para prever a distribuição potencial de *R. neglectus* baseada na relação entre variáveis ambientais e registros de ocorrência da espécie. Na quarta abordagem, foi apresentada uma análise da estrutura genética e filogeográfica de *R. neglectus* baseadas no polimorfismo de seqüências de citocromo b do DNA mitocondrial, testando a hipótese de diferenciação entre populações pelo processo de isolamento por distância. Esta abordagem também permitiu levantar hipóteses sobre a origem das populações de *R. neglectus* no Brasil central (Cerrado) a partir de linhagens ancestrais de *Rhodnius* na Amazônia.

Essas abordagens permitiram estudar de forma multidisciplinar e, em diferentes escalas, potenciais vetores da doença de Chagas no Brasil central, com objetivo de responder algumas questões epidemiologicamente importantes como: i) quais espécies de *Rhodnius* ocorrem em palmeiras e casas no Brasil central?, ii) quais fatores influenciam os níveis de infestação desses triatomíneos nas palmeiras e infecção por tripanossomatídeos? iii) quais são os limites de distribuição geográfica de *R. neglectus* e quais fatores influenciam essa distribuição? iv) qual a origem das populações de *Rhodnius* no Brasil central? Para responder essas questões, há a necessidade de estudos em sistemática, ecologia e evolução dos vetores que podem trazer informações importantes para otimizar a vigilância entomológica da doença de Chagas no Brasil central, caracterizando o enfoque em saúde da pesquisa.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar quais espécies de *Rhodnius* ocorrem em palmeiras e casas no Brasil central;
2. Estudar a variação de forma e tamanho de asas e cápsulas cefálicas de populações de *Rhodnius neglectus* e analisar a influência de fatores ambientais no fenótipo das populações;
3. Verificar a influência de fatores ambientais na infestação, densidade e níveis de infecção por tripanossomatídeos de *R. neglectus* em palmeiras (*Mauritia flexuosa*);
4. Atualizar a distribuição geográfica conhecida de *R. neglectus*, incluindo novos registros de ocorrência para essa espécie no Brasil;
5. Predizer a distribuição geográfica potencial de *R. neglectus* usando modelagem de nicho ecológico (GARP);
6. Comparar a distribuição geográfica de *R. neglectus* com a de espécies de palmeiras e aves presentes na região de estudo.
7. Analisar a estrutura genética e o padrão de distribuição geográfica de haplótipos de *R. neglectus* e testar se há diferenciação entre populações pelo processo de isolamento por distância;
8. Apresentar uma hipótese filogeográfica para as populações de *R. neglectus* no Brasil central.
9. Estudar as relações de parentesco entre *R. neglectus* e as outras espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*.

3. Material e métodos

3.1 Áreas de estudo

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, ocupando aproximadamente 25% do território nacional (Klink & Machado 2005). A região apresenta clima tropical de savana, com distribuição sazonal de chuvas que resulta em duas estações bem definidas: uma chuvosa (outubro a abril) e outra seca (maio a setembro), quando a umidade relativa do ar pode apresentar valores menores que 20%. Formações florestais, savânicas e campestres são encontradas no bioma, totalizando onze fitofisionomias principais (Ribeiro & Walter 1998).

A amostragem das populações silvestres de *Rhodnius* foi realizada entre julho de 2005 e janeiro de 2007 em veredas, campos úmidos permanentes colonizados por populações de palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa*, conhecidas como “buritis” (Ribeiro & Walter, 1998). Essa fitofisionomia tem um importante papel na manutenção dos recursos hídricos e, atualmente, é considerada como Área de Proteção Permanente (APP) pelo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que proíbe o desmatamento.

As palmeiras foram amostradas em veredas de quatro bacias hidrográficas (Figura 3). Segundo o Conselho Nacional de Recursos Hídricos (Resolução nº 32, de 15 de outubro de 2003), o Brasil é dividido em 12 regiões hidrográficas. No Brasil central estão presentes as bacias do Tocantins/Araguaia, Paraná, Paraguai e São Francisco. A bacia dos rios Tocantins/Araguaia inclui territórios dos estados do Pará, Tocantins, Maranhão, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso; os principais biomas da região são a Amazônia ao norte e o Cerrado ao sul. A bacia do São Francisco inclui áreas dos estados de Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais. O rio São Francisco é o principal curso d'água da bacia com cerca de 2.700 km de extensão, em áreas de Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. A bacia do Paraguai inclui áreas de dois estados brasileiros (Mato Grosso e Mato Grosso de Sul) e de países vizinhos do Brasil (Argentina, Paraguai e Bolívia). O principal rio da bacia é o Paraguai, que nasce em território brasileiro na Chapada dos Parecis (MT). Os biomas predominantes na bacia

são o Cerrado e o Pantanal. Finalmente, a bacia do Paraná inclui os estados de Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. O rio Paraná é o principal curso d'água da bacia, que inclui áreas de Mata Atlântica, Cerrado e Mata de Araucárias, fortemente desmatadas ao longo da ocupação da região (Agência Nacional de Águas, 2007).

As coordenadas geográficas (latitude e longitude) das áreas de estudo foram obtidas usando um Sistema de Posicionamento Global (GPS 12 XL, Garmin[®]). Os valores das variáveis climáticas (temperatura máxima, temperatura mínima e precipitação) e da altitude nos pontos de coleta georreferenciados foram obtidos do projeto Worldclim (<http://www.worldclim.org/>). Os dados das estações climáticas (média mensal dos valores no período entre 1950 e 2000) foram interpolados gerando grids com resolução de 2,5 min (5x5 km); os detalhes do método de interpolação e a distribuição das estações climáticas foram descritos Hijmans *et al.* (2005). O microhabitat foi descrito de acordo com o material predominante dos ninhos de aves presentes nas bainhas foliares da palmeira *Mauritia flexuosa* (folhas, gravetos). As características ambientais das 40 áreas de estudo estão listadas na Tabela 2.

3.2 Coleta dos triatomíneos e índices entomológicos analisados

Os triatomíneos foram coletados em palmeiras (*M. flexuosa*) de quatro bacias hidrográficas (Figura 3). Em cada área foi feita a busca de palmeiras que apresentavam evidências de colonização de vertebrados (principalmente aves) a partir da visualização de folhas e/ou gravetos nas bainhas foliares; posteriormente, essas palmeiras foram escaladas utilizando escadas e cordas de segurança. Matéria orgânica, vegetal e ninhos abandonados presentes entre a bainha das folhas e a estipe foram coletados em sacos plásticos para posterior triagem no laboratório (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004). A coleta dos triatomíneos foi feita com prévia licença do IBAMA (ver anexo). Os triatomíneos presentes nas bainhas foliares no momento da

coleta e os detectados na triagem do material coletado foram capturados, separados por sexo (adultos), estágio ninfal (imaturos) e contados.

Foram calculados os seguintes índices entomológicos: i) frequência de palmeiras infestadas, ii) número de triatomíneos por palmeira (densidade), iii) razão adulto/ninfa (nº. total de adultos/ nº. total de ninfas), iv) razão sexual (nº. total de machos/ nº. total de fêmeas) e v) número de triatomíneos infectados por tripanossomatídeos (*Trypanosoma cruzi* e/ou *T. rangeli*)/examinados a partir de exames de fezes e glândulas salivares. A identificação morfológica dos tripanossomatídeos foi feita a partir da observação de amostras de fezes de triatomíneos infectados, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa[®]. A diferenciação entre *T. cruzi* e *T. rangeli* foi feita de acordo com Cuba Cuba (1998).

Para analisar a variação do número de triatomíneos coletados nas áreas e nos diferentes microhabitats (palmeiras com ninhos produzidos com folhas, gravetos e sem ninhos) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de $p < 0,01$. Este teste foi escolhido pois o número de triatomíneos coletados nas palmeiras não apresentou distribuição normal. Altitude, variáveis climáticas e microhabitat (tipo de ninho) foram relacionados com a densidade de triatomíneos/palmeira usando o teste de correlação de Spearman para explorar a influência do ambiente na densidade das populações. Os testes foram realizados com o programa Statistica[®] (StatSoft Inc. 1996).

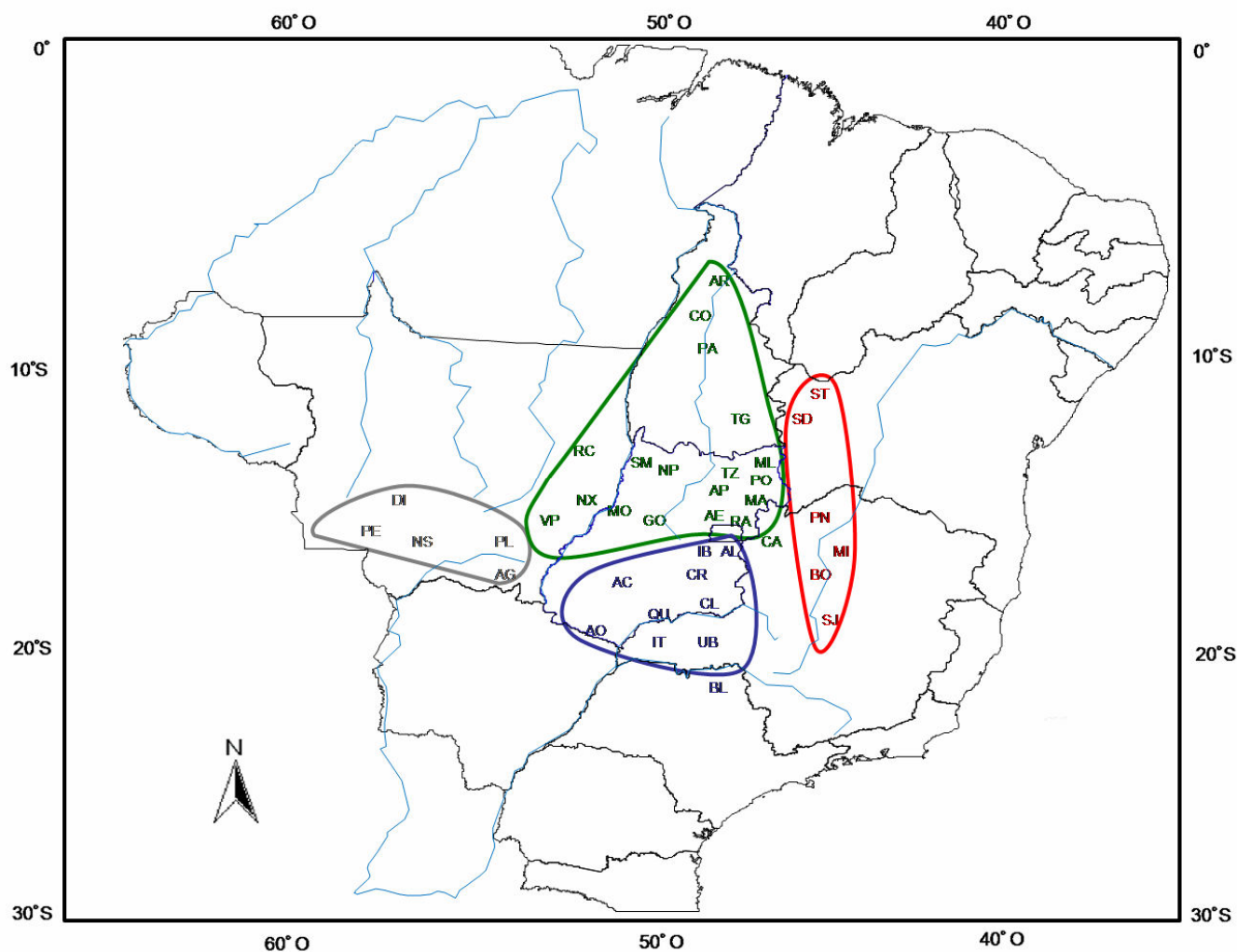


Figura 3. Distribuição geográfica das populações estudadas em quatro bacias hidrográficas do Brasil. As linhas azuis claras representam os principais rios. Áreas da bacia do Tocantins/Araguaia (em verde): AE (Estação Ecológica Águas Emendadas-DF), RA (Planaltina-DF), CA (Cabeceiras-GO), AP (Alto Paraíso-GO), TZ (Terezina-GO), MA (Mambaí-GO), PO (Posse-GO), ML (Monte Alegre-GO), TG (Taguatinga-TO), PA (Palmas-TO), CO (Colinas do Tocantins-TO) e AR (Araguaína-TO), GO (Cidade de Goiás-GO), MO (Mozarlândia-GO), SM (São Miguel do Araguaia-GO), NP (Novo Planalto-GO), RC (Ribeirão Cascalheira-MT), NX (Nova Xavantina-MT) e VP (Vila Paredão-MT); Áreas da bacia do Paraná (em azul): IB (Paranoá, DF), AL (Alphaville, Divisa DF/GO), CR (Cristalina-GO), CL (Campo Alegre-GO), IT (Ituiutaba-MG), UB (Uberlândia-MG), BL (Buritizal-SP), QU (Quirinópolis-GO), AO (Aporé-GO), AC (Acreúna-GO); Áreas da bacia do São Francisco (em vermelho): SJ (São José dos Buritis-MG), BO (Buritizeiro-MG), MI (Mirabela-MG), PN (Parque Nacional Cavernas do Peruaçu-MG), SD (São Desidério-BA) e ST (Santa Rita de Cássia-BA). Áreas da bacia do Paraguai: AG (Alto Garça-MT), PL (Primavera do Leste-MT), NS (Nossa Senhora do Livramento-MT), DI (Diamantino-MT) e PE (Porto Esperidião-MT).

Tabela 2. Código, coordenadas geográficas, altitude, bacia hidrográfica, microhabitat, temperatura máxima (Tmax.), temperatura mínima (Tmin.) e precipitação (Prec.) das áreas de coleta.

Código^a	Coordenadas (latitude/longitude)	Altitude (m)	Bacia hidrográfica	Microhabitat^b	Tmax. (°C)	Tmin. (°C)	Prec. (mm)
AE	15°34'S/47°36'W	1154	Tocantins	Gravetos	26,0	16,7	236
AP	14°09'S/47°33'W	1225	Tocantins	Folhas	25,9	17,4	264
AR	07°28'S/48°22'W	270	Tocantins	Folhas	30,1	20,7	276
CA	15°49'S/46°58'W	744	Tocantins	Folhas/Gravetos	27,7	17,7	262
CO	08°13'S/48°27'W	216	Tocantins	Sem ninho	30,6	20,6	297
GO	15°54'S/50°12'W	410	Tocantins	Sem ninho	29,0	20,4	333
MA	14°27'S/46°09'W	747	Tocantins	Folhas/Gravetos	29,1	19,3	200
ML	13°09'S/46°51'W	650	Tocantins	Sem ninho	27,8	20,8	290
MZ	14°48'S/50°32'W	348	Tocantins	Gravetos	30,7	21,7	330
NP	13°14'S/49°33'W	294	Tocantins	Gravetos	31,3	22,0	307
NX	14°44'S/52°20'W	325	Tocantins	Gravetos	31,0	19,8	244
PA	09°58'S/48°19'W	231	Tocantins	Folhas	30,9	21,1	292
PO	14°03'S/46°16'W	800	Tocantins	Gravetos	29,0	19,4	253
RA	15°46'S/47°36'W	1125	Tocantins	Folhas/Gravetos	27,0	17,5	234
RC	12°58'S/51°50'W	342	Tocantins	Gravetos	30,9	21,1	278
SM	13°15'S/50°07'W	289	Tocantins	Folhas/Gravetos	31,4	21,8	317
TG	12°23'S/46°24'W	600	Tocantins	Folhas	30,4	20,2	302
TZ	13°47'S/47°15'W	700	Tocantins	Folhas	28,3	19,6	294
VP	15°33'S/53°24'W	527	Tocantins	Gravetos	29,1	17,8	320
BO	17°22'S/44°57'W	474	São Francisco	Gravetos	30,0	19,9	233
MI	16°06'S/44°13'W	830	São Francisco	Folhas	29,2	16,8	200
PN	15°01'S/44°20'W	696	São Francisco	Gravetos	29,3	18,5	172
SJ	18°43'S/45°07'W	596	São Francisco	Folhas	30,7	19,1	213
SD	12°23'S/45°52'W	716	São Francisco	Gravetos	30,2	19,2	281
ST	11°04'S/44°37'W	450	São Francisco	Folhas	31,3	18,9	150
AC	17°24'S/50°23'W	432	Paraná	Gravetos	30,4	20,4	262
AL	16°03'S/47°32'W	1026	Paraná	Gravetos	27,0	16,8	231
AO	19°00'S/51°51'W	512	Paraná	Folhas/Gravetos	30,1	20,1	278
BL	20°11'S/47°42'W	830	Paraná	Gravetos	26,9	17,7	298
CL	17°39'S/47°45'W	907	Paraná	Gravetos	29,0	18,1	257
CR	16°54'S/47°41'W	1074	Paraná	Gravetos	27,9	16,5	221
IB	15°55'S/47°54'W	1105	Paraná	Gravetos	26,7	16,7	292
IT	18°57'S/49°35'W	540	Paraná	Gravetos	30,6	19,7	271
QU	18°34'S/50°26'W	432	Paraná	Folhas	29,8	20,1	276
UB	19°09'S/48°09'W	847	Paraná	Gravetos	28,1	17,6	280
AG	16°51'S/53°54'W	680	Paraguai	Gravetos	29,1	18,0	274
DI	14°27'S/56°15'W	440	Paraguai	Gravetos	31,0	19,7	281
PE	15°42'S/58°37'W	148	Paraguai	Gravetos	33,0	22,1	266
PL	15°31'S/54°13'W	604	Paraguai	Gravetos	28,8	18,0	317
NS	15°44'S/50°33'W	253	Paraguai	Gravetos	31,7	21,5	194

^a Conforme Figura 3. ^b De acordo com o material predominante dos ninhos de aves presentes nas bainhas foliares da palmeira *Mauritia flexuosa*.

3.3 Morfometria

3.3.1 Populações estudadas para a identificação das espécies de *Rhodnius* do grupo *R.*

prolixus

Duzentos e trinta espécimes adultos de *Rhodnius* de 19 populações (cinco de palmeiras, duas de colônias de laboratório e 12 de casas de cinco estados brasileiros) foram analisados (Tabela 3). Os espécimes de referência de *R. neglectus* foram obtidos de uma colônia do Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ - MG) fundada com espécimes da localidade tipo. Espécimes de *R. prolixus* foram obtidos de uma colônia (Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Universidad del Tolima, Ibagué, Colômbia) fundada com espécimes coletados no vale de Magdalena, uma área onde não são encontrados outros membros do grupo *R. prolixus* (Abad-Franch & Monteiro 2007).

Espécimes domésticos de *Rhodnius* foram coletados durante as buscas de rotina dos agentes do Programa Brasileiro de Controle da Doença de Chagas (PBCDC) entre 2006 e 2007. Todos os triatomíneos foram identificados preliminarmente usando chaves descritas por Lent & Wygodzinsky (1979). Espécimes com identificação duvidosa foram tratados como ‘espécimes problema’ nas análises morfométricas. Entre esses espécimes estavam os coletados em Mambaí-GO [área em que a presença de *R. neglectus* foi questionada por Dujardin *et al.* (1991)] e todos os espécimes coletados nas casas pelos agentes do PBCDC (*Rhodnius* sp. na Tabela 3).

Tabela 3. Origem, habitats, coordenadas geográficas e número de asas e cápsulas cefálicas das populações de *Rhodnius* sp. usadas nas análises morfológicas.

População	Origem	Habitat	Coordenadas	Asas	Cabeças
<i>R. neglectus</i> ^a	Buritizal, SP, Brasil	Palmeiras (<i>Mauritia flexuosa</i>)	20°11'S, 47°42'W	17	30
<i>R. neglectus</i> ^a	Taguatinga, TO, Brasil	Palmeiras (<i>M. flexuosa</i>)	12°23'S, 46°24'W	23	23
<i>R. neglectus</i> ^b	Uberaba, MG	Colônia de laboratório	19°32'S, 48°01'W	11	8
<i>R. robustus</i> ^c	Marabá, PA, Brasil	Palmeiras (<i>Attalea speciosa</i>)	05°16'S, 49°50'W	34	45
<i>R. nasutus</i> ^b	Sobral, CE, Brasil	Palmeiras (<i>Copernicia prunifera</i>)	03°40'S, 40°13'W	30	30
<i>R. prolixus</i> ^d	Tolima, Ibagué, Colômbia	Colônia de laboratório	02°59'N, 74°29'W	32	37
<i>Rhodnius</i> sp.	Mambaí, GO, Brasil	Palmeiras (<i>M. flexuosa</i>)	14°27'S, 46°08'W	19	21
<i>Rhodnius</i> sp.	Ituitaba, MG, Brasil	Domicílios	18°57'S, 49°35'W	6	4
<i>Rhodnius</i> sp.	Tocantinópolis, TO, Brasil	Domicílios	06°19'S, 47°24'W	9	8
<i>Rhodnius</i> sp.	Araguatins, TO, Brasil	Domicílios	05°38'S, 48°05'W	3	3
<i>Rhodnius</i> sp.	Taguatinga, TO, Brasil	Domicílios	12°23'S, 46°23'W	1	1
<i>Rhodnius</i> sp.	Quirinópolis, GO, Brasil	Domicílios	18°28'S, 50°27'W	1	1
<i>Rhodnius</i> sp.	Cidade de Goiás, GO, Brasil	Domicílios	15°54'S, 50°08'W	4	4
<i>Rhodnius</i> sp.	Uruana, GO, Brasil	Domicílios	15°35'S, 49°41'W	1	1
<i>Rhodnius</i> sp.	Piracanjuba, GO, Brasil	Domicílios	17°18'S, 49°01'W	1	1
<i>Rhodnius</i> sp.	Cotriguaçu, MT, Brasil	Domicílios	09°52'S, 58°23'W	5	5
<i>Rhodnius</i> sp.	Ponte e Lacerda, MT, Brasil	Domicílios	15°13'S, 59°21'W	1	1
<i>Rhodnius</i> sp.	Cáceres, MT, Brasil	Domicílios	16°07'S, 57°36'W	1	1
<i>Rhodnius</i> sp.	Dourados, MS, Brasil	Domicílios	22°13'S, 54°47'W	7	6

^aPopulações silvestres. ^bColônia do Centro de Pesquisas René Rachou, CPqRR-FIOCRUZ, Minas Gerais. Espécimes de Uberaba foram coletados na localidade tipo de *R. neglectus*. ^cGerações F1 e F2; provavelmente *R. robustus* linhagem III segundo mapa biogeográfico apresentado por Abad-Franch & Monteiro (2007).

^dColônia do Laboratório de Investigações em Parasitologia Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colômbia.

3.3.2 Populações estudadas para a análise intra-específica de *Rhodnius neglectus*

Foram analisadas 684 asas e 672 cápsulas cefálicas de 23 populações de *Rhodnius neglectus* de quatro bacias hidrográficas brasileiras: Tocantins/Araguaia, São Francisco, Paraná e Paraguai. O número de asas e cápsulas cefálicas de machos e fêmeas está detalhado na Tabela 4. A identificação dos espécimes usados nas análises morfométricas foi realizada a partir de critérios morfológicos usando as chaves de identificação de Lent & Wygodzinsky (1979) e confirmada usando técnicas moleculares. Adicionalmente, os padrões cromáticos dos espécimes de todas as populações foram observados e documentados a partir de uma fotografia dorsal e outra ventral de pelo menos um espécime adulto de cada população. Todos os insetos analisados foram depositados no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

3.3.3 Morfometria geométrica

Os hemiélitros (asas anteriores) dos triatomíneos foram montados entre lâmina e lamínula com resina (Entellan[®]) e posteriormente escaneados (HP Scanjet 3670, 1200 dpi, escala de cinza) e separados por sexo, população e espécie. Seis marcos anatômicos do tipo I (intersecção das veias) e um do tipo II (ponto de máxima curvatura) (Bookstein 1991) foram digitalizados (Figura 4). As cápsulas cefálicas foram montadas em triângulos (montagem dupla) e fotografadas com uma câmera digital (Sony[®] Cyber-shot 5.1 Mp) adaptada a um estereomicroscópio NOVA[®] (aumento: 25x). Oito marcos anatômicos na cápsula cefálica (quatro do tipo I e quatro do tipo II) foram usados nas análises morfométricas (Figura 5). As coordenadas (x e y) de cada marco anatômico foram digitalizadas usando o programa *tpsDig* 1.18 (Rohlf 1999a).

Tabela 4. Código, bacia hidrográfica e número de asas e cápsulas cefálicas das populações de *Rhodnius neglectus* analisadas no estudo morfométrico.

Código ^a	Bacia hidrográfica	Asas ^b		Cápsulas cefálicas		nº total asas	nº total cápsulas cefálicas
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas		
AR	Tocantins/Araguaia	16	18	16	17	34	33
TG	Tocantins/Araguaia	17	12	14	16	29	30
AP	Tocantins/Araguaia	17	14	18	16	31	34
MA	Tocantins/Araguaia	17	14	14	16	31	30
CA	Tocantins/Araguaia	16	16	12	17	32	29
RA	Tocantins/Araguaia	15	16	15	16	31	31
NX	Tocantins/Araguaia	18	15	15	20	33	35
RC	Tocantins/Araguaia	15	16	12	15	31	27
MZ	Tocantins/Araguaia	14	13	12	13	27	25
GO	Tocantins/Araguaia	13	9	14	9	22	23
ST	São Francisco	10	13	5	7	23	12
SD	São Francisco	15	16	17	18	31	35
PN	São Francisco	16	14	15	18	30	33
MI	São Francisco	12	16	15	16	28	31
BO	São Francisco	14	14	6	12	28	18
CR	Paraná	14	14	9	15	28	24
CL	Paraná	14	16	13	21	30	34
UB	Paraná	16	15	15	17	31	32
IT	Paraná	17	15	20	13	32	33
BL	Paraná	16	16	18	15	32	33
QU	Paraná	16	11	14	11	27	25
DI	Paraguai	17	14	18	14	31	32
NS	Paraguai	17	15	15	19	32	34

^a Conforme Figura 3. ^b Asas direitas.

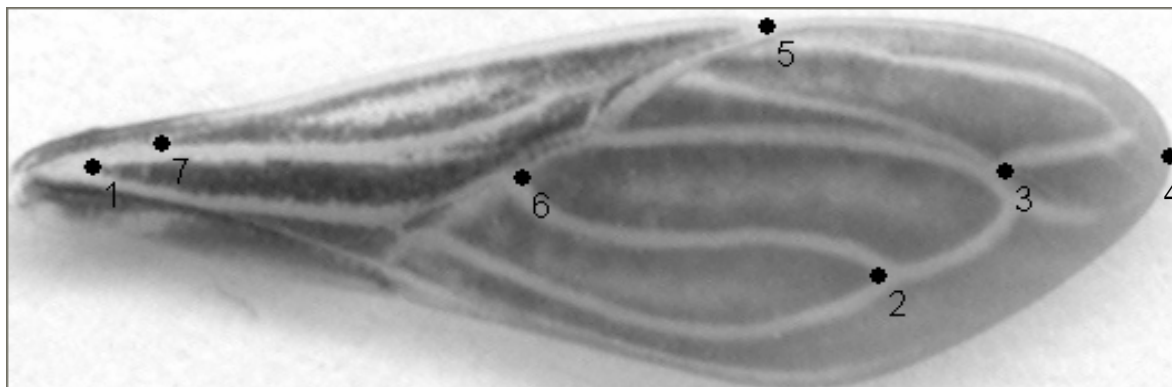


Figura 4. Asa direita de *Rhodnius neglectus* com sete marcos anatômicos usados nas análises morfométricas. De acordo com Bookstein (1991), o ponto 4 corresponde a um marco anatômico do tipo II (ponto de máxima curvatura) e os restantes são do tipo I (intersecção das veias).

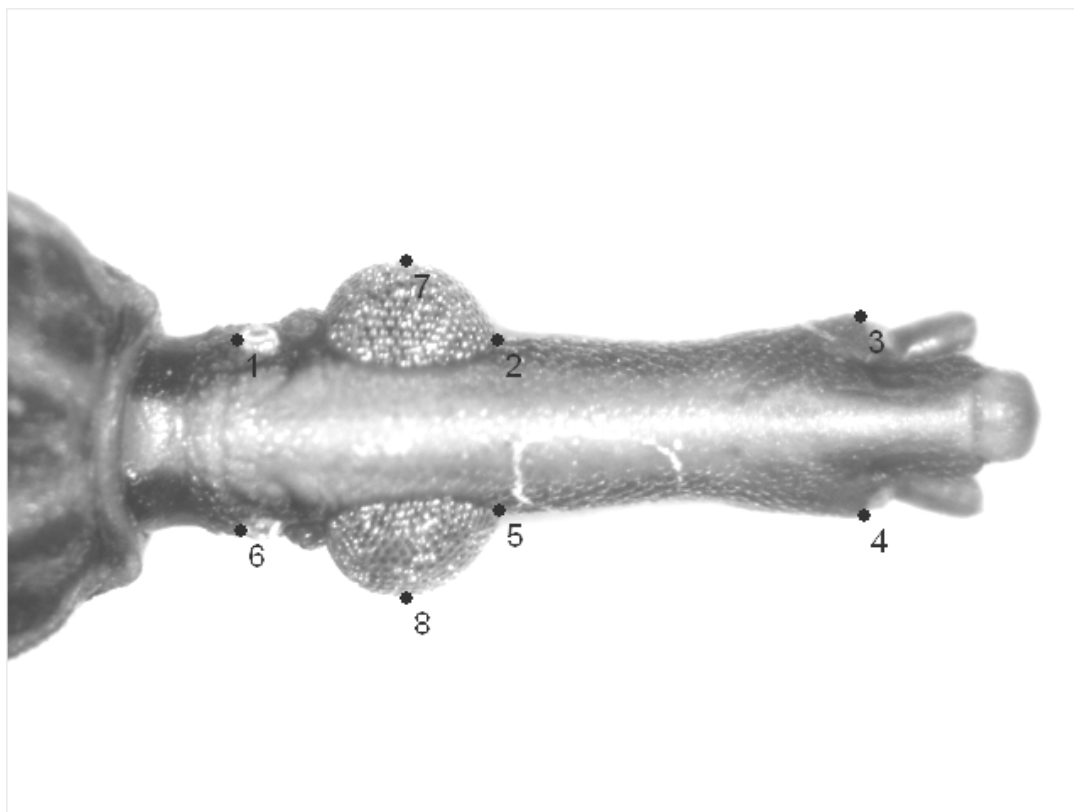


Figura 5. Cápsula cefálica de *Rhodnius prolixus* ilustrando os oito marcos anatômicos usados nas análises morfométricas. De acordo com Bookstein (1991), os pontos 1, 2, 5 e 6 são marcos anatômicos do tipo I (justaposição de tecidos) e os pontos 3, 4, 7 e 8 são marcos anatômicos do tipo II (pontos de máxima curvatura).

3.3.4 Variação de tamanho e forma

Para analisar a variação de tamanho de asas e cápsulas cefálicas dos espécimes foi usado um estimador de tamanho (tamanho do centróide – TC) derivado das coordenadas dos marcos anatômicos (Bookstein 1991). Os valores de TC foram extraídos da matriz de coordenadas de cada uma das estruturas dos espécimes (média das duas digitalizações de cada estrutura) usando o programa *tpsRelw* versão 1.18 (Rohlf 1999b) e foram transformados (logaritmo). As variáveis de forma foram obtidas usando a Análise Generalizada de Procrustes (Rohlf 1996). Primeiro, uma configuração consenso baseada na sobreposição das configurações geométricas de cada estrutura (asa ou cápsula cefálica) foi derivada da matriz de coordenadas usando o método de mínimos quadrados (Bookstein 1991). A configuração consenso representou a média entre os espécimes de todas as populações analisadas. Deformações parciais (localizadas) e componentes uniformes (deformações globais) foram posteriormente calculadas baseadas nas deformações de cada estrutura em relação à configuração consenso. Esses dois conjuntos de variáveis foram combinados em uma matriz W (Monteiro & Reis 1999), representando as variáveis de forma que descreveram a variação nas asas e cápsulas cefálicas das populações e espécies de *Rhodnius* analisadas. As variáveis de forma foram obtidas usando o programa *tpsRelw* 1.18 (Rohlf 1999b).

3.3.5 Variáveis ambientais usadas na análise de variação intra-específica em *Rhodnius neglectus*

As variáveis macroambientais (bacia hidrográfica, latitude, longitude e altitude), climáticas (temperatura máxima, temperatura mínima e precipitação do mês de janeiro) e microambientais (material de construção do ninho presente na bainha foliar da palmeira: gravetos ou folhas) (Tabela 2) foram relacionadas com o TC e com as variáveis de forma para testar a influência do ambiente na variação de tamanho e forma das populações. A densidade média de triatomíneos por palmeira também foi relacionada com TC.

3.3.6 Análises estatísticas

3.3.6.1 Identificação as espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*

A variação de tamanho (valores de TC de asas e cápsulas cefálicas) entre as populações foi analisada por ANOVA e pelo teste de Tukey ($p < 0,01$), sendo ilustrada por diagramas de caixas apresentando a média, o erro padrão e o desvio padrão. A homogeneidade das variáveis de forma (deformações parciais e componentes uniformes) nos grupos foi testada por MANOVA e posteriormente usadas em Análises de Funções Discriminantes (AFD) para estudar as diferenças de forma entre os grupos definidos *a priori* (Monteiro & Reis 1999). Na primeira análise foram exploradas as relações entre os ‘espécimes problema’ e as populações de referência de *R. prolixus* e *R. neglectus*. As variáveis de forma foram usadas para produzir um modelo discriminante em que *R. prolixus*, *R. neglectus* (espécimes silvestres de Tocantins e São Paulo e espécimes da FIOCRUZ) e a população de *Rhodnius* de Mambai-GO foram definidos como grupos *a priori*. As funções discriminantes geradas por esse modelo foram usadas para classificar *a posteriori* os indivíduos de identificação desconhecida (‘espécimes problema’) coletados em casas de cinco estados brasileiros. Os ‘espécimes problema’ que não foram classificados nos grupos acima foram incluídos em um segundo modelo discriminante com populações de *R. nasutus*, *R. robustus* e *R. neglectus* definidas *a priori*. Mapas fatoriais foram produzidos para mostrar a distribuição dos espécimes e populações no espaço de forma definido pelos dois primeiros fatores discriminantes. Para melhorar a clareza dos gráficos, polígonos convexos agrupando todos os espécimes dos grupos foram produzidos e os pontos dos espécimes do grupo foram removidos (exceto para os ‘espécimes problema’ cuja posição deveria ser avaliada).

A reclassificação dos espécimes nos grupos de origem foi verificada usando tabelas de contingência e a estatística Kappa (Landis & Koch 1977). Finalmente, foi analisada a contribuição do tamanho na variação da forma (**alometria**) usando regressão simples dos fatores discriminantes de forma contra os valores de TC de asas e de cápsulas cefálicas. AFD, ANOVA,

MANOVA, regressão, testes de Tukey foram computados com o programa Statistica[®] (StatSoft Inc. 1996) e a estatística Kappa foi computada com o programa JMP[®] (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.3.6.2 Variação morfométrica intra-específica em *Rhodnius neglectus*

A variação de tamanho (valores de TC de asas e cápsulas cefálicas) entre as populações e sexos foi avaliada por ANOVA e teste t respectivamente, sendo ilustrada em gráficos apresentando as médias e os intervalos de confiança (95%). Para avaliar a variação de TC entre os microhábitats também foi utilizado o teste t. A influência das outras variáveis ambientais no TC foi verificada usando regressão múltipla. Os valores das variáveis que apresentaram maior contribuição para a variação de tamanho foram plotados contra os valores de TC para ilustrar as relações entre essas variáveis.

As variáveis de forma resultantes da análise de deformações parciais (obtidas com o programa *tpsRelw*) foram usadas em análises multivariadas (Análise de Componentes Principais-ACP) para explorar a variação de forma entre as populações/bacias estudadas após a homogeneidade das variáveis de forma nos grupos ter sido testada por MANOVA. A distribuição dos espécimes das diferentes bacias hidrográficas no espaço de forma definido pelos dois primeiros componentes principais foi mostrada graficamente. Para melhorar a clareza dos gráficos, polígonos convexos agrupando todos os espécimes dos grupos foram produzidos e os pontos dos espécimes do grupo foram removidos. A contribuição do tamanho para a variação de forma (alometria) foi analisada usando regressão simples dos componentes principais de forma contra os valores de TC de asas e de cápsulas cefálicas. ACP, ANOVA, regressão e testes de média foram feitos com o programa Statistica[®] (StatSoft Inc. 1996).

3.4 Distribuição geográfica potencial

3.4.1 Obtenção dos registros de ocorrência de *Rhodnius neglectus*, palmeiras e aves

Os registros de ocorrência de *R. neglectus* foram obtidos de: i) dados de distribuição dos triatomíneos capturados em ambiente domiciliar pelo Programa de Controle da Doença de Chagas no período de 1975/83 (Silveira *et al.* 1984) e no período de 2000/2006 a partir de levantamentos realizados nas seções de Entomologia dos Laboratórios Centrais dos Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Tocantins, Bahia e Pernambuco (n=192 registros), ii) registros em ambiente silvestre provenientes de estudos publicados (Barretto & Carneiro 1968, Diotaiuti & Dias 1984, Bento *et al.* 1992, Teixeira *et al.* 2001, Emperaire & Romaña 2006) (n=12) e iii) registros de coleta de *R. neglectus* em palmeiras (*Mauritia flexuosa*) no Brasil georreferenciados entre 2003 e 2007 (n=37). As fontes i) e ii) descreviam apenas os nomes dos municípios; as coordenadas geográficas da sede do município foram obtidas a partir da base de dados dos municípios brasileiros do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (<http://www.ibge.gov.br>) usando o software ArcView[®] (ESRI 2004). A amplitude de distribuição (limites de ocorrência da espécie) de *R. neglectus* foi traçada unindo os registros de ocorrência extremos (em ambiente silvestre e doméstico). O mesmo procedimento foi usado para determinar a amplitude de distribuição baseada nos modelos de nicho ecológico. Ambos os mapas de amplitude de distribuição foram comparados com o apresentado por Carcavallo *et al.* (1999).

Mapas de distribuição geográfica de palmeiras (*Acrocomia aculeata*, *Attalea speciosa*, *Mauritia flexuosa* e *Syagrus oleracea*) e aves (*Phacellodomus ruber* e *Pseudoseisura cristata*) foram obtidos dos estudos de Lorenzi *et al.* (2004) e Ridgely *et al.* (2005), respectivamente. Estes mapas foram sobrepostos com os registros de ocorrência de *R. neglectus*. A escolha das espécies de palmeiras e aves foi baseada em registros de ocorrência e fontes alimentares de *R. neglectus* em ambiente silvestre (Diotaiuti & Dias 1984, Carcavallo *et al.* 1997, Gurgel-

Gonçalves *et al.* 2004, Gurgel-Gonçalves & Cuba 2007). Os mapas foram produzidos e editados usando o software ArcView[®] (ESRI 2004).

3.4.2 Modelagem de nicho ecológico

Os mapas de distribuição potencial foram produzidos usando o software DesktopGarp (Scachetti-Pereira 2002). As variáveis climáticas e de terreno foram obtidas do projeto Worldclim (<http://www.worldclim.org/>) descritas por Hijmans *et al.* (2005). Os índices de vegetação usados foram o NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), estimado a partir de dados do sensor AVHRR do satélite NOAA (<http://daac.gsfc.nasa.gov/avhrr/>) e a cobertura florestal, estimada a partir de imagens do satélite MODIS (<http://modis.gsfc.nasa.gov>). A base de dados ambientais utilizada nas análises com GARP cobre todo o território brasileiro, além de alguns países da América do Sul (Bolívia, Paraguai, Peru e parte da Argentina) apresentando uma resolução espacial de 2,5 minutos (5 x 5 km por pixel). Vinte e quatro variáveis foram usadas para construção dos modelos no DesktopGarp, entre elas altitude, temperatura (e.g. média diurna, máxima, mínima, anual, trimestral), precipitação (e.g. média anual, máxima, mínima, trimestral) e cobertura do terreno (NDVI e cobertura florestal) (Tabela 5). Registros de ocorrência de *R. neglectus* em palmeiras (n=37) foram usados para gerar os modelos de predição. A identificação da espécie nessas áreas foi baseada em parâmetros morfométricos e moleculares. Modelos baseados em mais de 20 pontos de ocorrência são considerados confiáveis, apresentando boa acurácia e sensibilidade (Anderson *et al.* 2003).

O GARP funciona em um processo iterativo de seleção, avaliação, teste e incorporação de regras, dividindo os registros de ocorrência em pontos de treino (usados para a construção do modelo) e pontos de teste (usados para testar o modelo). Um método é escolhido a partir de uma série de possibilidades (e.g. regressão logística, regras bioclimáticas) aplicadas aos pontos de treino. A capacidade de predição é avaliada a partir de 1250 pontos reamostrados considerando

as características ambientais dos pontos de teste em comparação com outros 1250 pontos aleatoriamente amostrados na região de estudo (Tosar *et al.* 2007)

Todas as análises foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros do software: 50% dos pontos para gerar o modelo e 50% para testá-lo; 20 replicações (*runs*); limite de convergência 0,01 e 1000 iterações (condições de parada para as iterações). Todas as regras foram utilizadas (*atomic*, *range*, *negated range* e *logistic regression*) (Stockwell & Peters 1999). A função *bestsubset* foi ativada para selecionar somente os 10 melhores modelos, sendo admitido 5% de erro de omissão (registros de ocorrência da espécie fora da área predita pelo modelo) e 40% de erro de sobreprevisão (áreas preditas pelo modelo em que não há registro de ocorrência conhecido). A escolha destes erros de omissão e sobreprevisão adicionou um componente conservador na predição do GARP, que poderia extrapolar muito as áreas potenciais (Anderson *et al.* 2003, Costa *et al.* 2007). A comparação entre o sucesso observado na predição da distribuição dos pontos de teste e o esperado aleatoriamente foi feita usando testes qui-quadrado. Os mapas gerados pelo modelo GARP foram importados para o programa ArcView® (ESRI 2004), sendo sobrepostos usando a função *Map Calculator* para gerar um único mapa de distribuição com um *ranking* de probabilidade de ocorrência.

Tabela 5. Descrição, origem e grupo das variáveis ambientais usadas na modelagem de nicho ecológico.

Variáveis ambientais	Descrição	Origem	Grupo
1. NDVI	Índice normalizado de vegetação	Imagem resultante de uma PCA com imagens mensais do período 1982 a 1992 (fonte: satélite NOAA)	Vegetação
2. Contfield	Porcentagem de cobertura florestal	Produto MODIS mostrando a porcentagem de cobertura florestal (fonte: MODIS, imagem de 2000)	Vegetação
3. Altitude	Modelo digital de terreno	Projeto Worldclim	Terreno
4. BIO1	Temperatura média anual	Projeto Worldclim	Clima
5. BIO2	Temperatura - Faixa média diurna [Média do mês*(Max – Min)]	Projeto Worldclim	Clima
6. BIO3	Isotermalidade (Bio2/Bio7)*100	Projeto Worldclim	Clima
7. BIO4	Sazonalidade da temperatura (DP * 100)	Projeto Worldclim	Clima
8. BIO5	Temperatura máxima no mês mais quente	Projeto Worldclim	Clima
9. BIO6	Temperatura mínima no mês mais frio	Projeto Worldclim	Clima
10. BIO7	Faixa anual da temperatura (Bio5-Bio6)	Projeto Worldclim	Clima
11. BIO8	Média da temperatura no trimestre mais úmido	Projeto Worldclim	Clima
12. BIO9	Média da temperatura no trimestre mais seco	Projeto Worldclim	Clima
13. BIO10	Média da temperatura no trimestre mais quente	Projeto Worldclim	Clima
14. BIO11	Média da temperatura no trimestre mais frio	Projeto Worldclim	Clima
15. BIO12	Precipitação media anual	Projeto Worldclim	Clima
16. BIO13	Precipitação no mês mais úmido	Projeto Worldclim	Clima
17. BIO14	Precipitação no mês mais seco	Projeto Worldclim	Clima
18. BIO15	Sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação)	Projeto Worldclim	Clima
19. BIO16	Precipitação no trimestre mais úmido	Projeto Worldclim	Clima
20. BIO17	Precipitação no trimestre mais seco	Projeto Worldclim	Clima
21. BIO18	Precipitação no trimestre mais quente	Projeto Worldclim	Clima
22. BIO19	Precipitação no trimestre mais frio	Projeto Worldclim	Clima
23. T. max.	Média anual da temperatura máxima	Projeto Worldclim	Clima
24. T. min.	Média anual da temperatura mínima	Projeto Worldclim	Clima

3.5 Estrutura genética e filogeografia

3.5.1 Populações estudadas

Os insetos analisados foram capturados em palmeiras (*M. flexuosa*) presentes em 33 áreas. Os indivíduos capturados foram identificados morfológicamente usando-se chaves descritas por Lent & Wygodzinsky (1979). Para as análises filogeográficas foram utilizados de 1 a 9 indivíduos de cada uma das populações *R. neglectus* (Tabela 6).

3.5.2 Extração, amplificação e seqüenciamento do DNA

A extração do DNA foi feita a partir da maceração de patas dos indivíduos fixados em álcool absoluto ou 70%, usando o kit de extração DneasyTM Tissue (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. Um fragmento do DNA mitocondrial (gene citocromo b) foi amplificado via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando os seguintes iniciadores: CYTB7432F, 5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTTATTATGGATC e CYTB7433R, 5'-ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG descritos por Monteiro *et al.* (2003). As reações de PCR seguiram o seguinte padrão: solução tampão 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,3; 50 mM de KCl e 1,5 mM de MgCl₂); dNTPs (0,2 mM); iniciadores CYTB7432F e CYTB7433R (10 mM/ μ l de cada); Taq polimerase (0,5 U; Phoneutria, BR) e 20-40 ng de DNA, totalizando 25 μ l de volume final. Os ciclos da reação foram: denaturação (94°C por 5 min), seguida de 35 ciclos de denaturação (94°C, 30 s), anelamento (50°C, 30 s) e extensão (72°C, 1 min); após a extensão final (72°C, 5 min) as amostras foram estocadas a 10°C. A amplificação foi confirmada usando eletroforese em gel de agarose (1%) com brometo de etídio, usando 4 μ l de produto de PCR e 3 μ l de tampão de carregamento. As reações foram consideradas positivas quando bandas de ~700 pb (detectadas usando marcador de peso molecular de 1 kb) foram detectadas.

Os produtos das PCRs foram purificados usando o kit Exo/SAP (enzimas 'Exonuclease I' e 'Shrimp Alkaline Phosphatase'). Esse procedimento foi usado para permitir uma leitura eficiente no seqüenciamento; a 'Exonuclease I' degrada qualquer excesso de primer do produto

amplificado enquanto a SAP age sobre os dNTPs da PCR original. A purificação foi feita a partir da seguinte reação: 1,0 U de EXO/SAP e 5,0 µl de produto PCR (90 min a 37°C seguido de 20 min a 80°C). Os produtos de PCR foram mantidos a -20°C até o uso. As reações de seqüenciamento foram realizadas usando o 'DYEnamic™ ET terminator cycle sequencing kit' (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia) seguindo o protocolo do fabricante.

As seqüências foram analisadas em um seqüenciador automatizado de DNA (ABI 377, Applied Biosystems), em condições padronizadas pelo fabricante. As duas fitas de cada fragmento amplificado foram seqüenciadas com os iniciadores acima descritos e comparadas com o auxílio do programa Seqscape v. 2.1 (Applied Biosystems, CA), que foi usado também para produzir a seqüência consenso, avaliar a qualidade dos eletroferogramas e editar as seqüências. Finalmente, as seqüências foram alinhadas usando o programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997).

3.5.3 Análise da estrutura genética

As seqüências alinhadas foram analisadas usando o programa MEGA versão 3.1 (Kumar, Tamura & Nei 2004) que forneceu as estatísticas básicas (composição nucleotídica, frequência de aminoácidos e número de sítios variáveis e informativos para parcimônia).

Para estudar a estrutura genética das populações de *R. neglectus* foi feita uma análise hierárquica da diversidade nucleotídica usando o programa Nucleodiv (Holsinger & Mason-Gamer 1996). Esse método usa um índice (G_{st}) que estima a proporção da diversidade genética entre as populações, construindo um dendrograma que possibilita a identificação do padrão hierárquico da estrutura genética dos dados. A topologia do dendrograma reflete os padrões de fluxo gênico entre as populações. Essa análise permite detectar os padrões de estrutura genética entre as populações sem a necessidade de apresentar uma hipótese de agrupamento prévia. A significância dos valores de G_{st} de cada nó do dendrograma é testada comparando os valores observados com os valores gerados a partir de um modelo de distribuição aleatória após reamostragem (1000 réplicas).

Foi realizada também uma análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) para analisar a variabilidade genética intra e interpopulacional de *R. neglectus* e testar a hipótese de diferenciação entre populações a partir do índice de fixação (θ), relacionado à estatística F_{ST} de Wright. Adicionalmente, foram estimados os índices de diversidade genética das populações (número de haplótipos, diversidade nucleotídica - π , diversidade haplotípica - h e número médio de diferenças nucleotídicas entre populações pelo modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros). Essa análise foi feita utilizando o programa Arlequin v2.2.2 (Schneider *et al.*, 2000).

3.5.4 Análise filogeográfica

A relação genética entre os haplótipos de *R. neglectus* foi descrita por meio de uma rede de haplótipos gerada pelo método ‘median-joining’ (Bandelt *et al.* 1999) no programa Network (Forster *et al.* 2000). Utilizando o critério de parcimônia, o programa encontra os vetores medianos, que representam a seqüência consenso entre as seqüências mais próximas àquele vetor, interpretados biologicamente como seqüências que não foram amostradas ou seqüências de ancestrais extintos (‘median vectors’). Para esta análise, os caracteres (sítios) tiveram pesos iguais.

Utilizando o modelo de ilhas com equilíbrio entre mutação e deriva (Wright 1943), também foi estimado o fluxo gênico entre pares de populações (Nm – número de migrantes por geração) a partir da estimativa do índice de fixação (θ). Finalmente, para testar a hipótese de que as mutações observadas nas seqüências de citocromo b das populações de *R. neglectus* são seletivamente neutras foram utilizados os teste de Tajima (1989) e Fu (1997) implementados no programa Arlequin v2.2.2 (Schneider *et al.* 2000). Esses testes também foram usados para detectar evidências de seleção ou ‘bottleneck’ (efeito gargalo de garrafa) e grandes mudanças populacionais; valores negativos significativos do teste de Fu indicam excesso de mutações recentes e rejeitam a hipótese de neutralidade.

O programa DNASP (Rozas *et al.* 2003) foi usado para analisar a distribuição do número de diferenças entre pares de haplótipos ('Mismatch distribution') testando a hipótese de expansão populacional; populações em equilíbrio demográfico por longos períodos geralmente exibem distribuição multimodal, mas se as populações apresentam distribuição unimodal é um indicativo de expansão populacional recente (Rogers & Harpending 1992). Adicionalmente, foi realizado o teste de Mantel para verificar a relação entre as distâncias genéticas e geográficas e testar a hipótese de isolamento por distância. Esta análise foi feita utilizando o programa Arlequin v2.2.2 (Schneider *et al.*, 2000).

3.5.4 Análise filogenética

Métodos baseados em distâncias genéticas e em parcimônia foram utilizados para realizar as análises filogenéticas de *R. neglectus* e outras espécies do grupo *R. prolixus*. No caso de *R. neglectus*, apenas um representante de cada haplótipo foi incluído nas análises. As seqüências de outras espécies e linhagens de *Rhodnius* (Tabela 6) foram obtidas com a colaboração dos Drs. Fernando Abad-Franch (FIOCRUZ-AM) e Fernando Monteiro (FIOCRUZ-RJ).

A **árvore filogenética** de distância genética foi construída baseada no modelo Kimura 2 parâmetros (K2-p, Kimura 1980) usando o algoritmo de agrupamento de vizinhos 'neighbour-joining' (NJ, Saitou & Nei 1987) implementado no programa MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.* 2004). O suporte estatístico foi estimado usando o método de 'bootstrap' (Felsenstein, 1985) com 1000 pseudoréplicas. Os **cladogramas** foram construídos a partir de análises de parcimônia usando o programa PAUP 4.0b 10 (Swofford 1998) e com o algoritmo de busca 'branch-and-bound'. Este algoritmo realiza uma procura inicial para obter uma árvore próxima do ótimo e o escore dessa árvore é usado como limite superior para corte (Hendy & Penny 1982). Nestas análises *R. pictipes* foi considerado como **grupo externo**. Os dados obtidos nas análises de parcimônia foram: i) comprimento das árvores, ii) **índices de consistência (IC)** e **retenção (IR)** e iii) grau de suporte de 'bootstrap' com 1000 pseudoréplicas e considerando valores maiores que 75% bem suportados (Hillis & Bull, 1993).

Tabela 6. Espécie, código, bacia hidrográfica e número de seqüências das populações de *Rhodnius* analisadas no estudo filogeográfico e filogenético.

Espécie	Código^a	Bacia hidrográfica	Número de seqüências
<i>R. neglectus</i>	AP	Tocantins	7
<i>R. neglectus</i>	AR	Tocantins	5
<i>R. neglectus</i>	CA	Tocantins	9
<i>R. neglectus</i>	CO	Tocantins	1
<i>R. neglectus</i>	GO	Tocantins	1
<i>R. neglectus</i>	MA	Tocantins	8
<i>R. neglectus</i>	PA	Tocantins	5
<i>R. neglectus</i>	PO	Tocantins	2
<i>R. neglectus</i>	RA	Tocantins	7
<i>R. neglectus</i>	RC	Tocantins	1
<i>R. neglectus</i>	TG	Tocantins	7
<i>R. neglectus</i>	TZ	Tocantins	4
<i>R. neglectus</i>	ML	Tocantins	7
<i>R. neglectus</i>	NX	Tocantins	1
<i>R. neglectus</i>	BO	São Francisco	5
<i>R. neglectus</i>	CP	São Francisco	5
<i>R. neglectus</i>	MI	São Francisco	6
<i>R. neglectus</i>	SD	São Francisco	6
<i>R. neglectus</i>	SJ	São Francisco	2
<i>R. neglectus</i>	ST	São Francisco	6
<i>R. neglectus</i>	AC	Paraná	2
<i>R. neglectus</i>	AL	Paraná	3
<i>R. neglectus</i>	AO	Paraná	2
<i>R. neglectus</i>	BL	Paraná	6
<i>R. neglectus</i>	CL	Paraná	8
<i>R. neglectus</i>	CR	Paraná	6
<i>R. neglectus</i>	IB	Paraná	4
<i>R. neglectus</i>	IT	Paraná	5
<i>R. neglectus</i>	UB	Paraná	6
<i>R. neglectus</i>	AG	Paraguai	1
<i>R. neglectus</i>	DI	Paraguai	3
<i>R. neglectus</i>	PL	Paraguai	1
<i>R. neglectus</i>	NS	Paraguai	2
<i>R. robustus</i> I	robI	Orinoco ^b	1
<i>R. robustus</i> II	robII	Amazônica ^b	1
<i>R. robustus</i> III	robIII	Amazônica ^b	1
<i>R. robustus</i> IV	robIV	Amazônica ^b	1
<i>R. prolixus</i>	pro	Orinoco ^b	1
<i>R. nasutus</i>	nas	? ^c	1
<i>R. pictipes</i>	pic86	? ^c	1

^a Siglas das populações de *R. neglectus* conforme Figura 3. As outras siglas são abreviações dos haplótipos das outras espécies de *Rhodnius* obtidas com a colaboração dos Drs. Fernando Abad-Franch (FIOCRUZ-AM) e Fernando Monteiro (FIOCRUZ-RJ).^b Segundo Monteiro *et al.* (2003). ^c Origem geográfica desconhecida.

4. Resultados

4.1 Identificação das espécies de *Rhodnius* que ocorrem em palmeiras e casas no Brasil central

4.1.1 Variação de tamanho

Como esperado, diferenças de tamanho entre os sexos foram observadas. Asas e cápsulas cefálicas de fêmeas foram significativamente maiores que as de machos. O tamanho da asa foi maior em *R. robustus* e menor em *R. nasutus*. O tamanho da cápsula cefálica foi muito menor em *R. prolixus* quando comparado com outras espécies e populações analisadas (Figura 6). Essas diferenças foram estatisticamente significativas entre as asas (Machos: ANOVA $F_{4,61} = 41,5$; $p < 0.01$; Fêmeas: ANOVA $F_{4,65} = 43,3$; $p < 0.01$) e principalmente cápsulas cefálicas (Machos: ANOVA $F_{4,76} = 102,3$; $p < 0.01$; Fêmeas: ANOVA $F_{4,75} = 98,6$; $p < 0.01$) das espécies e populações de *Rhodnius*. As cápsulas cefálicas e asas de *R. neglectus* de Taguatinga-TO foram maiores em média que as de Buritizal-SP, mas essa diferença não foi significativa.

4.3.2. Variação de forma e alometria

Os mapas fatoriais de asas e cápsulas cefálicas revelaram diferenças claras entre os espécimes problema e a população de *R. prolixus* de referência (Figura 7). Os espécimes problema de Goiás (incluindo a população de Mambaí), Minas Gerais e Mato Grosso do Sul foram indistinguíveis das populações de referência de *R. neglectus*. Alguns espécimes de Tocantins e Mato Grosso foram também identificados como *R. neglectus*, enquanto outros foram significativamente diferentes de *R. neglectus* e *R. prolixus*. Os valores de reclassificação baseados na AFD foram altos para as variáveis de forma de asa e cápsula cefálica. Todos os *R. prolixus* foram corretamente reclassificados, enquanto os espécimes de Mambaí e *R. neglectus* frequentemente mudaram de grupos (Tabela 7).

As diferenças de forma de cápsulas cefálicas e asas entre *R. neglectus* e *R. prolixus* foram visíveis. Cápsulas cefálicas de *R. neglectus* apresentaram forma estreita e alongada quando

comparadas com as de *R. prolixus*. Adicionalmente, olhos maiores foram observados em *R. prolixus*. As diferenças na forma da asa foram observadas analisando a posição relativa dos marcos anatômicos 6 (ápice da asa anterior), 7 (veia média), e 1 (veia subcosta) (Figura 7). A regressão múltipla dos fatores discriminantes (variação de forma) contra o TC não revelou tendências alométricas para asas ($R^2=0,004$; $p=0,84$), mas alometrias foram observadas analisando a forma da cápsula cefálica ($R^2=0,45$; $p<0,01$).

Os mapas fatoriais derivados da segunda análise discriminante (comparando populações de *R. neglectus* com *R. robustus* e *R. nasutus*) mostraram que *R. neglectus* e *R. robustus* ocorrem simpatricamente nos estados de Tocantins e Mato Grosso (Figura 8). *R. neglectus* também foi a única espécie encontrada em casas de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. Nessas análises os valores de reclassificações corretas foram muito altos para asas e cápsulas cefálicas (Tabela 8). A regressão múltipla revelou alometria relacionada ao primeiro fator discriminante ($p<0,01$); o tamanho explicou 18% da variação de forma da asa e 19% da cápsula cefálica. Em relação à variação de forma, o ápice de asa (marco anatômico 4) ficou mais distante do final da veia cubital (marco anatômico 2) em *R. robustus* quando comparado com *R. neglectus*. A posição relativa dos marcos anatômicos 1 e 7 também foi importante na discriminação dessas espécies. Adicionalmente *R. robustus* apresentou olhos maiores que *R. neglectus* (Figura 8).

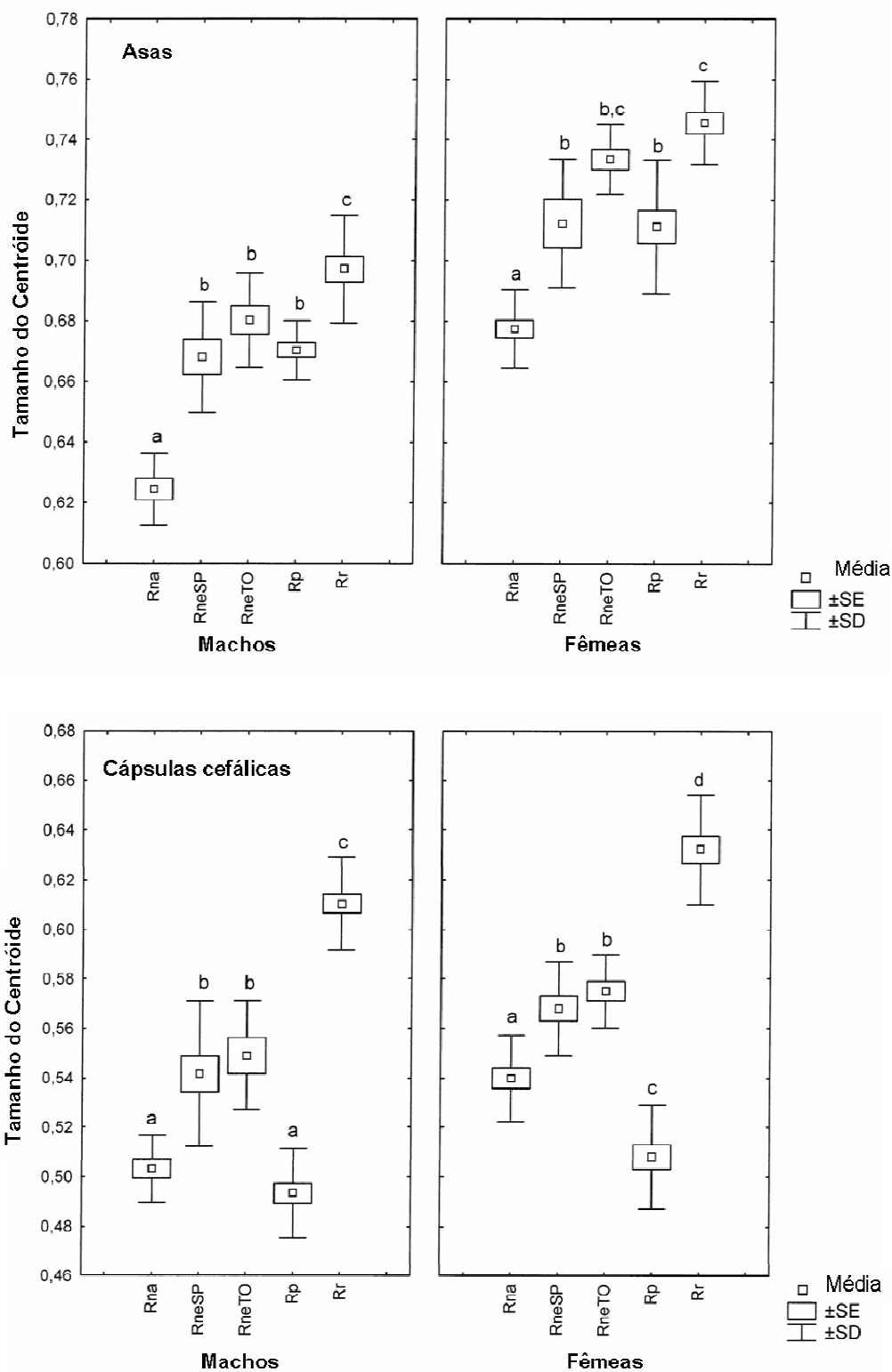


Figura 6. Variação do tamanho do centróide de asas e cápsulas cefálicas entre sexos e populações de *Rhodnius*. Os diagramas de caixas mostram a média, o erro padrão e o desvio padrão para cada população. Legenda: Rna (*R. nasutus* Ceará), RneSP (*R. neglectus* São Paulo), RneTO (*R. neglectus* Tocantins), Rp (*R. prolixus*) e Rr (*R. robustus*). Letras acima de cada diagrama de caixa indicam populações estatisticamente diferentes usando o teste de Tukey ($p < 0,01$).

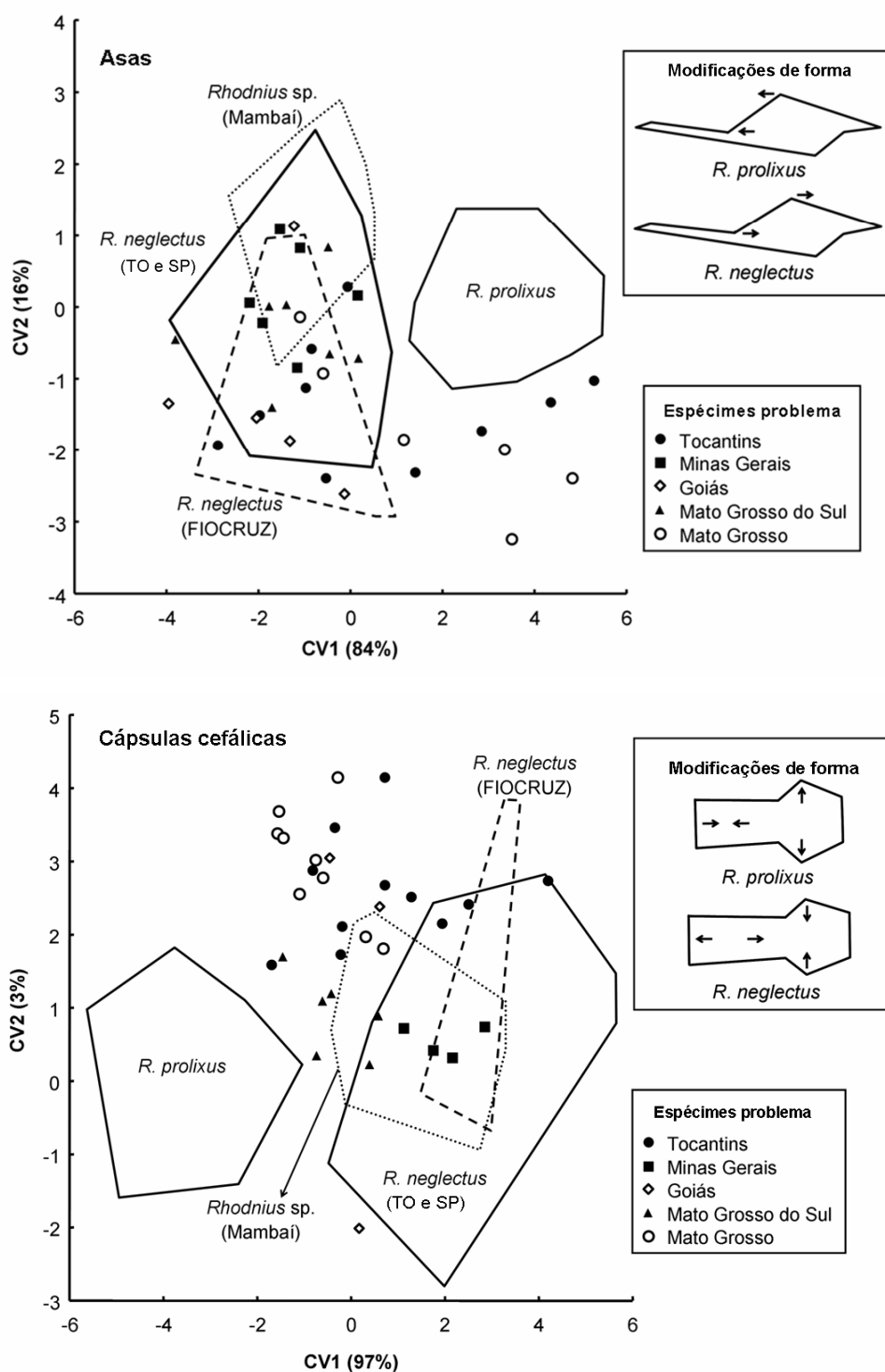


Figura 7. Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma (CV1 e CV2) de asas e cápsulas cefálicas, mostrando a distribuição dos espécimes das populações de *Rhodnius neglectus* e *R. prolixus*. Os polígonos correspondem aos grupos analisados no modelo discriminante. Os símbolos representam a origem dos espécimes de *Rhodnius* capturados nas casas. A porcentagem de contribuição de cada fator discriminante está entre parênteses. As figuras ao lado dos mapas fatoriais representam a configuração consenso das asas e cápsulas cefálicas de *R. prolixus* e *R. neglectus*. As setas indicam as modificações de forma.

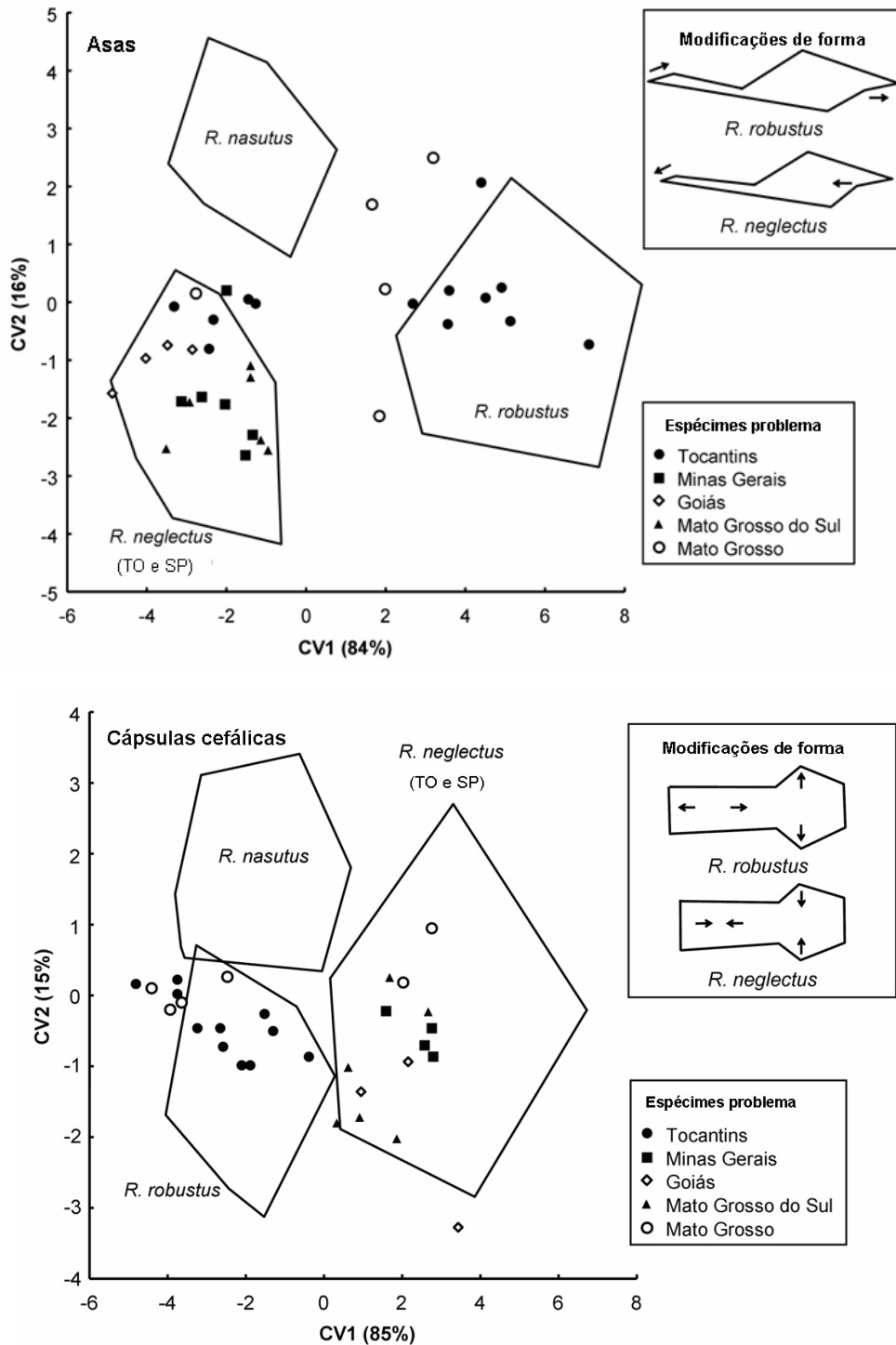


Figura 8. Mapas fatoriais baseados nos dois fatores discriminantes da variação de forma (CV1 e CV2) de asas e cápsulas cefálicas, mostrando a distribuição dos espécimes das populações de *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus* e *R. robustus*. Os polígonos correspondem aos grupos analisados no modelo discriminante. Os símbolos representam a origem dos espécimes de *Rhodnius* capturados nas casas. A porcentagem de contribuição de cada fator discriminante está entre parênteses. As figuras ao lado dos mapas fatoriais representam a configuração consenso das asas e cápsulas cefálicas de *R. robustus* e *R. neglectus*. As setas indicam as modificações de forma.

Tabela 7. Percentagem de reclassificações corretas de asas e cápsulas cefálicas de *Rhodnius neglectus*, *R. prolixus* e *Rhodnius* sp. de Mambai (Goiás, Brasil) após a análise discriminante com as variáveis de forma.

Grupos	Asas			Cápsulas cefálicas				% reclassificações corretas	
	<i>R. neglectus</i>	<i>R. prolixus</i>	<i>Rhodnius</i> sp. ^a	% reclassificações corretas		<i>R. neglectus</i>	<i>R. prolixus</i>		<i>Rhodnius</i> sp. ^a
<i>R. neglectus</i>	36	0	4	90	50	0	4	92	
<i>R. prolixus</i>	0	32	0	100	0	37	0	100	
<i>Rhodnius</i> sp. ^a	4	0	15	79	14	0	7	33	
Kappa ^b	0,86			0,85					

R. = *Rhodnius*. ^aPopulação de Mambai (Goiás, Brasil) (ver detalhes no texto). ^bKappa: medida de concordância entre a classificação esperada e observada; de 0,81 a 1 a classificação é quase perfeita; de 0 a 0,2 a concordância é fraca. Entre 0,21 e 0,40 o resultado é imparcial e entre 0,41 e 0,80 é substancial (Landis & Koch 1977).

Tabela 8. Porcentagem de reclassificações corretas de asas e cápsulas cefálicas de *Rhodnius neglectus*, *R. robustus* e *R. nasutus* após a análise discriminante com as variáveis de forma.

Grupos	Asas			Cápsulas cefálicas			% reclassificações corretas	
	%			%				
	<i>R. neglectus</i>	<i>R. nasutus</i>	<i>R. robustus</i>	reclassificações corretas	<i>R. neglectus</i>	<i>R. nasutus</i>		<i>R. robustus</i>
<i>R. neglectus</i>	39	1	0	97	52	1	1	96
<i>R. nasutus</i>	30	0	0	100	0	28	2	93
<i>R. robustus</i>	0	0	34	100	0	1	40	96
Kappa ^a	0,98			0,95				

R. = Rhodnius. ^aKappa: medida de concordância entre a classificação esperada e observada; de 0,81 a 1 a classificação é quase perfeita; de 0 a 0,2 a concordância é fraca. Entre 0,21 e 0,40 o resultado é imparcial e entre 0,41 e 0,80 é substancial (Landis & Koch 1977).

4.2 Variabilidade fenotípica das populações de *Rhodnius neglectus*

4.2.1 Variação de tamanho

Um dimorfismo sexual consistente foi observado nas análises de variação de Tamanho do Centróide (TC): asas de fêmeas ($TC_F=0,71\pm 0,02$) foram significativamente maiores que as de machos ($TC_M=0,67\pm 0,02$) (teste $t_{681}=-24,5$; $p<0,001$). Para cápsula cefálica o resultado foi semelhante ($TC_F=0,56\pm 0,03$; $TC_M=0,53\pm 0,03$) (teste $t_{672}=-14,5$; $p<0,01$). Houve diferença significativa de tamanho entre asas (ANOVA $F_{22,658}=6,6$; $p<0,01$) e, principalmente, cápsulas cefálicas (ANOVA $F_{22,651}=14,1$; $p<0,01$) das populações de *R. neglectus*, com uma tendência de diminuição de tamanho dos espécimes nas populações localizadas em áreas mais frias (Figura 9). Por exemplo, as asas e cápsulas cefálicas de insetos coletados em Cabeceiras foram claramente menores que as de São Desidério (Figura 10).

Não foi observada influência do microhabitat no tamanho dos espécimes de *R. neglectus*; os valores de TC nas palmeiras com ninhos de gravetos não foram estatisticamente diferentes dos observados nas palmeiras com ninhos de folhas para cápsulas cefálicas ($t_{590}=1,21$; $p=0,23$) e asas ($t_{392}=1,19$; $p=0,23$). Foi observada influência das variáveis ambientais analisadas no TC de cápsulas cefálicas ($R^2=0,160$; $p<0,01$); a temperatura foi a variável mais importante na correlação múltipla. Resultados similares foram obtidos analisando as asas, porém com coeficiente de determinação menor ($R^2=0,097$; $p<0,01$). Os maiores espécimes de *R. neglectus* foram coletados em áreas com maiores temperaturas (Figura 11). Finalmente, o tamanho do centróide de asas e cápsulas cefálicas também variou de acordo com a densidade de insetos por palmeira, porém não de forma linear; espécimes grandes foram observados tanto em condições de alta como de baixa densidade (Figura 12).

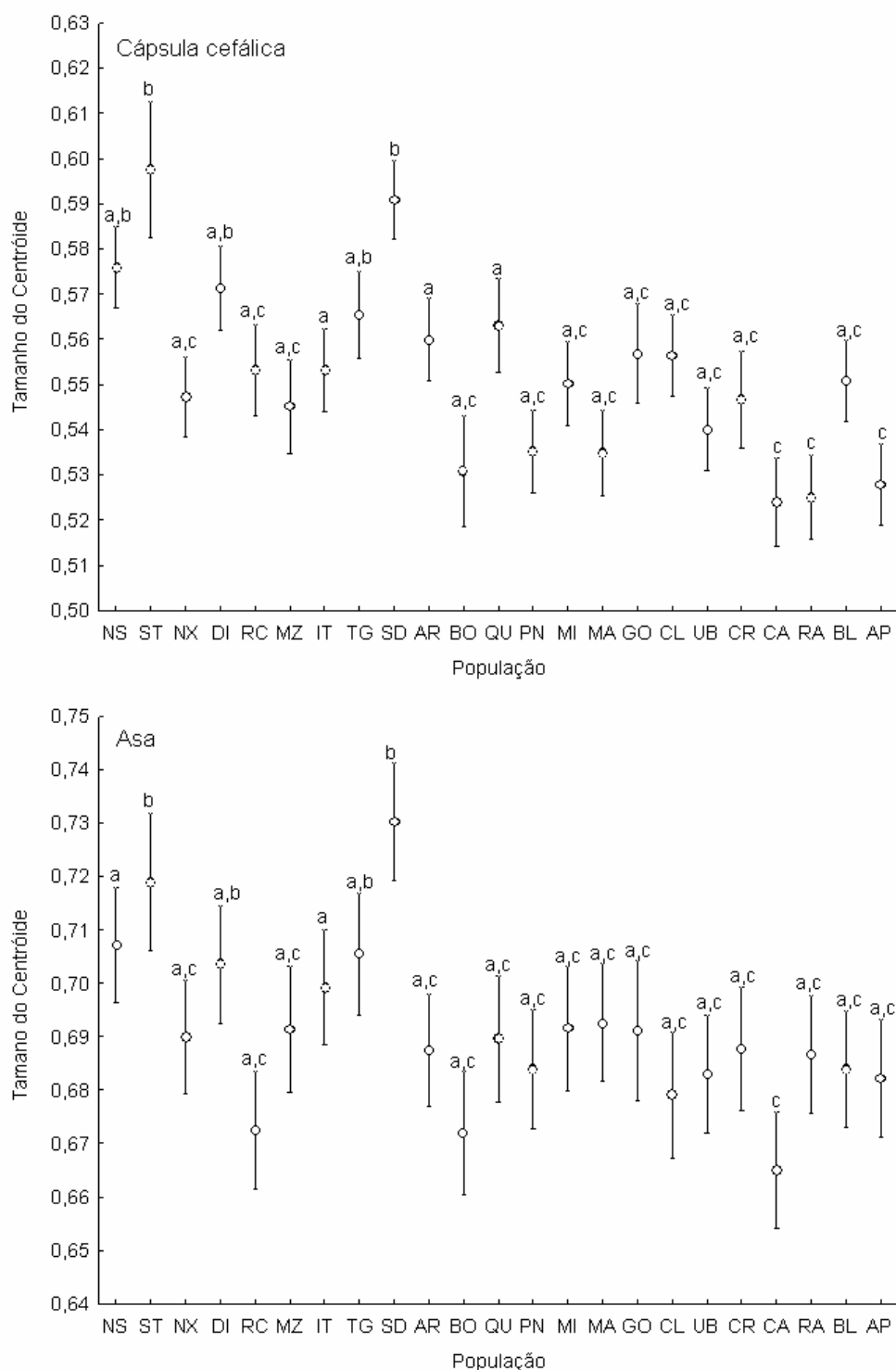


Figura 9. Variação do tamanho do centróide de cápsulas cefálicas e asas entre populações de *Rhodnius neglectus*. Os círculos abertos representam a média e as linhas os intervalos de confiança (95%) para cada uma das populações, organizadas em um gradiente de temperatura (de acordo com os valores de temperatura máxima, ver Tabela 2). Legenda: NS (Nossa Senhora do Livramento-MT), ST (Santa Rita de Cássia-BA), NX (Nova Xavantina-MT), DI (Diamantino-MT), RC (Riberão Cascalheira-MT), MZ (Mozarlândia-GO), IT (Ituiutaba-MG), TG (Taguatinga-TO), SD (São Desidério-BA), AR (Araguaína-TO), BO (Buritizeiro-MG), QU (Quirinópolis-GO), PN (Parque Nacional Cavernas do Peruaçu), MI (Mirabela-MG), MA (Mambaí-GO), GO (Cidade de Goiás-GO), CL (campo Alegre-GO), UB (Uberlândia-MG), CR (Cristalina-GO), CA (Cabeceiras-GO), RA (Rajadinha, Planaltina-DF), BL (Buritizal-SP) e AP (Alto Paraíso-GO). Populações marcadas com letras diferentes foram estatisticamente diferentes usando teste de Tukey ($p < 0,01$).

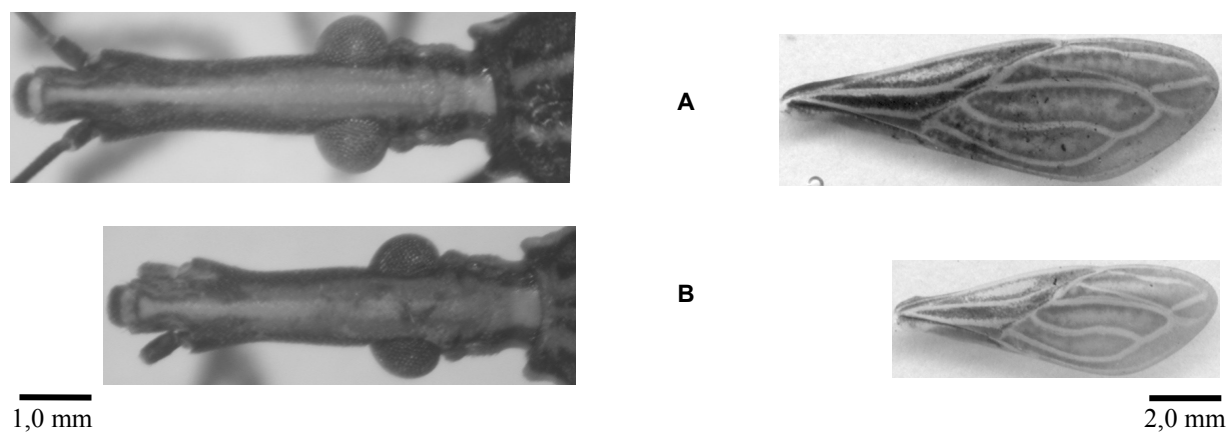


Figura 10. Variação do tamanho de asas e cápsulas cefálicas entre duas populações de *Rhodnius neglectus*. A. São Desidério-BA. B. Cabeceiras-GO.

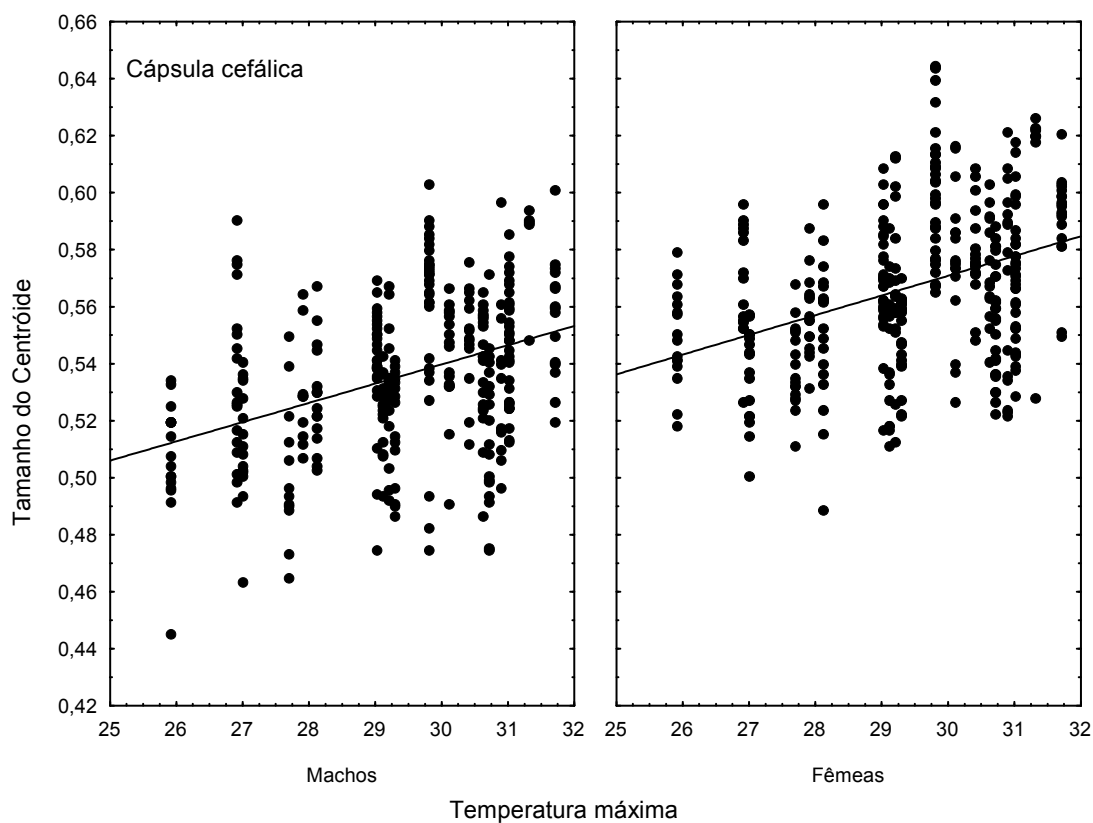


Figura 11. Relações entre o tamanho do centróide de cápsulas cefálicas de machos e fêmeas de *Rhodnius neglectus* e temperatura máxima nas áreas de coleta. Fêmeas: $y=0,068x+0,36$; $R^2=0,147$; $n=352$; $p<0,01$. Machos: $y=0,068x+0,33$; $R^2=0,146$; $n=322$; $p<0,01$.

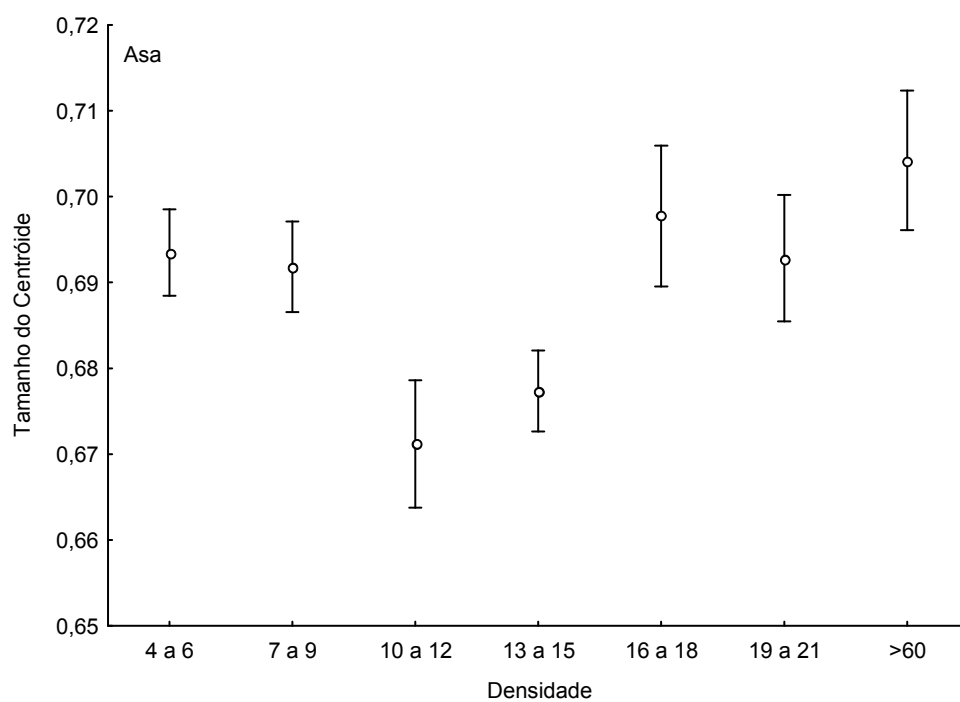


Figura 12. Variação do tamanho de asas de espécimes de *Rhodnius neglectus* de acordo com a densidade de triatomíneos por palmeira. Os pontos representam os valores médios para cada categoria de densidade e as linhas o intervalo de confiança (95%).

4.2.2 Variação de Forma

As análises de componentes principais (ACPs) usando as variáveis de forma de asas e cápsulas cefálicas não mostraram diferenças entre machos e fêmeas; dessa forma, todas as análises seguintes foram feitas agrupando os sexos, aumentando o tamanho da amostras/populações e o poder estatístico. As ACPs com as variáveis de forma de asas e cápsulas cefálicas não mostraram agrupamentos populacionais bem estruturados. Juntos, os componentes principais 1 e 2 (PC1 e PC2) explicaram quase 70% da variação total de forma de cápsula cefálica e 45% da variação total de forma de asa. Também não foram observadas divergências de forma entre as populações de diferentes bacias hidrográficas, que apresentaram grande sobreposição nos mapas fatoriais (Figura 13). Na análise da forma da cápsula cefálica PC1, explicou 52,9% da variação de forma e foi relacionado com o alongamento da região anteocular, que variou entre as populações de uma mesma bacia (ANOVA $F_{22,651}=21,9$; $p<0,01$). As populações de Araguaína-TO, São Desidério-BA e Santa Rita de Cássia-BA apresentaram os maiores valores de PC1 e região anteocular mais alongada (Figura 14). PC2 foi relacionado com o alongamento da região pós-ocular, explicando 15,4% da variação de forma. Esse componente principal também variou entre as populações (ANOVA $F_{22,651}=5,4$; $p<0,01$), porém de forma mais discreta; as populações de Alto Paraíso-GO e Rajadinha-DF apresentaram altos valores de PC2, com cápsulas cefálicas possuindo região pós-ocular mais alongada (Figura 14).

A forma da asa também apresentou variação significativa (PC1: ANOVA $F_{22,658}=6,4$; $p<0,01$; PC2: ANOVA $F_{22,658}=4,2$; $p<0,01$; Figura 15); porém, os valores foram menores que na análise de cápsulas cefálicas. PC1 foi relacionado com a posição relativa dos pontos 2 e 3 (ver Figura 4 com marcos anatômicos), ou seja, a veia de ligação das veias cubital e média; valores negativos foram associados a asas com veias de ligação mais curtas e valores positivos a asas com veias de ligação mais longas. Esse fator explicou 25,6% da variação de forma de asas; as populações de Buritizal-SP, São Desidério-BA e Ituiutaba-MG apresentaram maiores valores de

PC1 (Figura 15). PC2 explicou 19,5% da variação de forma, estando relacionado com a posição relativa do ponto 5 (ver Figura 4), o encontro da veia radial com a subcosta; nas asas com valores negativos o encontro ocorreu numa região mais posterior da asa e nas asas com valores positivos esse encontro ocorreu mais anteriormente, promovendo um encurtamento da asa. As populações de Cabeceiras-GO e Rajadinha-DF apresentaram os maiores valores de PC2 (Figura 15).

4.2.3 Alometrias

Não foram observados grandes efeitos alométricos nas análises de regressão entre as variáveis de forma e o TC analisando as asas (PC1: $R^2=0,007$; $p=0,03$; PC2: $R^2=0,012$; $p=0,01$). Para cápsulas cefálicas os coeficientes de determinação foram significativos somente para PC1 (PC1: $R^2=0,057$; $p<0,01$; PC2: $R^2<0,01$; $p=0,85$); 5,7% da variação de forma de cápsula cefálica foi explicada pelo tamanho, mostrando que a forma dessa estrutura é mais influenciada pelo tamanho, quando comparada com a forma da asa.

4.2.4 Variação cromática

Nenhuma população de *R. neglectus* analisada apresentou espécimes melânicos, como já observado para *R. nasutus* (Dias 2007). A mancha clara ventral longitudinal descrita por Lent (1954) apresentou variação: em algumas populações não esteve presente (e.g. Aporé-GO), sendo a região ventral escura; em outras estava bem marcada (e.g. Rajadinha-DF) ou pouco marcada (e.g. Araguaína-TO). A coloração geral do corpo também variou de castanho escuro (com patas apresentando coloração uniforme) a castanho claro (com patas apresentando coxas, trocânteres e articulação fêmur/tíbia mais claros) (Figura 16).

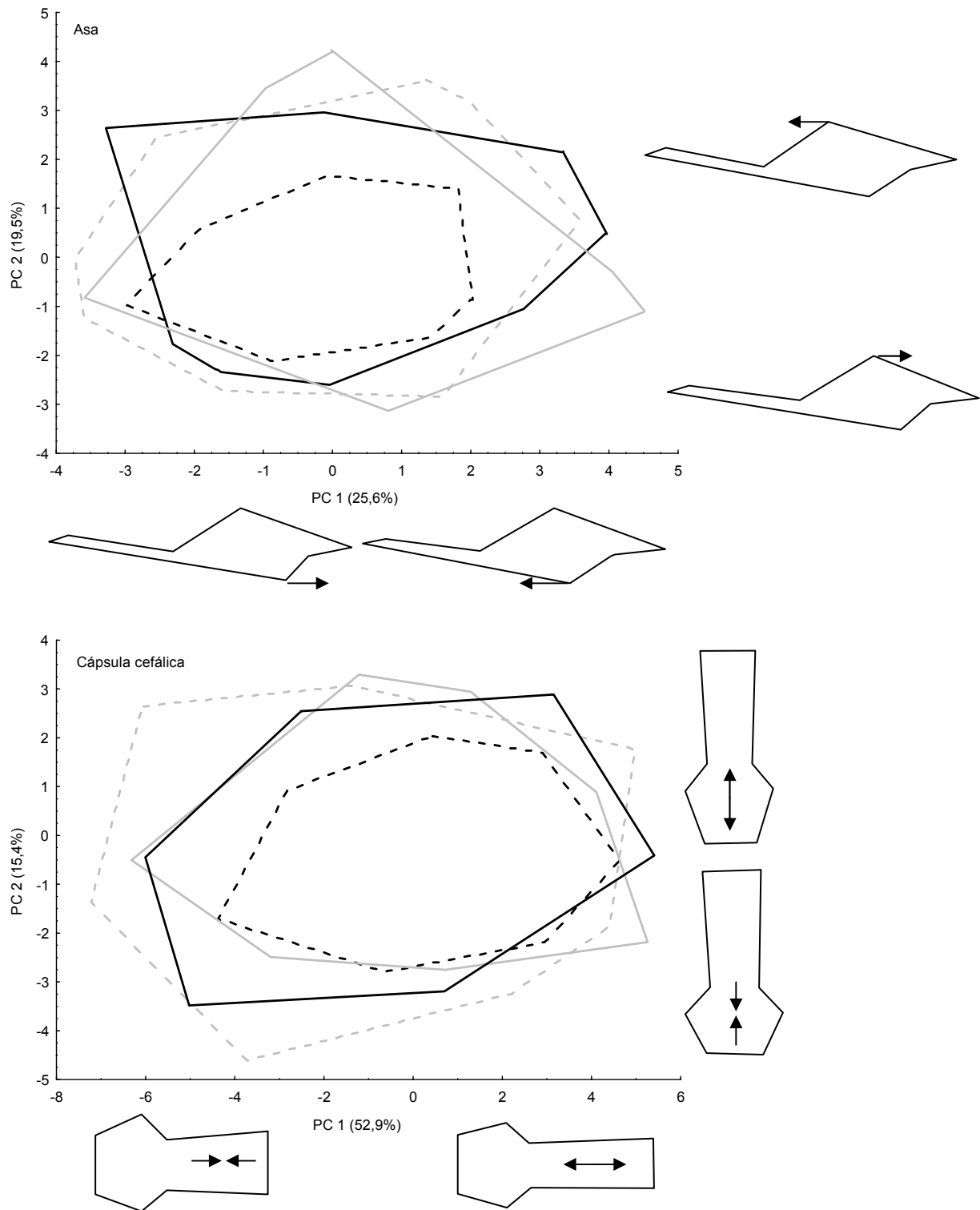


Figura 13. Mapas fatoriais mostrando a variação de forma de cápsulas cefálicas e asas de populações de *Rhodnius neglectus* de diferentes bacias hidrográficas. Para cada mapa, os eixos representam os componentes principais 1 e 2 derivados da análise multivariada das deformações parciais. Os polígonos correspondem às diferentes populações estudadas: São Francisco (linha preta contínua), Paraguai (linha preta pontilhada), Paraná (linha cinza contínua) e Tocantins (linha cinza pontilhada). A forma esperada para cápsula cefálica e asa associada a valores mínimos (negativos) e máximos (positivos) de PC1 e PC2 está representada abaixo e ao lado de cada mapa fatorial.

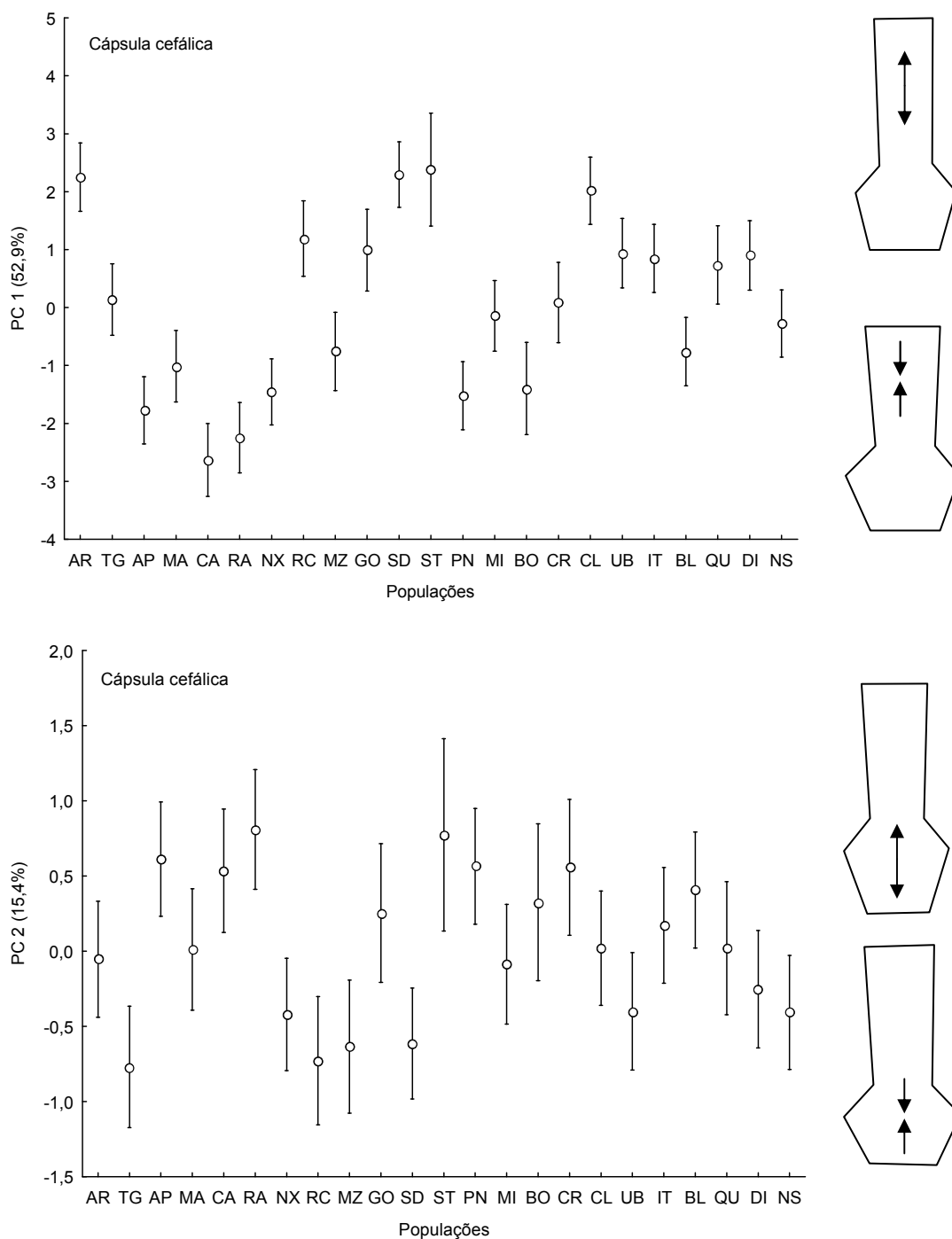


Figura 14. Análise de variância dos componentes principais 1 e 2 que sumarizam a variação de forma de cápsulas cefálicas de *Rhodnius neglectus*. PC 1 (acima) explicou 52,9% e PC 2 (abaixo) 15,4% da variação de forma da cápsula cefálica. Os pontos representam a média e as linhas os intervalos de confiança (95%) para cada população. A forma esperada para cápsula cefálica associada a valores mínimos (negativos) e máximos (positivos) de PC1 e PC2 está representada ao lado do gráfico. PC1 está relacionado com o alongamento da região anteocular; valores negativos estão associados a cápsulas cefálicas mais curtas e largas e valores positivos a cápsulas cefálicas mais longas e estreitas. PC2 está relacionado com o alongamento da região pós-ocular; valores negativos estão relacionados a uma região pós-ocular mais curta e valores positivos a uma região pós-ocular mais longa. Códigos das populações conforme a Figura 9.

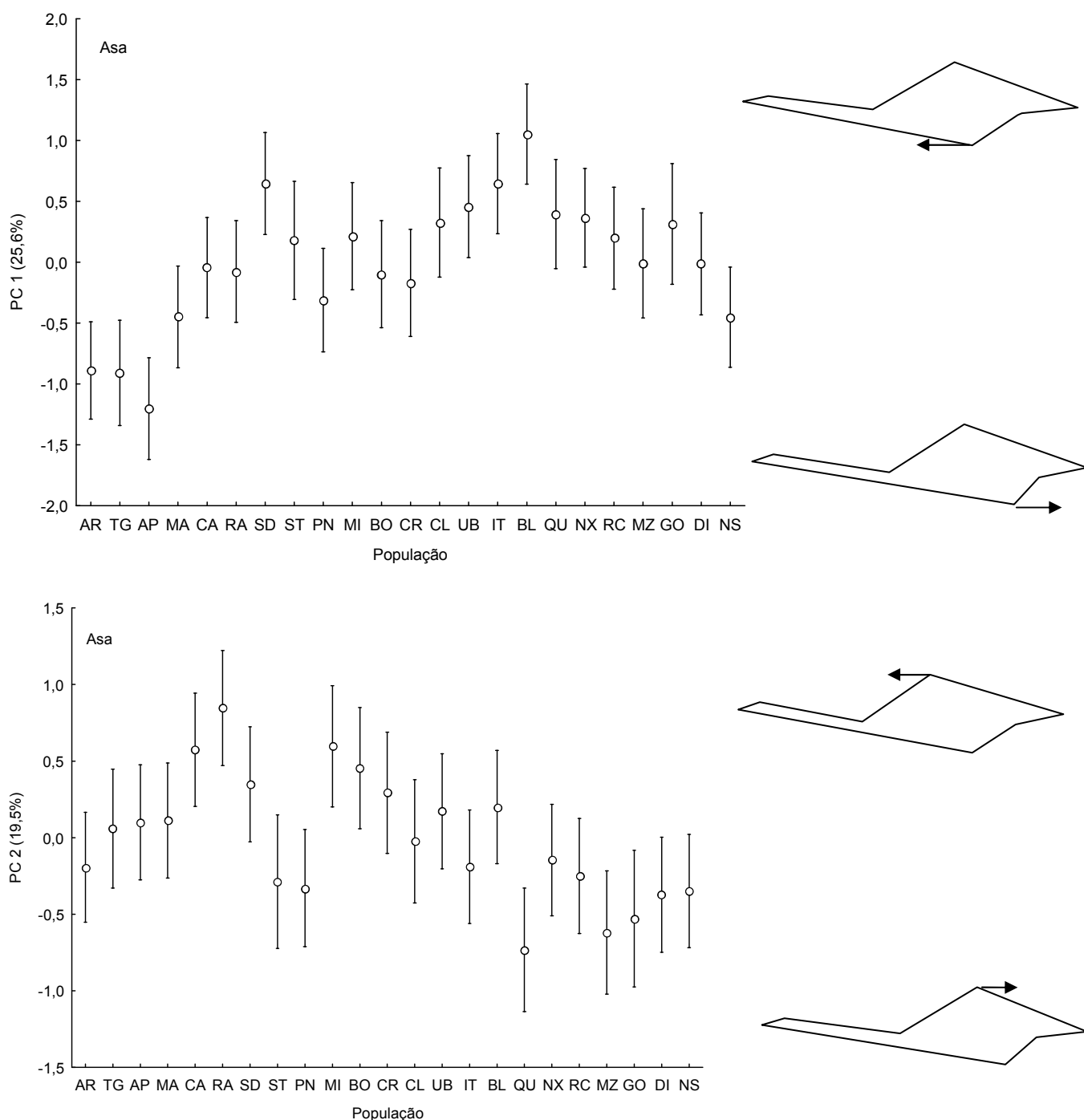


Figura 15. Análise de variância dos componentes principais 1 e 2 que sumarizam a variação de forma de asas de *Rhodnius neglectus*. PC1 (acima) explicou 25,6% e PC2 (abaixo) 19,5% da variação de forma da asa. Os pontos representam a média e as linhas os intervalos de confiança (95%) para cada população. A forma esperada para asa associada a valores mínimos (negativos) e máximos (positivos) de PC1 e PC2 está representada ao lado do gráfico. PC1 está relacionado com a posição relativa dos pontos 2 e 3 (ver Figura 4 com marcamos anatômicos), ou seja, a veia de ligação das veias cubital e média; valores negativos estão associados à asas com veias de ligação mais curtas e valores positivos a asas com veias de ligação mais longas. PC2 está relacionado com a posição relativa do ponto 5 (ver Figura 4), o encontro da veia radial com a sub-costa; nas asas com valores negativos o encontro ocorre numa região mais posterior da asa e nas asas com valores positivos esse encontro ocorre mais anteriormente. Códigos das populações conforme Figura 9.

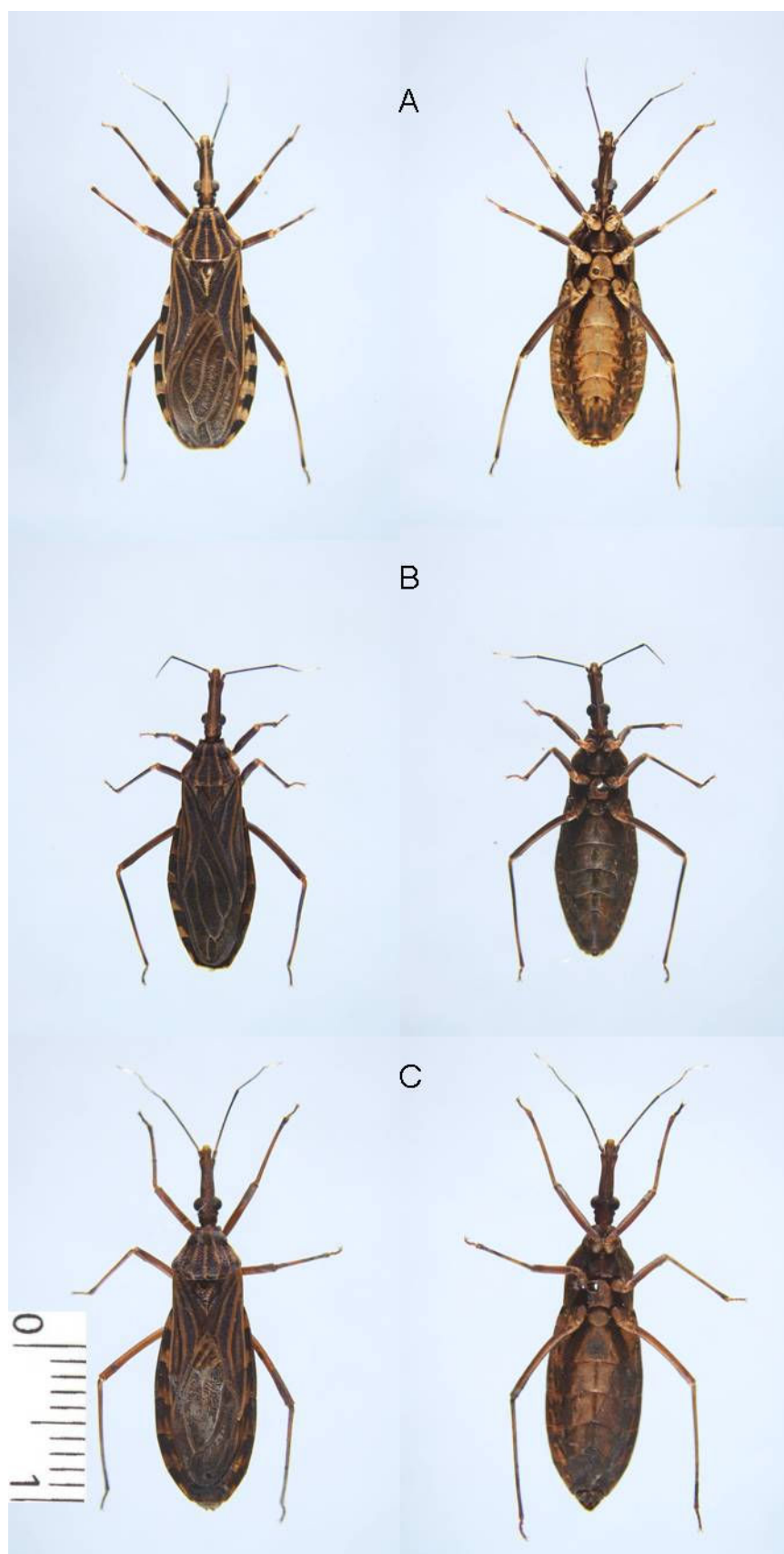


Figura 16. Variação cromática na região dorsal e ventral em *Rhodnius neglectus*. A) Rajadinha-DF; B) Aporé-GO e C) Araguaína-TO. Notar mancha ventral longitudinal clara no espécime A em comparação com o espécime B; notas patas com coloração uniforme no espécime C em comparação aos espécimes A e B, que apresentam coxas, trocânteres e articulação fêmur/tíbia mais claros.

4.3 Infestação de *Mauritia flexuosa* por *Rhodnius neglectus* no Brasil central

4.3.1 Freqüência de palmeiras infestadas

Entre 2005 e 2007 foram examinadas 324 palmeiras em 40 áreas de estudo, sendo 177 encontradas infestadas por *R. neglectus*. A infestação média nas áreas foi de 65% variando de 11 a 100% (Tabela 9).

4.3.2 Densidade de insetos por palmeira

No total, foram coletados 1.581 espécimes de *R. neglectus*, apresentando uma densidade média de 9,0 insetos por palmeira variando de 1 a 124 insetos. Foi observada diferença significativa comparando o número de triatomíneos coletados nas palmeiras infestadas das 40 áreas (Kruskal-Wallis $H_{39,177}=72,7$; $p<0,01$), sendo os maiores valores de densidade encontrados em Rajadinha-DF, Novo Planalto-GO, Nova Xavantina-MT e Diamantino-MT, com mais de 20 insetos por palmeira (Tabela 9). Um número maior de triatomíneos foi observado nas palmeiras com a presença de ninhos produzidos com gravetos (Kruskal-Wallis $H_{2,177}=23,2$; $p<0,01$) (Figura 17). Adicionalmente, ninfas foram mais abundantes que adultos (razão adulto/ninfa médio=0,5) e machos mais abundantes que fêmeas (razão macho/fêmea médio=2,0) (Tabela 9).

Não houve relação significativa entre a densidade de insetos por palmeira e as variáveis ambientais das áreas analisadas: altitude ($r=0,22$; $p=0,17$); temperatura máxima ($r = -0,13$; $p=0,40$); temperatura mínima ($r=-0,15$; $p=0,33$) e precipitação ($r=0,12$; $p=0,45$).

4.3.3 Infecção por tripanossomatídeos

Foram examinadas 517 amostras de fezes de *R. neglectus*. No total, 20 insetos estavam infectados por *Trypanosoma* spp. (3,8%). A análise fenotípica dos tripanossomatídeos nas amostras de fezes positivas coradas com Giemsa demonstrou presença de *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli*; um dos insetos examinados (proveniente de Ituiutaba-MG) apresentou infecção mista

T. cruzi/*T. rangeli*, e os outros insetos infectados apresentaram formas morfológicamente similares a *T. cruzi*. Nenhuma das 40 amostras de hemolinfa analisadas foi positiva para *T. rangeli*. As áreas que apresentaram maiores índices de infecção foram Uberaba-MG, Ituiutaba-MG, Quirinópolis-GO e Riberão Cascalheira-MT (Tabela 9).

Tabela 9. Índices de infestação nas palmeiras e infecção de *Rhodnius neglectus* por tripanossomatídeos nas bacias e áreas amostradas.

Área ^d	Bacia	n°		total insetos	n°		Razão	Razão	Razão	n° insetos examinados	insetos infectados (%)
		total	insetos		total	insetos					
AE	Tocantins	6	3	3	3	1,00	2,0	0,5	2	5	0
MA	Tocantins	50	14	7	7	0,50	3,6	0,3	1,8	7	0
PO	Tocantins	25	12	7	7	0,58	2,1	^a	^a	10	10 ^e
AR	Tocantins	57	9	8	8	0,89	6,3	0,2	1,3	12	0
CO	Tocantins	5	14	3	3	0,21	0,4	0,2	^b	4	0
TG	Tocantins	56	9	3	3	0,33	6,2	0,2	1,7	37	8 ^e
PA	Tocantins	22	15	7	7	0,47	1,5	0,7	2	11	0
AP	Tocantins	94	12	8	8	0,67	7,8	0,4	2,9	7	0
TZ	Tocantins	22	13	7	7	0,54	1,7	0,1	^c	5	0
ML	Tocantins	4	1	1	1	1,00	4,0	^a	^a	4	0
GO	Tocantins	27	20	6	6	0,30	1,3	1,7	4,7	10	0
MZ	Tocantins	62	9	1	1	0,11	6,9	0,3	0,8	10	0
SM	Tocantins	16	17	6	6	0,35	0,9	0,6	1	3	0
NP	Tocantins	41	2	2	2	1,00	20,5	1,16	1,2	4	0
RC	Tocantins	27	6	5	5	0,83	4,5	0,42	1	18	22 ^e
NX	Tocantins	87	4	4	4	1,00	21,8	2,35	0,7	30	0
VP	Tocantins	9	10	3	3	0,30	0,9	0,8	1	2	0
CA	Tocantins	61	13	5	5	0,38	4,7	0,3	2,8	36	0
RA	Tocantins	91	4	4	4	1,00	22,8	0,3	3,4	33	0

Continuação...

AL	Paraná	48	9	9	1,00	5,3	0,5	2,2	28	0
IB	Paraná	58	7	4	0,57	8,3	0,2	3,5	14	0
BL	Paraná	61	4	4	1,00	15,2	0,5	0,6	24	8
UB	Paraná	53	5	4	0,80	10,6	0,3	0,7	13	15 ^e
IT	Paraná	53	8	7	0,88	6,6	1,4	1,8	24	13 ^f
CL	Paraná	37	10	7	0,70	3,7	0,3	1,3	12	8 ^e
CR	Paraná	49	5	3	0,60	9,8	0,2	8	12	0
AO	Paraná	12	7	6	0,86	1,7	0,33	2	14	0
QU	Paraná	4	1	1	1,00	4,0	^a	^b	12	17 ^e
AC	Paraná	25	6	4	0,67	4,2	0,67	2,3	14	0
SD	São Francisco	15	4	3	0,75	3,7	1,1	0,6	9	11 ^e
ST	São Francisco	16	11	4	0,36	1,4	0,3	3	2	0
MI	São Francisco	35	10	6	0,60	3,5	0,6	3,3	10	0
PN	São Francisco	27	4	3	0,75	6,7	0,3	0,8	13	0
BO	São Francisco	57	13	4	0,31	4,4	0,4	1,3	16	0
SJ	São Francisco	4	7	1	0,14	0,6	^a	^a	2	0
PL	Paraguai	30	8	5	0,63	3,7	0,25	3	7	0
DI	Paraguai	85	4	4	1,00	21,2	0,5	1,5	20	0
PE	Paraguai	3	4	1	0,25	0,7	^a	^b	0	0
NS	Paraguai	124	1	1	1,00	124,0	0,72	1	13	7 ^e
AG	Paraguai	23	9	6	0,67	2,6	0,64	2	10	0

^aSomente ninfas coletadas na área; ^b somente fêmeas coletadas na área; ^c somente machos coletados na área. ^dver legenda das áreas na Figura 3. ^e *Trypanosoma cruzi*. ^f *T. cruzi* e *T. rangeli*.

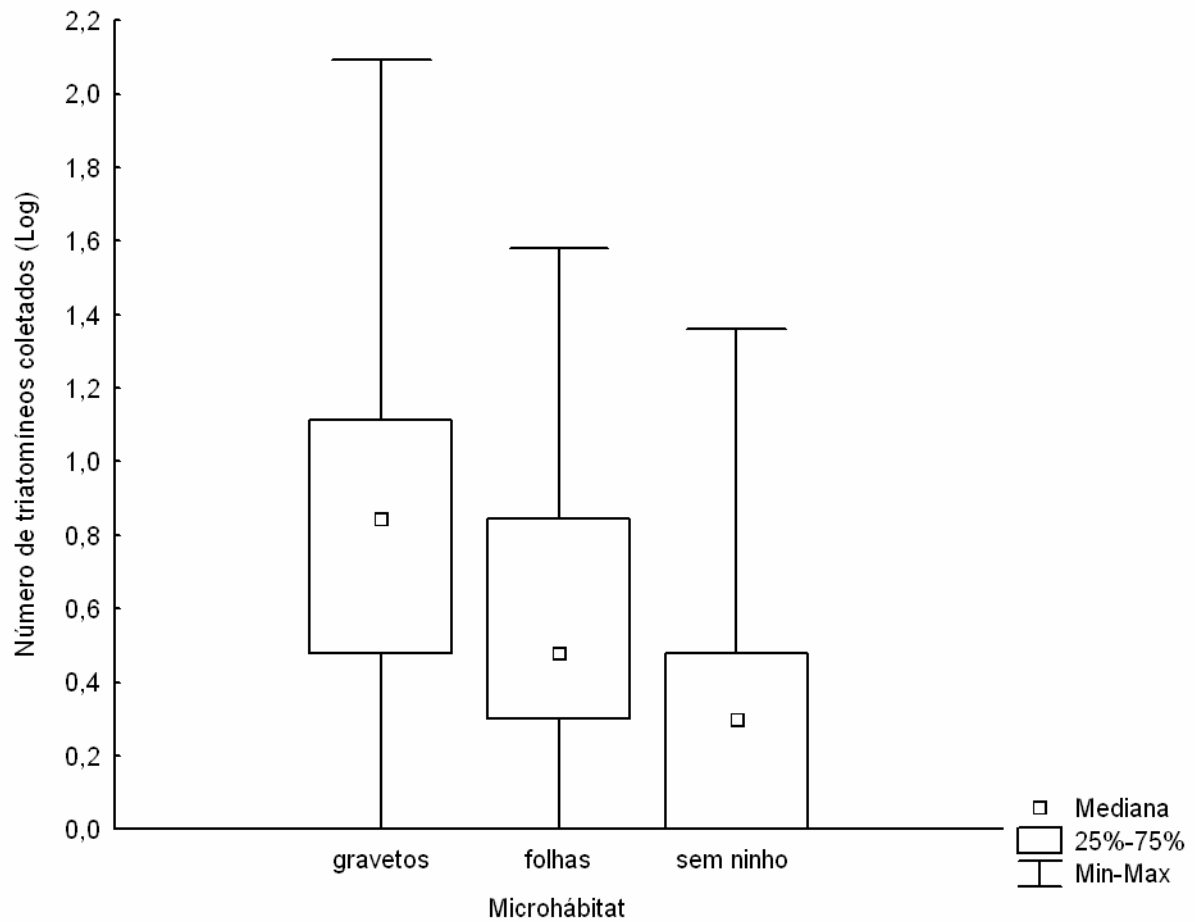


Figura 17. Número de espécimes de *Rhodnius neglectus* (logaritmo) coletados em diferentes microhabitats na copa da palmeira *Mauritia flexuosa* nas áreas de estudo.

4.4 Predição da distribuição geográfica de *Rhodnius neglectus* usando modelagem de nicho ecológico

4.4.1 Mapas de registros de ocorrência

O mapa de registros de ocorrência de *R. neglectus* em ambiente silvestre e domiciliar (Figura 18) mostra que a espécie tem ampla distribuição no Brasil, ocorrendo entre 2° e 23° de latitude sul e 36° e 59° de longitude oeste, desde o nível do mar até cerca de 1.200 m de altitude. *R. neglectus* ocorre em todo o bioma Cerrado e áreas de transição (ecótonos) na caatinga (oeste da Bahia), pantanal (Mato Grosso do Sul) e floresta amazônica (norte de Mato Grosso e Tocantins), mostrando ser uma espécie característica (não endêmica) do bioma Cerrado.

4.4.2 Modelagem de nicho ecológico

Os modelos resultantes da análise de nichos ecológicos (GARP) foram significativamente diferentes de uma distribuição aleatória e apresentaram baixos erros de omissão e sobreprevisão (Tabela 10), indicando alta capacidade de predição e resumindo as condições ecológicas necessárias para a ocorrência de *R. neglectus*. Os modelos de distribuição baseados somente em variáveis climáticas (temperatura e precipitação) apresentaram maiores erros de sobreprevisão e omissão quando comparados com os modelos baseados em todas as variáveis, sugerindo que a altitude e os índices de vegetação contribuem para aumentar a capacidade de predição do modelo. O mapa gerado a partir da sobreposição dos modelos de distribuição potencial mostrou alta probabilidade de ocorrência de *R. neglectus* no Brasil Central, principalmente em Tocantins, Maranhão (sul), Piauí (centro-sul), Ceará (sul), Pernambuco (noroeste), Bahia (oeste), Goiás, Mato Grosso (centro-sul), Rondônia (sudeste), Mato Grosso do Sul (nordeste) e São Paulo (noroeste). O mapa também indicou áreas com potencial de ocorrência da espécie em outros estados brasileiros e na Bolívia (Figura 19).

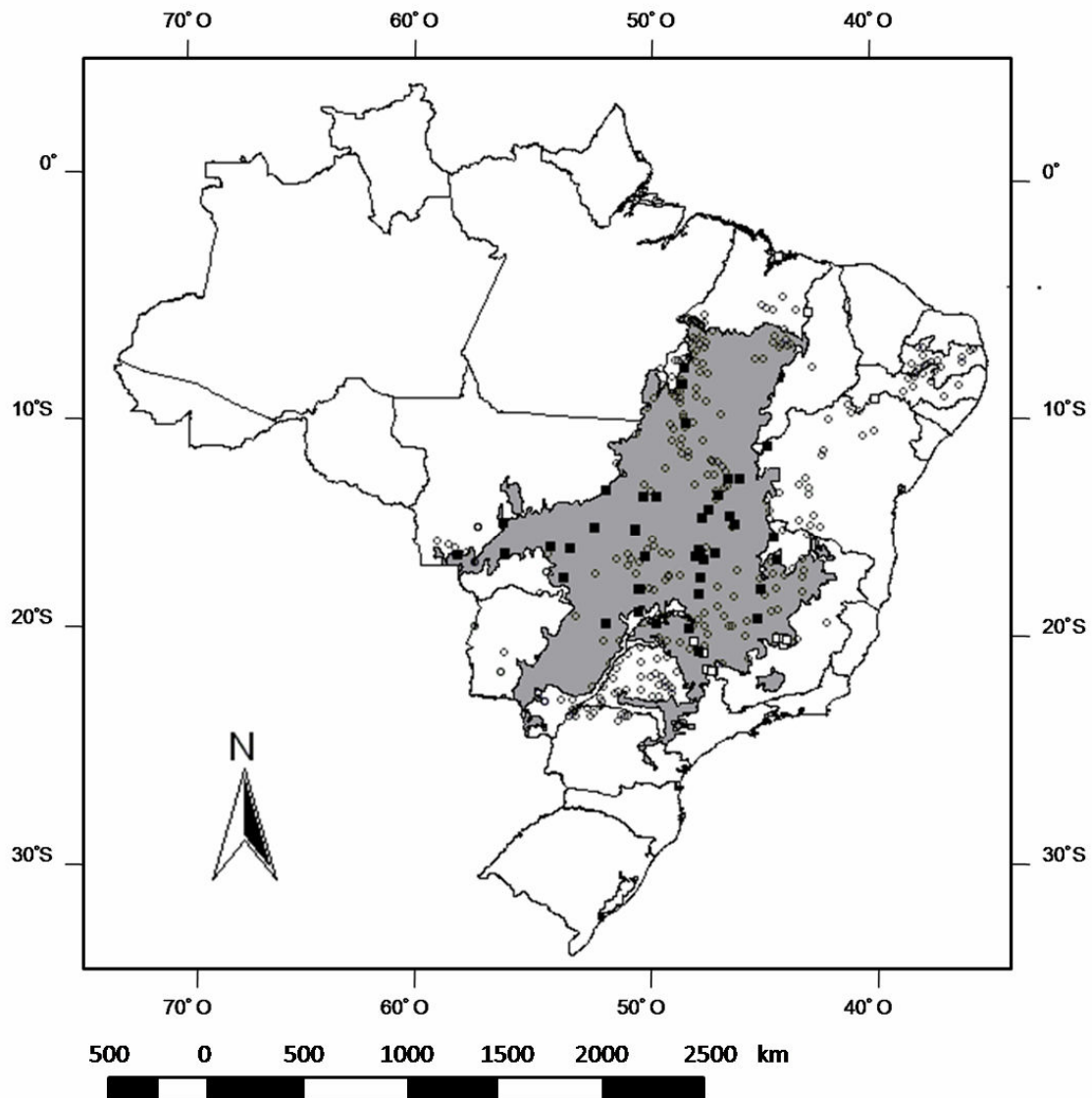


Figura 18. Distribuição dos registros de ocorrência de *Rhodnius neglectus* no Brasil. A área em cinza representa os limites do bioma Cerrado. Os quadrados pretos são registros de *R. neglectus* em palmeiras (*Mauritia flexuosa*) usados na modelagem de nicho ecológico. Os círculos vazios são registros de *R. neglectus* em ambiente domiciliar obtidos pelo Programa de Controle da Doença de Chagas. Os quadrados brancos são registros de *R. neglectus* em ambiente silvestre obtidos na literatura.

Tabela 10. Parâmetros estatísticos para os dez melhores modelos resultantes da modelagem de nicho ecológico (GARP) usando todas as variáveis e somente as variáveis climáticas.

Modelos	χ^2	P	Sobreprevisão	Omissão
Todas as variáveis	563,9	<0,001	14,1	1,1
Somente variáveis climáticas	345,8	<0,001	22,5	1,5

χ^2 : teste qui quadrado (média); P: probabilidade de que uma predição aleatória tenha o mesmo número de pontos corretamente preditos que os gerados pelo DesktopGarp. Sobreprevisão (média): porcentagem da área predita que excede a ocorrência observada. Omissão (média): porcentagem de pontos que foram preditos como ausentes, mas são registros da presença da espécie. As variáveis usadas nos modelos estão descritas na Tabela 5.

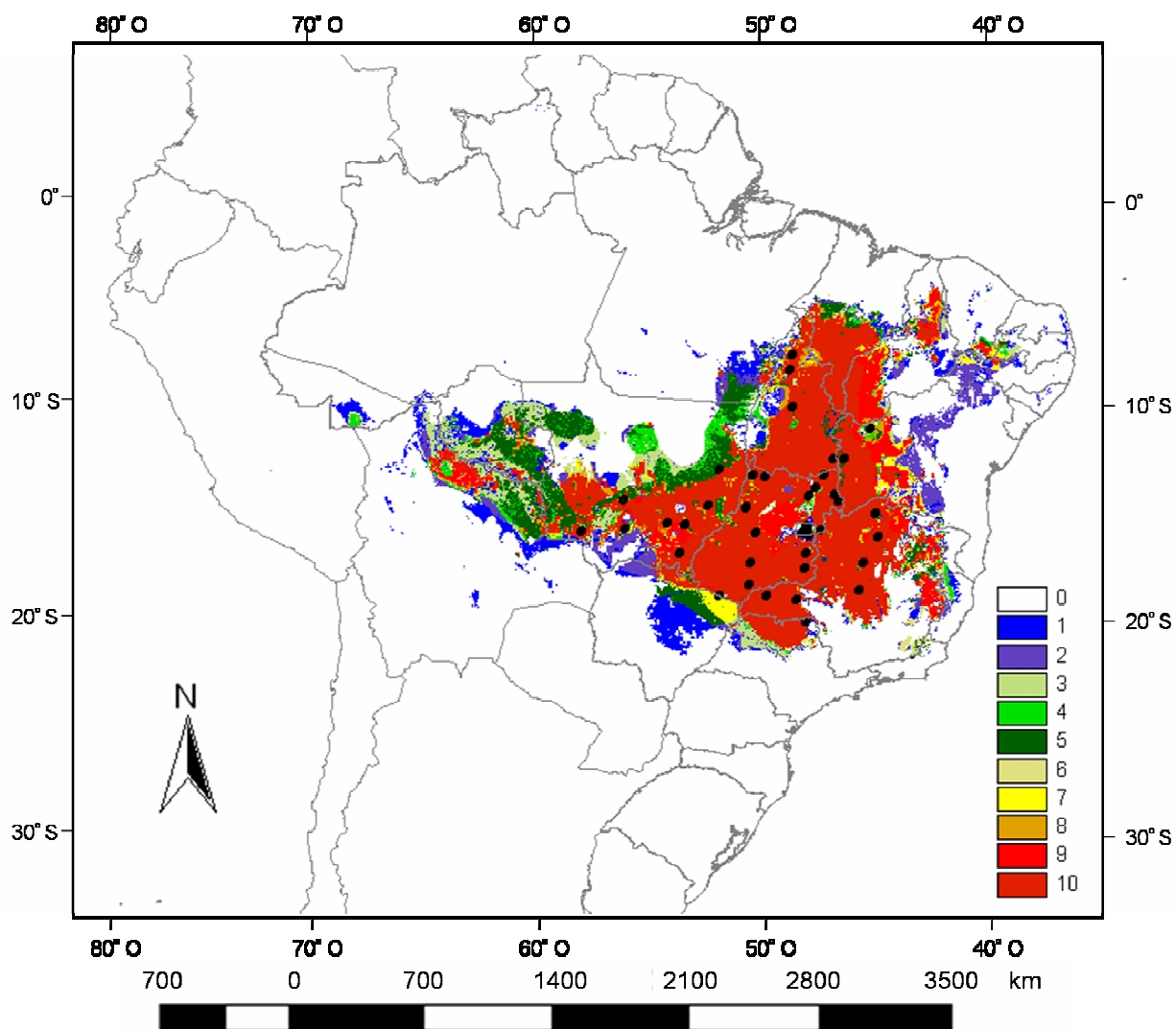


Figura 19. Distribuição geográfica potencial predita de *Rhodnius neglectus* na América do Sul e estados brasileiros usando modelagem de nicho ecológico (GARP). A escala colorida ao lado do mapa representa distribuição predita considerando um (azul) a dez modelos (vermelho escuro). As áreas em branco representam a ausência predita pelos modelos e os círculos abertos os registros de ocorrência usados na modelagem.

4.4.3 Comparação das amplitudes de ocorrência

Comparando as amplitudes de distribuição baseadas nos pontos de ocorrência de *R. neglectus* em ambiente silvestre e domiciliar, da distribuição conhecida para *R. neglectus* no Brasil (Carcavallo *et al.* 1999) e da distribuição potencial usando GARP obtida no presente estudo, percebe-se claramente duas diferenças na distribuição geográfica da espécie. Primeiro, uma ampliação da distribuição a oeste, principalmente em áreas do estado do Mato Grosso; segundo, uma ampliação na região nordeste, principalmente nos estados da Bahia e Pernambuco (Figura 20). A primeira diferença foi confirmada por registros em ambiente silvestre no extremo oeste do Mato Grosso; a segunda deve ser investigada futuramente, pois o único registro com identificação confiável de *R. neglectus* na região nordeste é o de Curaçá, na Bahia.

4.4.4 Comparação entre a distribuição de *R. neglectus*, palmeiras e aves

Adicionalmente, foi observada grande sobreposição entre a distribuição de *R. neglectus*, palmeiras (Figura 21) e aves (Figura 22) mostrando que as interações bióticas podem também auxiliar a analisar os padrões de distribuição dessa espécie de triatomíneo. As maiores áreas de sobreposição entre os registros de ocorrência de *R. neglectus* e a distribuição de palmeiras e aves foram observadas para *Acrocomia aculeata*/*Syagrus oleracea* e *Phacellodomus ruber*/*Pseudoseisura cristata*, respectivamente.

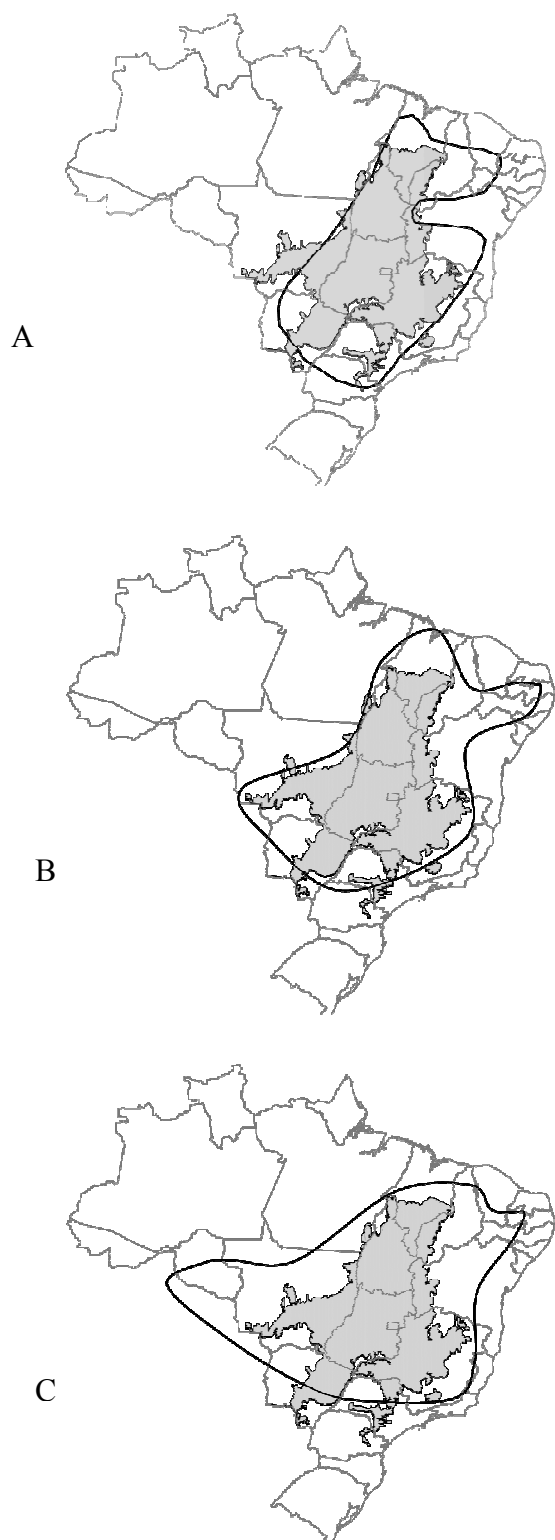


Figura 20. Amplitude de distribuição de *Rhodnius neglectus* adaptada de Carcavallo *et al.* (1999) (A), em ambiente domiciliar e silvestre (B) e baseada na distribuição potencial usando GARP (C). A área em cinza representa os limites do bioma Cerrado.

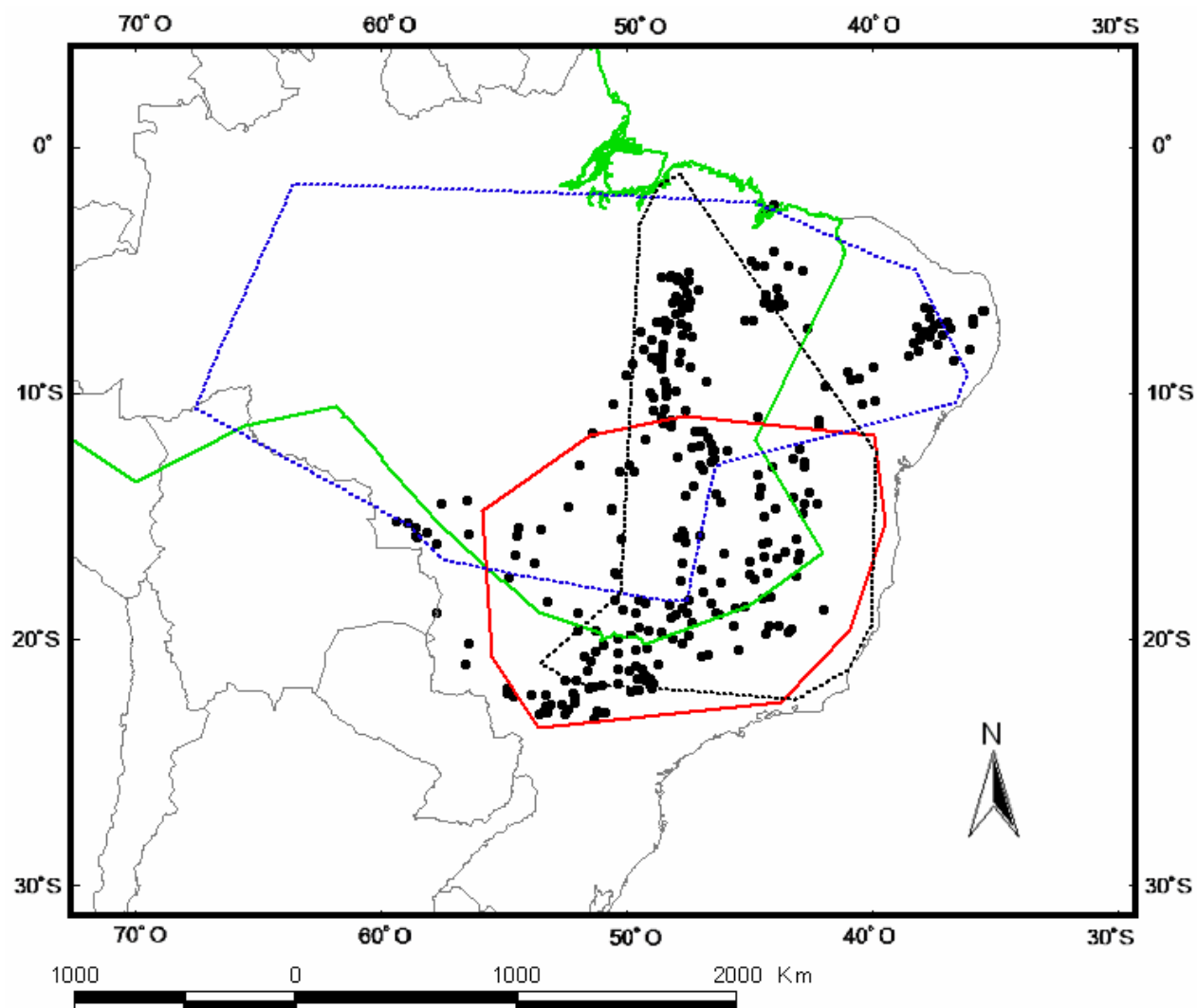


Figura 21. Sobreposição entre os registros de ocorrência de *Rhodnius neglectus* (pontos pretos) e as amplitudes de distribuição das espécies de palmeiras já descritas como hábitat da espécie. Linha verde: *Mauritia flexuosa*; Linha azul pontilhada: *Attalea speciosa*; Linha vermelha: *Syagrus oleracea*; Linha preta pontilhada: *Acrocomia aculeata*.

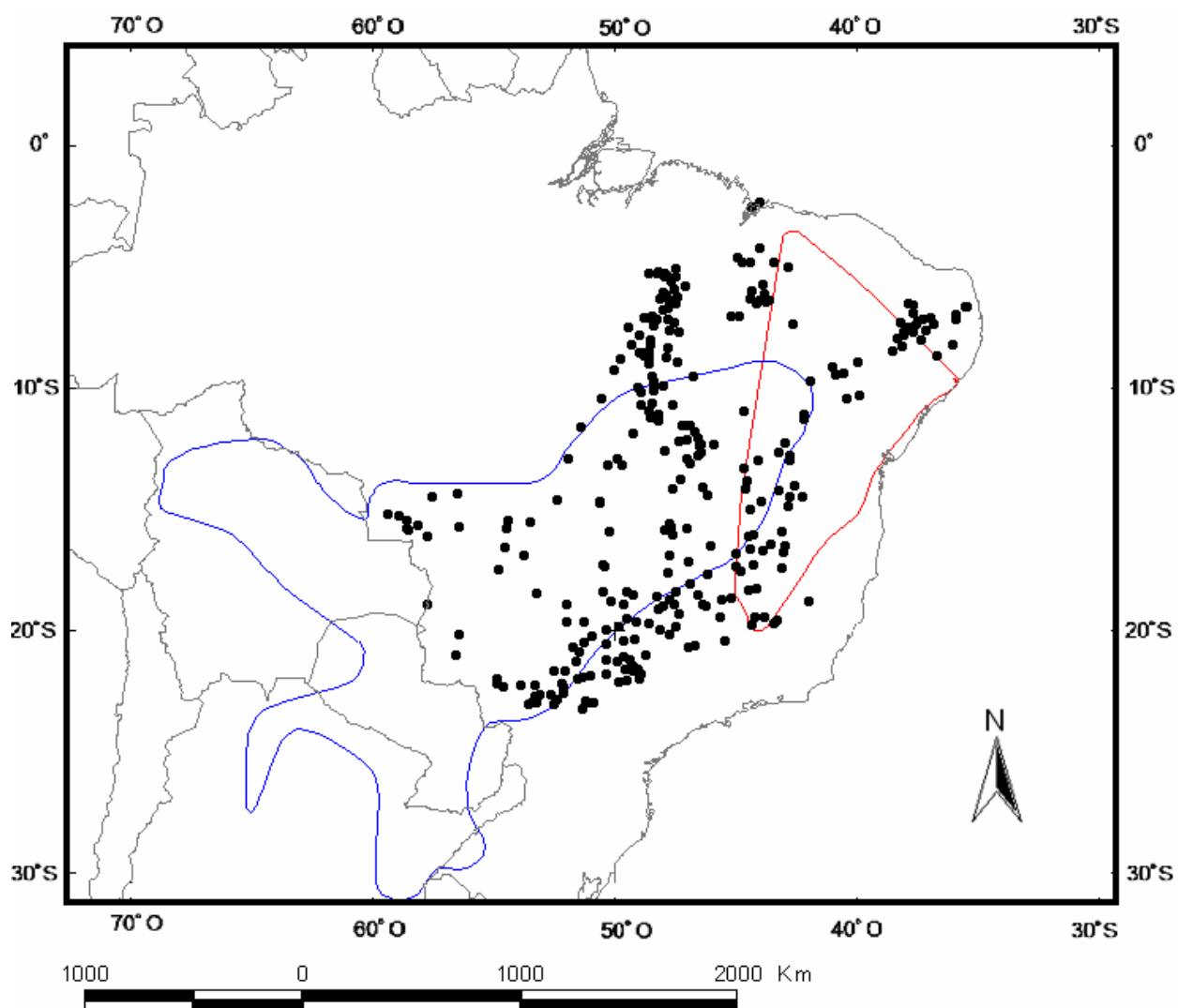


Figura 22. Sobreposição entre os registros de ocorrência de *Rhodnius neglectus* (pontos pretos) e as amplitudes de distribuição das espécies de aves já descritas como fontes alimentares da espécie. Linha azul: *Phacellodomus ruber*; Linha vermelha: *Pseudoseisura cristata*.

4.5 Estrutura genética e filogeografia de *Rhodnius neglectus* baseadas no polimorfismo de seqüências de citocromo b

4.5.1 Polimorfismo das seqüências de citocromo b e composição nucleotídica

O seqüenciamento da porção 5' do gene citocromo b em 144 indivíduos de 33 populações resultou em um fragmento de 567 pares de bases (pb), revelando a existência de 13 diferentes haplótipos e 22 sítios variáveis (4,4%) compostos somente por substituições (Tabela 11). Quatorze indivíduos da bacia do Paraguai apresentaram seqüências menores (entre 285 e 498 pb) e os sítios restantes foram tratados como dados faltantes (? na Tabela 11). O alinhamento dos 13 haplótipos apresentou 15 sítios variáveis informativos para parcimônia e sete autapomorfias (mutação que ocorre somente em um haplótipo). Como esperado para genes codificadores de proteínas, a terceira posição do códon foi a mais variável (83%), seguido da segunda e primeira.

Não foram observadas deleções, adições nem transversões. A identidade da seqüência do citocromo b foi confirmada comparando com a seqüência completa do gene (1132pb) de *Triatoma dimidiata* (Dotson & Beard 2001; GeneBank AF301594); o fragmento de 567pb correspondeu aos sítios 354 a 921 do gene e não apresentou códon de parada. A composição nucleotídica média dos 13 haplótipos foi T=32,9%; A=30,3%; C=22,8% e G=13,8%, sendo muito similar entre os haplótipos.

4.5.2 Análise da estrutura genética

Para a análise intra e interpopulacional foram consideradas apenas as populações com mais que quatro indivíduos (19 populações) e com seqüências de 567 pb. A diversidade nucleotídica (número médio de diferenças por sítio) nas populações de *R. neglectus* foi de 0,0043 (DP=0,0019). De forma geral, *R. neglectus* apresentou uma baixa, mas significativa, diferenciação entre as

populações (AMOVA $F_{ST}=0,099$; $p=0,019$). As maiores estimativas de diversidade genética foram obtidas nas populações de Alto Paraíso-GO e Teresina-GO (bacia do Tocantins, localizadas na Chapada dos Veadeiros, noroeste de Goiás); a maioria das populações apresentou apenas 2 haplótipos e baixos valores de diversidade nucleotídica (Tabela 12).

Nas comparações par a par, a distância genética (índice de fixação- θ) entre as populações variou de 0,0 a 0,45. De forma geral, os valores de θ foram baixos, não sendo significativos ($p>0,01$). Os maiores valores de θ foram observados entre as populações de Alto Paraíso-Palmas ($\theta=0,45$; $p<0,01$) e Palmas-Taguatinga ($\theta=0,43$; $p<0,01$). Essas populações também apresentaram os menores valores de N_m (número de migrantes) (Alto Paraíso-Palmas = 0,61; Palmas-Taguatinga = 0,32). O número de migrantes entre as populações foi maior que 1 para a maioria dos pares de populações atingindo valores muito altos (inclusive infinitos) para populações muito distantes geograficamente como Araguaína-TO e Buritizal-SP (distância aproximada de 1.700 km).

A análise da estrutura populacional de *R. neglectus* usando o programa Nucleodiv (Holsinger & Mason-Gamer 1996) mostrou que algumas populações apresentaram valores G_{st} muito similares e não significativos (dados não apresentados); dessa forma, algumas populações foram agrupadas quando os níveis de diferenciação foram baixos e não significativos ($p>0,10$). O dendrograma com a análise hierárquica da diversidade nucleotídica a partir das populações agrupadas mostrou que a maior parte da variação genética é explicada pela separação entre as populações do Mato Grosso/oeste de Goiás e a população de Alto Paraíso, nordeste de Goiás (variação leste-oeste). Outra parcela significativa da variação foi explicada pela distância genética entre Alto Paraíso e as populações do norte de Tocantins (Palmas e Colinas) e entre estas e o restante das populações de Minas Gerais, Bahia e Goiás, localizadas mais ao sul (Figura 23).

Tabela 11. Sítios variáveis para o fragmento de 567pb de gene citocromo b observados em 13 haplótipos de *Rhodnius neglectus*.

Haplótipos	Sítios variáveis																																	
	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	5	5																			
	1	1	3	6	0	1	3	6	7	7	7	3	3	4	7	8	2	3	4	0	3	5	7	7	7	7	7	1	8					
Rne1	G	A	T	G	A	T	G	A	C	C	A	G	A	G	T	G	C	G	G	C	A	C												
Rne2			
Rne3	T			
Rne4	A			
Rne5	A	G	.	T			
Rne6	?	?	?	?	C	?	?		
Rne7	G	A	.	GT
Rne8	GA	A	.	GT
Rne9	.	.	C	.	G	.	A	.	.	T	.	.	G	.	.	A	GT
Rne10	.	.	C	.	G	C	A	.	.	T	.	.	G	.	.	A	GT
Rne11	?	?	?	.	G	.	A	.	.	T	.	.	G	.	.	AAA	??	
Rne12	.	.	C	A	G	.	A	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	??	
Rne13	?	G	C	A	G	.	A	.	.	T	.	.	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	??		

Pontos de interrogação: dados faltantes; pontos: mesmo nucleotídeo observado no haplótipo Rne1. Distribuição geográfica dos haplótipos na Tabela 13.

Tabela 12. Estimativas de diversidade genética das populações *Rhodnius neglectus* de diferentes bacias hidrográficas do Brasil. N=número de indivíduos; H=número de haplótipos; h=diversidade haplotípica; n=número de substituições; π =diversidade nucleotídica; Pi=número médio de diferenças nucleotídicas (modelo de substituição nucleotídica Kimura 2 parâmetros).

Áreas ^a	N	H	h	n	π	Pi
AP	7	2	0,57	9	0,00900	5,14
AR	5	2	0,53	7	0,00423	2,40
BL	6	3	0,60	5	0,00435	2,46
BO	5	2	0,60	4	0,00423	2,40
CA	9	3	0,66	5	0,00431	2,44
CL	8	2	0,57	4	0,00403	2,28
CP	5	2	0,60	4	0,00423	2,40
CR	6	2	0,53	4	0,00376	2,13
IT	5	3	0,70	5	0,00493	2,80
MA	8	2	0,43	4	0,00302	1,71
MI	6	2	0,53	4	0,00376	2,13
ML	7	1	0,00	0	0,00000	0,00
PA	5	3	0,70	7	0,00494	2,80
RA	7	3	0,52	7	0,00487	2,76
SD	6	2	0,53	4	0,00376	2,13
ST	6	2	0,33	7	0,00411	2,33
TG	7	2	0,28	4	0,00202	1,14
TZ	4	2	0,50	10	0,00881	5,00
UB	6	3	0,60	6	0,00352	2,00

^a Siglas conforme Figura 3

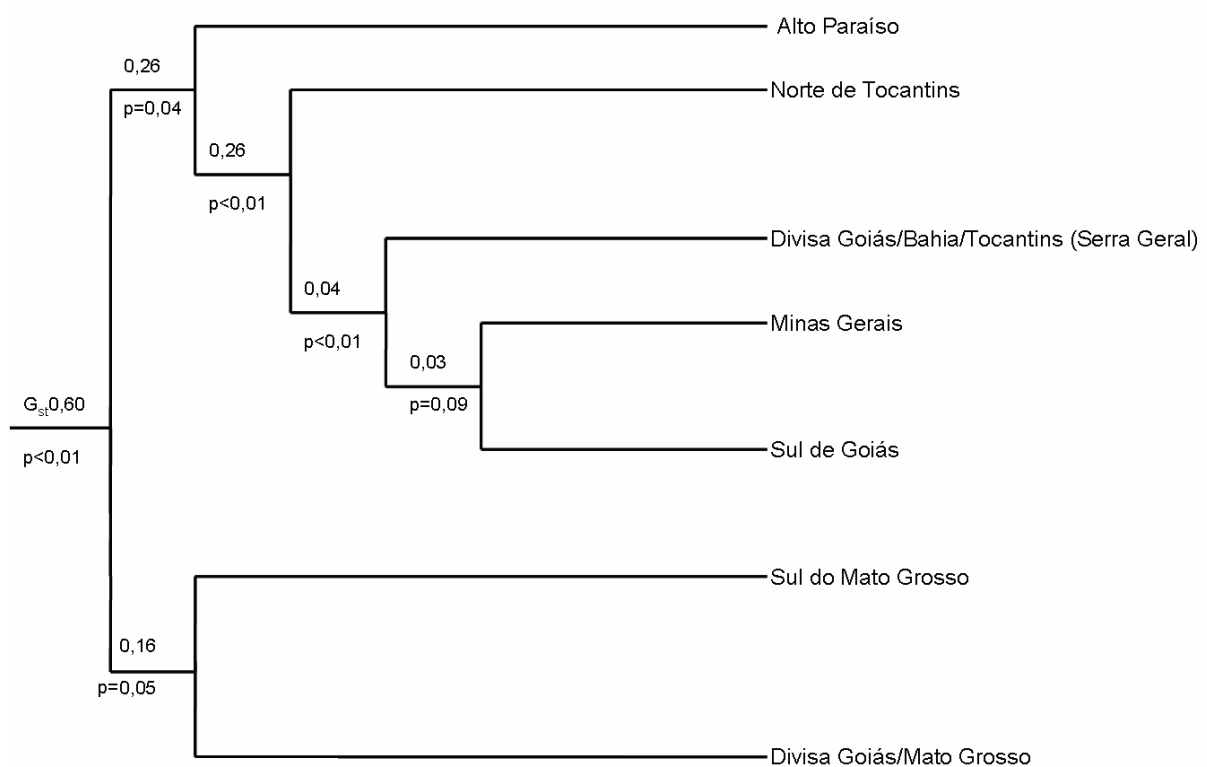


Figura 23. Relações genéticas entre as populações amostradas inferidas a partir da análise hierárquica da diversidade nucleotídica. Os valores significativos de G_{st} são apresentados antes de cada nó do dendrograma e representam a proporção da diversidade genética total explicada pelo agrupamento.

4.5.3 Análise filogeográfica

Dos 13 haplótipos encontrados, os haplótipos Rne1 e Rne7 foram os mais freqüentes, ocorrendo na maioria das populações (Tabela 13). Os haplótipos Rne2, Rne3 e Rne10 foram exclusivos da Bacia do Tocantins; os haplótipos Rne11, Rne12 e Rne13 foram exclusivos da bacia do Paraguai, enquanto os haplótipos Rne6 e Rne8 foram exclusivos da bacia do Paraná. A bacia do São Francisco apresentou somente um haplótipo exclusivo (Tabela 13).

O haplótipo Rne1 apresentou quatro conexões na rede de haplótipos (Figuras 24 e 26), estando relacionado com Rne2 (duas mutações), Rne4 (uma mutação), Rne6 (uma mutação) e a um ‘median vector’ (haplótipo ancestral extinto ou não amostrado no estudo). A partir do ‘median vector’, duas linhagens foram observadas; uma levando ao haplótipo Rne7 (o mais freqüente) com duas mutações e outra ao haplótipo Rne9, com sete mutações. Este haplótipo mostrou mais três conexões, estando relacionado com os haplótipos da bacia do Paraguai, a oeste do Brasil. Na rede de haplótipos agrupando as áreas por bacias hidrográficas (Figura 24) os haplótipos mais freqüentes (Rne1 e Rne7) e Rne9 foram encontrados em três bacias hidrográficas. Adicionalmente, 80 espécimes (59%) compartilharam o mesmo haplótipo (Rne7) mesmo estando separados por distâncias maiores que 1.700 km; haplótipos compartilhados também foram observados nas áreas localizadas nas margens esquerda e direita dos principais rios (São Francisco, Grande, Tocantins, Araguaia, São Lourenço) e também de ambos os lados da Serra Geral de Goiás (Figura 25). Entretanto, os haplótipos Rne9, Rne10, Rne11, Rne12 e Rne13, apresentaram uma distribuição a oeste do Brasil, separados dos outros haplótipos que formaram um agrupamento a leste, sendo observada uma moderada variação longitudinal (leste-oeste, Figura 25).

Na rede de haplótipos agrupando as áreas de acordo com a estrutura sugerida pela análise hierárquica da diversidade nucleotídica usando o programa Nucleodiv (Figura 26) também observou-se a formação de dois agrupamentos separados por sete mutações; o do oeste, formado

pelas populações do Mato Grosso/oeste de Goiás e o do leste, formado pelo restante das populações de *R. neglectus* do Brasil. Apesar de haplótipos amplamente distribuídos e freqüentes terem ocorrido no no agrupamento do leste (Rne1 e Rne7) é possível observar uma tendência a separação do haplótipo Rne4 ocorrendo principalmente em áreas ao sul, na bacia do Paraná (Figura 25). Esses resultados sugerem que as populações de *R. neglectus* apresentam moderada estruturação filogeográfica (leste/oeste) que pode estar relacionada a variação entre populações do Cerrado e Pantanal. Adicionalmente, as populações de *R. neglectus* do Cerrado podem estar estruturadas no sentido norte/sul.

Os testes de neutralidade de Tajima (1989) e Fu (1997) não foram significativos para as populações de *R. neglectus* analisadas (Tabela 14) não mostrando evidências de seleção ou ‘bottleneck’ (efeito gargalo de garrafa) e grandes mudanças populacionais. Nenhuma população apresentou valores positivos significativos que pudessem indicar isolamento em longo prazo. A distribuição observada das diferenças genéticas par a par das populações de *R. neglectus* apresentou um padrão multimodal (Figura 27), não apresentando evidências de expansão populacional recente. Adicionalmente, não houve evidência de isolamento por distância comparando as matrizes de diferença genética entre as populações (θ) e de distâncias geográficas (Mantel, $p = 0,446$). Esses resultados indicam a existência de intenso fluxo gênico entre as populações analisadas de *R. neglectus*, independentemente da distância geográfica.

Tabela 13. Localidades, bacia hidrográfica e frequência dos 13 haplótipos (seqüências do gene citocromo b, 567pb) observados em *Rhodnius neglectus*.

Haplótipo	Localidades ^a	Bacia hidrográfica	Frequência do haplótipo ^b
Rne1	AR, BL, BO, CA, CL, CP, CR, IB,	Tocantins	32
	IT, MA, MI, SD, SJ, TG	São Francisco	
		Paraná	
Rne2	PA, CO, RA	Tocantins	5
Rne3	PA	Tocantins	1
Rne4	BL, CA, IB, IT, RA, UB	Tocantins	7
		Paraná	
Rne5	ST	São Francisco	1
Rne6	AO	Paraná	1
Rne7	AL, AP, AR, BL, BO, CA, CL, CP,	Tocantins	80
	CR, IB, IT, MA, ML, MI, PA, PO,	São Francisco	
	RA, SD, ST, TG, TZ, UB	Paraná	
Rne8	UB	Paraná	1
Rne9	AG, AP, AC, GO, NX, RC, PL, DI	Tocantins	11
		Paraná	
		Paraguai	
Rne10	TZ	Tocantins	1
Rne11	DI	Paraguai	1
Rne12	NS	Paraguai	2
Rne13	DI	Paraguai	1

^a Siglas conforme Figura 3. ^b Número de indivíduos seqüenciados que apresentou o haplótipo.

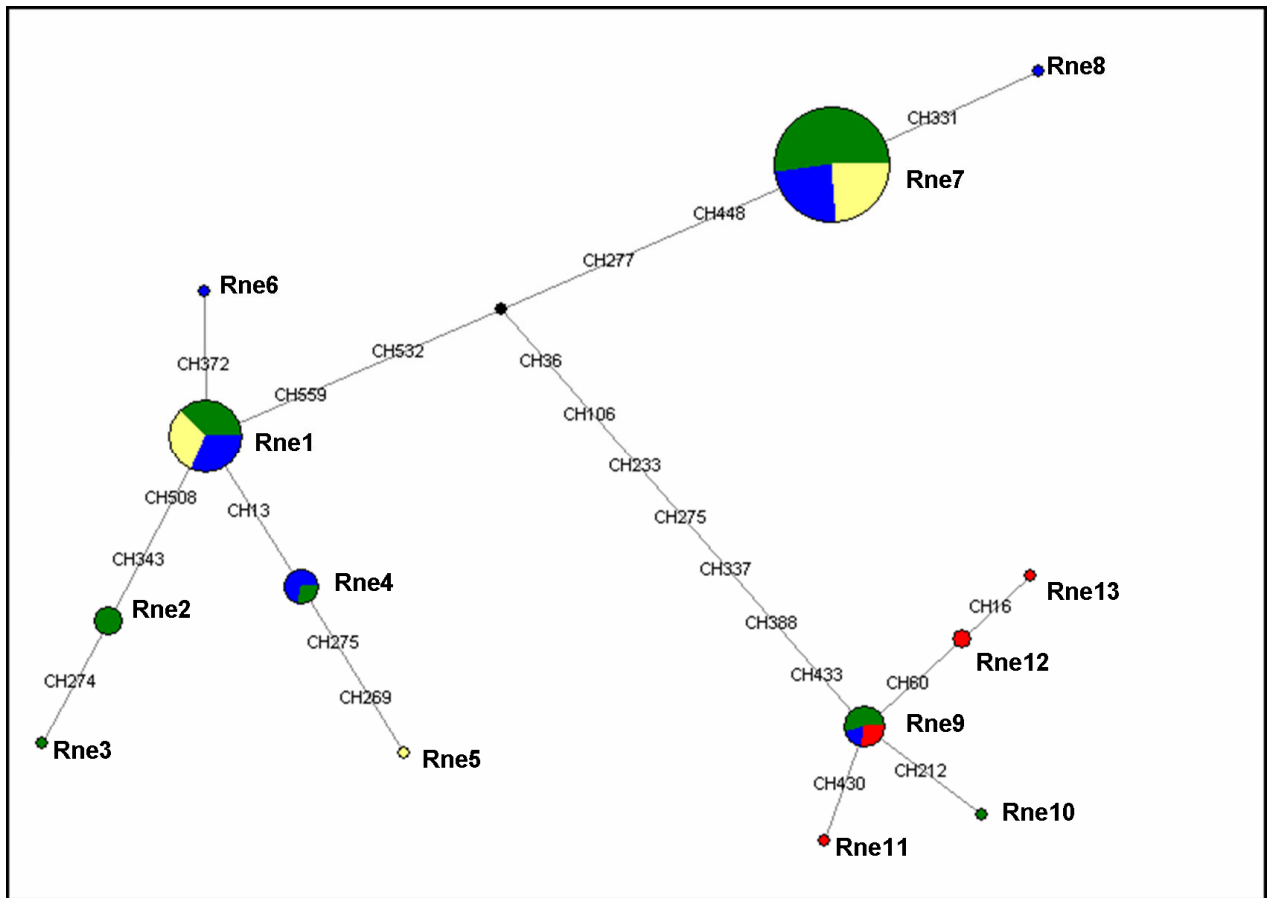


Figura 24. Rede de haplótipos (Median-joining) mostrando as relações entre os haplótipos de citocromo b (567pb) de *Rhodnius neglectus*. Os haplótipos são representados por círculos (o tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos em cada haplótipo). As linhas conectando os círculos mostram a relação entre os haplótipos e as mutações até o aparecimento do próximo haplótipo (e.g. CH13 entre os haplótipos Rne1 e Rne4). As cores representam a origem dos indivíduos de *R. neglectus* de acordo com as bacias hidrográficas: Amarelo: São Francisco; Verde: Tocantins, Azul: Paraná, Vermelho: Paraguai. O ponto preto mostra um haplótipo intermediário (median vector) que pode ser um haplótipo ancestral extinto ou não amostrado no estudo (Forster *et al.* 2000).

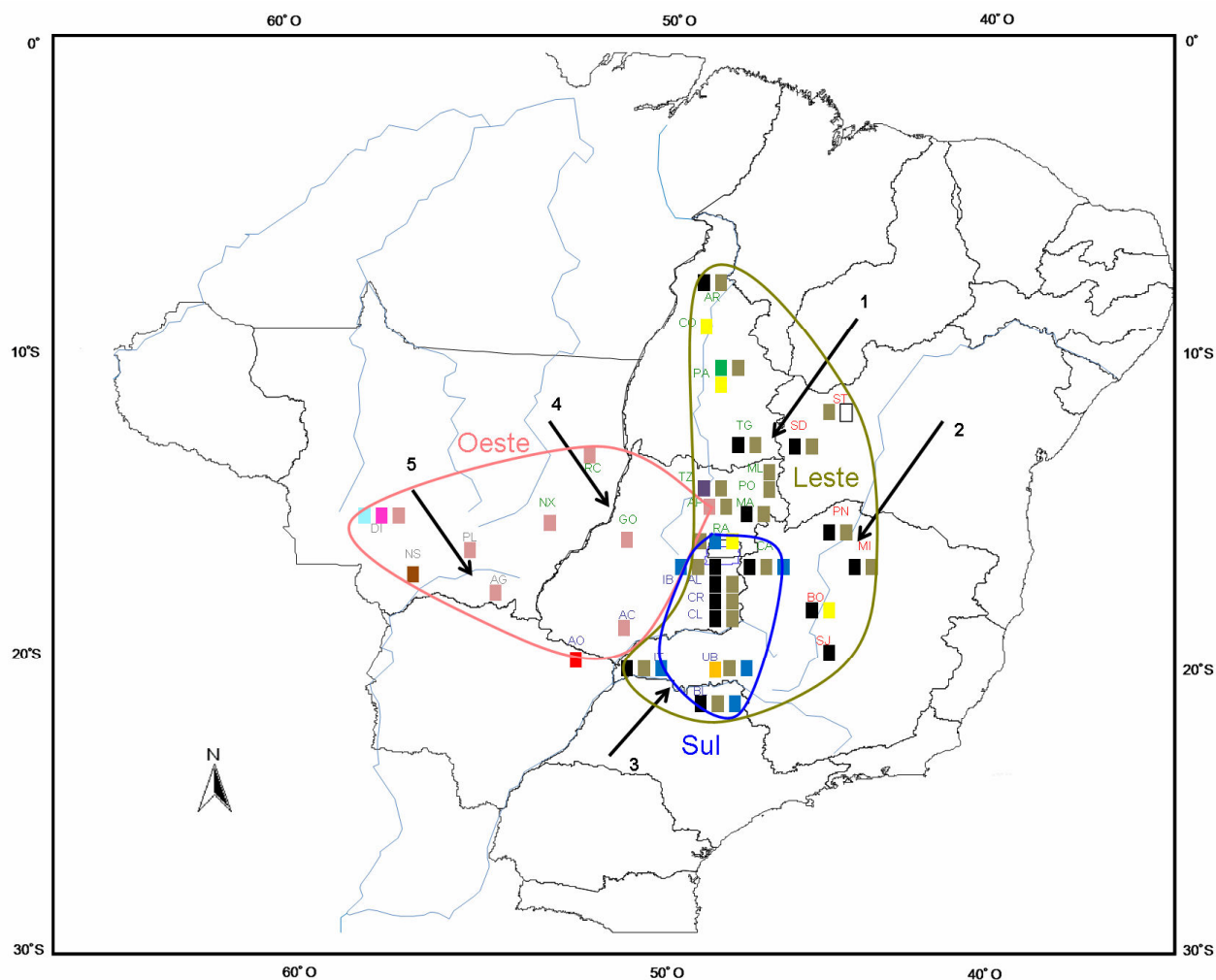


Figura 25. Distribuição geográfica dos 13 haplótipos (seqüências do gene citocromo b, 567pb) observados em *Rhodnius neglectus* em quatro bacias hidrográficas do Brasil. As linhas azuis claras representam os principais rios. As siglas das áreas estão descritas na Figura 3. As linhas representam os agrupamentos de haplótipos do “Oeste” (linha rosa), do “Leste” (linha bege) e do “Sul” (linha azul). Os quadrados de diferentes cores representam os haplótipos: Rne1 (preto), Rne2 (amarelo), Rne3 (verde), Rne4 (azul), Rne5 (branco), Rne6 (vermelho), Rne7 (bege), Rne8 (laranja), Rne9 (rosa), Rne10 (roxo), Rne11 (azul claro), Rne12 (marrom) e Rne13 (rosa choque). As setas indicam potenciais barreiras geográficas para populações próximas: seta 1 (Serra Geral de Goiás), seta 2 (rio São Francisco), seta 3 (rio Grande), seta 4 (rio Araguaia) e seta 5 (rio São Lourenço).

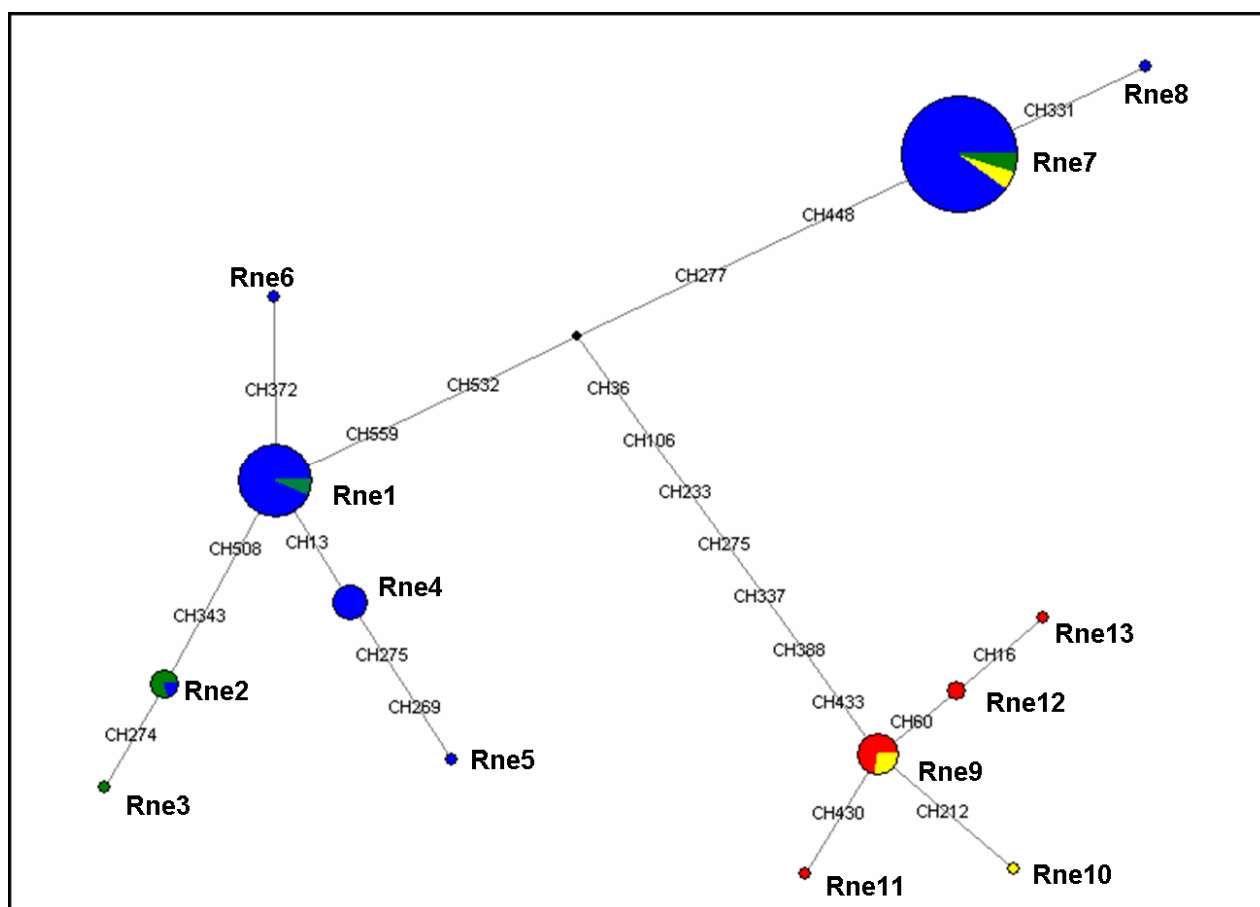


Figura 26. Rede de haplótipos (Median-joining) mostrando as relações entre os haplótipos de citocromo b (567pb) de *Rhodnius neglectus*. Os haplótipos são representados por círculos (o tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos em cada haplótipo). As linhas conectando os círculos mostram a relação entre os haplótipos e as mutações até o aparecimento do próximo haplótipo (e.g. CH13 entre os haplótipos Rne1 e Rne4). As cores representam a origem dos indivíduos de *R. neglectus* de acordo com a estrutura sugerida pela análise hierárquica da diversidade nucleotídica usando o programa Nucleodiv (ver Figura 23). Azul: populações da Serra Geral, Minas Gerais e Sul de Goiás; Verde: populações do norte de Tocantins; Amarelo: população de Alto Paraíso (Chapada dos Veadeiros) e Vermelho: populações do Mato Grosso e oeste de Goiás. O ponto preto mostra um haplótipo intermediário (median vector) que pode ser um haplótipo ancestral extinto ou não amostrado no estudo (Forster *et al.* 2000).

Tabela 14. Valores dos testes de neutralidade de Tajima (1989) e Fu (1997) para o fragmento de 567pb do gene citocromo b das populações de *Rhodnius neglectus*.

Áreas ^a	TajimaD	p ^b	Fu	p ^b
AP	2,12	0,99	6,23	0,99
AR	1,64	0,97	3,02	0,91
BL	0,70	0,72	1,41	0,75
BO	1,64	0,91	3,02	0,91
CA	1,39	0,93	2,28	0,89
CL	2,10	0,99	3,93	0,96
CP	1,64	0,97	3,02	0,92
CR	1,18	0,88	3,14	0,91
IT	1,12	0,82	1,21	0,72
MA	0,48	0,73	3,14	0,92
MI	1,18	0,90	3,14	0,92
ML	0,00	1,00	^c	^c
PA	-1,16	0,07	1,21	0,73
RA	-0,17	0,44	2,01	0,85
SD	1,18	0,87	3,14	0,92
ST	-1,39	0,05	3,36	0,93
TG	-1,43	0,06	2,04	0,83
TZ	-0,83	0,11	4,00	0,94
UB	-1,36	0,04	1,01	0,72

^a Siglas conforme Figura 3. ^b alfa = 0,01. ^c O teste de Fu não pode ser calculado se apenas um haplótipo é observado na população.

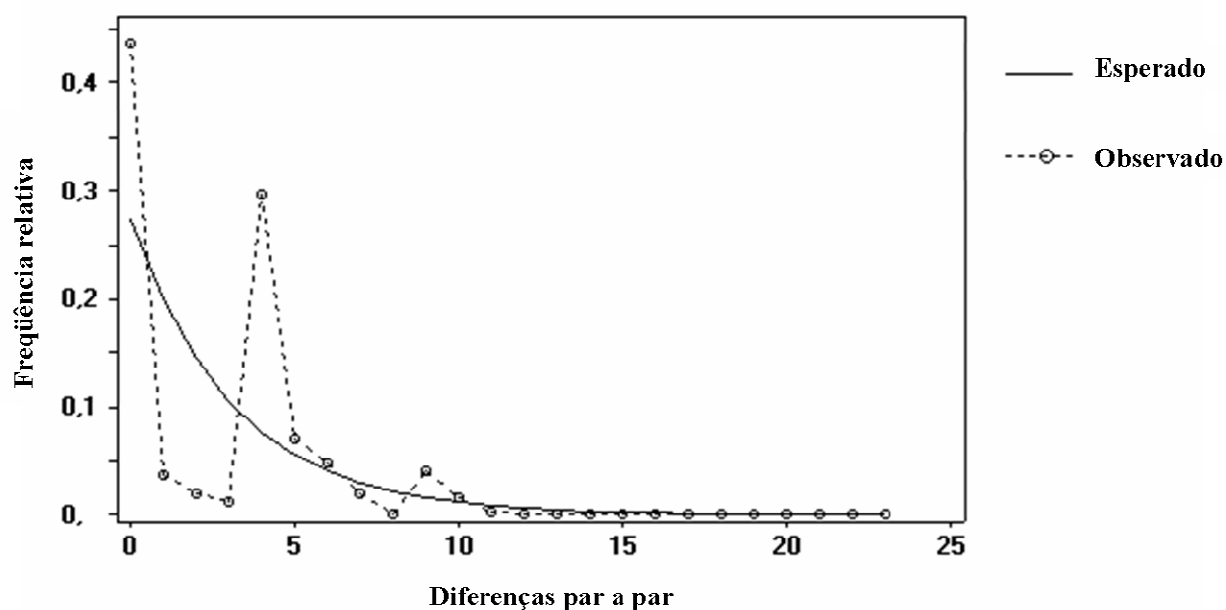


Figura 27. Frequência relativa do número de diferenças par a par resultante do teste de ‘mismatch distribution’ dos haplótipos de *R. neglectus* (linha pontilhada). A linha contínua mostra a distribuição esperada em populações estáveis, ou seja, com tamanho populacional constante (Rogers & Harpending 1992).

4.5.4 Análise filogenética

As árvores filogenéticas de distância (Neighbour-joining – NJ) e parcimônia (MP) das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) (Figuras 28 e 29) apresentaram topologias similares mostrando que *R. neglectus* é uma espécie claramente separada das outras espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* (Bootstrap NJ=98; MP=99) e que a linhagem de *R. neglectus* compartilha um ancestral comum mais recente com a linhagem *R. prolixus*/*R. robustus* I.

A divergência intra-populacional de *R. neglectus* (K2-p) foi maior que a conhecida para populações de *R. prolixus* coletadas em diferentes países e menor que a conhecida para as linhagens de *R. robustus* na Amazônia e Orinoco (Tabela 15). Adicionalmente, o tempo estimado de separação entre *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus* foi entre 2,6 e 3,8 milhões de anos atrás (Maa), no período Plioceno, sendo que a diferenciação das populações de *R. neglectus* poderia ter ocorrido há cerca de 1 Maa, coincidindo com o período Pleistoceno. Finalmente, a moderada estruturação genética nas populações de *R. neglectus* contrasta com a forte estruturação filogeográfica apresentada para as linhagens de *R. robustus* da Amazônia/Orinoco.

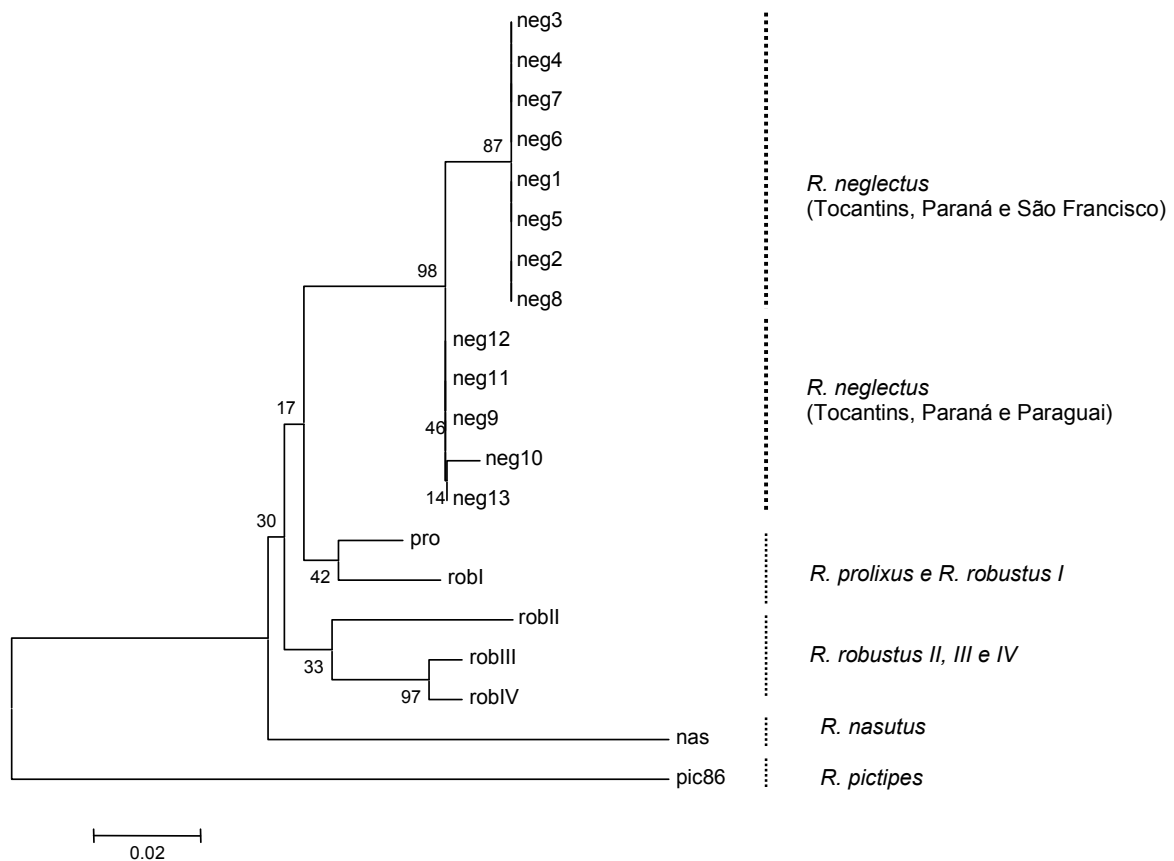


Figura 28. Árvore filogenética (Neighbour-joining) baseada no modelo de distância genética Kimura 2 parâmetros de seqüências do citocromo b (567pb) das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) e *R. pictipes* (grupo externo). Os números indicam o suporte estatístico a partir de 1000 pseudoréplicas.

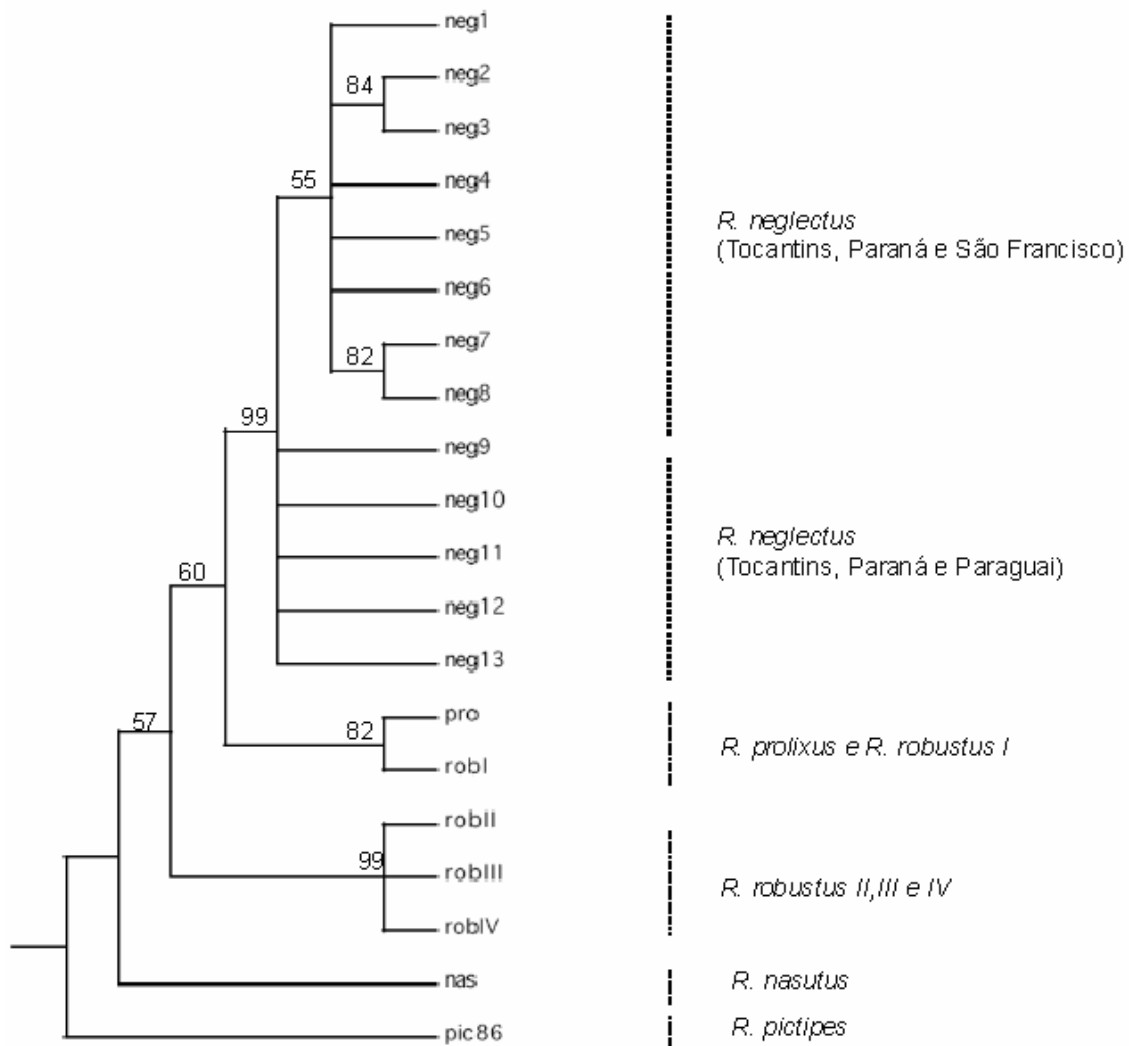


Figura 29. Cladograma de consenso proveniente da análise de parcimônia de seqüências do citocromo b (567pb) das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. neglectus* e *R. nasutus*) e *R. pictipes* (grupo externo). Comprimento = 114, CI = 0,56. Os números indicam o suporte estatístico a partir de 1000 pseudoréplicas.

Tabela 15. Divergência (Kimura 2 parâmetros) e tempo estimado de separação de populações de *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus* com base no polimorfismo de seqüências do citocromo b.

	<i>R. neglectus</i>	<i>R. prolixus</i>	<i>R. robustus</i>
Nº de populações	33	12	14
Nº de indivíduos	144	47	40
Fragmento	567 pb	663 pb	663 pb
Nº de haplótipos	13	3	18
Divergência intra-populacional K2-p (%)	2,1	0,3	4,4 ^a
Tempo estimado de separação em Maa	0,9 ^b a 1,2 ^c	^d	1,9 ^b a 2,4 ^c
Divergência entre <i>R. neglectus</i> e <i>Rhodnius</i> spp. K2-p (%)	-	6,0	7,0
Tempo estimado de separação em Maa	-	2,6 ^b a 3,3 ^c	3,0 ^b a 3,8 ^c

^aConsiderando as linhagens II e III de *R. robustus* (Monteiro *et al.* 2003). ^bAssumindo uma taxa de divergência de 2,3%/Maa para o mtDNA de artrópodes (Brower 1994). ^cAssumindo uma taxa de divergência de 1,8%/Maa para o gene *cytb* de *Triatoma rubida* (Pfeiler *et al.* 2006). ^dNão foi possível calcular.

5. Discussão

5.1 Identificação das espécies de *Rhodnius* que ocorrem em palmeiras e casas no Brasil central

O uso da morfometria em sistemática se baseia na suposição de que a variação de forma é a expressão de diversidade genética; a divergência de características fenotípicas entre dois grupos é considerada como uma medida de distância evolutiva, com diferenças morfométricas claras usualmente sinalizando isolamento entre os grupos (Sorensen & Foottit 1992). Para sustentar esse princípio, as duas principais fontes de variabilidade (genética e ambiental) devem ser separadas; por isso, as técnicas morfométricas objetivam separar a contribuição do tamanho (resultante da variação ambiental) e da forma (resultante da variação genética) (Dujardin *et al.* 2002, Baylac *et al.* 2003). A morfometria geométrica foi explorada no presente estudo para a identificação de ‘espécimes problema’ de *Rhodnius* coletados no Brasil central, comparando-os com populações de referência previamente identificadas. Os resultados mostraram que a forma de asas e cápsulas cefálicas pode ser usada para a identificação acurada, em nível específico, de espécimes similares do grupo *R. prolixus*.

5.1.1. Variação de tamanho

Grandes diferenças de tamanho são frequentemente usadas na sistemática de triatomíneos. As descrições de espécies invariavelmente se referem a medidas lineares, desde comprimento total do corpo até dimensões de estruturas como cápsula cefálica, pronoto, patas ou segmentos da antena (Lent & Wygodzinsky 1979). Desde a década de 1990, quando J.P. Dujardin e seus colaboradores introduziram técnicas morfométricas modernas para o estudo de triatomíneos (Dujardin *et al.* 2002), os resultados de muitas pesquisas sugeriram que a variação de tamanho é muito influenciada pela heterogeneidade ambiental (e.g. Dujardin *et al.* 1997, 1998, 1999b; Schachter-Broide *et al.* 2004). Similaridade ou diferença de tamanho entre triatomíneos podem ser resultado de convergência

(quando duas linhagens geneticamente distintas ocupam o mesmo microhabitat) ou divergência (quando populações geneticamente homogêneas ocupam diferentes microhabitats) (Abad-Franch *et al.* 2003). Conseqüentemente, a variação de tamanho deve ser interpretada com cuidado no contexto da identificação de espécies; a avaliação das tendências alométricas em cada um dos grupos deve ser incorporada nestes estudos comparativos (Dujardin *et al.* 2002).

Os resultados apresentados nesta tese fornecem vários exemplos de como o tamanho pode variar entre as populações e espécies do grupo *R. prolixus*. Era esperado que *R. prolixus* apresentasse maior tamanho que *R. neglectus* (e.g. Lent & Wygodzinsky 1979), mas os resultados das análises de variância usando TC revelaram o contrário para a maioria dos espécimes de *R. neglectus*. Da mesma forma, asas e cápsulas cefálicas de *R. robustus* são geralmente maiores que as de *R. neglectus*, mas o TC de alguns espécimes de *R. neglectus* de Tocantins foi similar ao de *R. robustus*. Os resultados ainda revelaram diferenças de tamanho entre populações de *R. neglectus* com diferentes origens geográficas, como já observado por Soares *et al.* (1999). Adicionalmente, variação de tamanho relacionada ao habitat foi detectada entre populações de *R. nasutus* coletadas em diferentes espécies de palmeiras (Diotaiuti *et al.* 2005).

5.1.2. Variação de forma e alometrias

Padrões de forma tendem a divergir significativamente entre organismos geneticamente distintos. Entretanto, as diferenças podem ser tênues, permanecendo visualmente indetectáveis. Esse é geralmente o caso quando espécies crípticas não são reconhecidas em estudos de sistemática qualitativa. A morfometria geométrica é uma abordagem quantitativa que mostra e compara padrões de forma, sendo muito eficiente para estudar problemas taxonômicos complexos (Baylac *et al.* 2003).

Os padrões de forma da asa são pouco usados na sistemática tradicional de triatomíneos, enquanto que caracteres cefálicos são importantes marcadores taxonômicos. Entretanto, análises multivariadas de características métricas das asas podem discriminar espécies similares e também revelar os padrões de estruturação espacial de populações de uma espécie (Matías *et al.* 2001, Villegas *et al.* 2002, Schachter-Broide *et al.* 2004, Feliciangeli *et al.* 2007). Quando usada para identificar espécimes do grupo *R. prolixus* (*R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. nasutus* e *R. robustus*), a análise discriminante das variáveis de forma das asas apresentou melhores resultados que a das cápsulas cefálicas. Portanto, o uso de asas seria recomendado para identificação de ‘espécimes problema’ no contexto dos programas de vigilância entomológica da doença de Chagas; nos casos duvidosos, a cápsula cefálica poderia ser analisada.

O primeiro modelo discriminante revelou claras diferenças entre *R. prolixus* e *R. neglectus* (Figura 7). Os resultados da variação de forma da cápsula cefálica entre essas espécies foram semelhantes às diferenças qualitativas apontadas por Lent (1954) na descrição original de *R. neglectus*. A partir de comparações de asas e cápsulas cefálicas foi possível concluir que a maioria dos ‘espécimes problema’ analisados (incluindo a população de Mambáí) apresentava forma semelhante a *R. neglectus*.

Os resultados também mostraram divergência significativa de forma entre *R. neglectus* e *R. robustus* (o último com cápsulas cefálicas e asas mais alongadas), mesmo quando o tamanho dos espécimes era similar. O ápice da asa (marco anatômico 4) ficou mais distante do fim da veia cubital (marco anatômico 2) em *R. robustus*. Villegas *et al.* (2002) apresentaram resultados similares, salientando a contribuição desses dois marcos anatômicos nas modificações de forma das espécies do grupo *R. prolixus*. Mudanças de forma (e.g. ápice da asa e posição relativa dos ocelos e olhos) também foram observadas entre *R. neglectus* e *R. nasutus*.

A ausência de tendências alométricas nas comparações da forma das asas em *R. neglectus* e *R. prolixus* sugere que a variação de forma desta estrutura deve refletir principalmente variação genética. Por outro lado, as diferenças na forma da cápsula cefálica foram significativamente influenciadas pelo tamanho. Esses resultados indicam que diferenças de forma de asa devem ser menos sensíveis às mudanças de tamanho quando comparada com a cápsula cefálica; porém, os mecanismos associados a esta tendência não são evidentes e devem ser investigados. Finalmente, os componentes alométricos nas análises morfométricas das asas de *R. neglectus-robustus-nasutus* foram menores que os descritos para *R. prolixus* e *R. robustus* por Villegas *et al.* (2002).

5.1.3 Qual espécie de *Rhodnius* ocorre em casas no Brasil central?

O grupo *R. prolixus* é formado por quatro espécies similares com diferente importância epidemiológica. *R. prolixus* é o principal vetor domiciliado de *T. cruzi* ao norte da Amazônia; espécimes de *R. neglectus* invadem e eventualmente colonizam ambientes artificiais no Cerrado brasileiro, enquanto que os de *R. nasutus* possuem um comportamento similar em áreas semi-áridas na Caatinga. Finalmente, espécimes do complexo *R. robustus* invadem (mas não colonizam) casas nas bacias do Amazonas e do Orinoco (Venezuela). Para qualquer uma das espécies desse grupo, alguns registros de ocorrência baseados na identificação dos espécimes usando morfologia qualitativa e padrões cromáticos podem ter sido feitos incorretamente. Registros incorretos podem ser usados para definir a distribuição geográfica da espécie, levando a interpretações biogeográficas erradas e estimativas de risco de transmissão equivocadas (Monteiro *et al.* 2001).

O questionamento da presença de *R. prolixus* (um vetor extremamente eficiente) no Brasil ilustrou essas dificuldades (Dujardin *et al.* 1991). Colônias de *R. prolixus* e espécimes peridomésticos de *R. neglectus* de Mambáí apresentaram padrões isoenzimáticos idênticos e ambos diferiram da população de referência de *R. neglectus* da FIOCRUZ. Foi então sugerido que outra

espécie além de *R. neglectus*, e relacionada a *R. prolixus*, estava invadindo as casas na áreas de estudo (Dujardin *et al.* 1991). Essas conclusões foram apenas sugestivas, pois se basearam na análise de colônias de laboratório antigas que podem ter sido contaminadas ao longo dos anos de manutenção. Esse é um problema sério quando as espécies investigadas são similares e possuem ainda compatibilidade reprodutiva (Barrett 1996, Pavan & Monteiro 2007).

No presente estudo, os resultados baseados na comparação de espécimes coletados no campo (palmeiras e casas) apresentam fortes evidências morfométricas sugerindo que espécimes de *R. neglectus* estão invadindo (e eventualmente colonizando) as casas e anexos no Brasil central. *R. robustus* e *R. nasutus* também devem ocorrer em casas na Amazônia e Caatinga, respectivamente, mas *R. prolixus* está ausente na área de estudo. Esses resultados foram confirmados usando seqüências de DNA mitocondrial (citocromo b) de alguns espécimes e populações analisadas.

5.2 Variação de tamanho entre as populações de *Rhodnius neglectus*

A variação de tamanho intra-específica permite distinguir populações de triatomíneos que ocupam ecótopos diferentes. Esta abordagem foi usada para discriminar populações silvestres/domésticas e aplicada para estudar o fenômeno de reinfestação domiciliar após intervenções de controle químico (Dujardin *et al.* 2002). Há uma clara redução de tamanho em triatomíneos durante a transição dos ambientes silvestres para os domésticos. Adicionalmente, populações de triatomíneos mantidas em condições de laboratório tendem a mostrar redução de tamanho em relação às populações silvestres da mesma espécie (Jaramillo *et al.* 2002, Rodríguez-Rodríguez *et al.* 2007). Espécimes grandes em ambientes silvestres aumentariam a capacidade de estoque de alimento (sangue), característica que poderia trazer vantagens em ambientes instáveis, onde as fontes alimentares não estão constantemente disponíveis. Por outro lado, indivíduos menores poderiam sobreviver mais em condições de laboratório (ou domésticas), onde a

disponibilidade de alimento é menos restrita (Dujardin *et al.* 1997). Entretanto, a variação de tamanho também pode ser resultante de divergências genéticas causadas por isolamento geográfico. Para *R. neglectus*, a primeira hipótese é mais congruente com os resultados moleculares apresentados, já que não houve evidência de isolamento geográfico por distância das populações estudadas. A variação de tamanho em relação ao sexo, com fêmeas de *R. neglectus* maiores que machos já era esperada, sendo uma característica conhecida dos triatomíneos (Lent & Wygodzinsky 1979).

A variação intra-específica de tamanho foi estudada para algumas espécies de *Rhodnius*, como *R. prolixus* (Dujardin *et al.* 1998a), *R. ecuadoriensis* (Abad-Franch 2003) e *R. nasutus* (Diotaiuti *et al.* 2005, Dias 2007). Adicionalmente, Soares *et al.* (1999) apresentaram um estudo morfométrico preliminar de *R. neglectus*, mostrando clara divergência de tamanho entre populações de Goiás e Minas Gerais. Entretanto, poucos estudos foram feitos relacionando a variação morfométrica intra-específica com variáveis climáticas ou ao longo de outros gradientes ecológicos. Abad-Franch (2003) apresentou evidência de um cline norte-sul de redução de tamanho em populações de *R. ecuadoriensis*, desde espécimes grandes coletados em palmeiras (Pichincha, norte do Ecuador) até espécimes sinantrópicos pequenos coletados no sul do Ecuador e norte do Peru; espécimes silvestres coletados 250 km ao sul de Pichincha (Manabí) apresentaram tamanho intermediário. Diotaiuti *et al.* (2005) mostraram divergência de tamanho entre populações de *R. nasutus* coletadas em diferentes espécies de palmeiras; o tamanho de espécimes provenientes de *Copernicia prunifera* (carnaúba) foi significativamente menor que o dos provenientes de *Attalea speciosa* (babaçu), mostrando a influência do microhabitat sobre o tamanho desses triatomíneos. O presente estudo não mostrou variação de tamanho em populações de *R. neglectus* coletadas em ninhos de gravetos ou de folhas presentes na palmeira *Mauritia flexuosa*; porém, estudos posteriores

comparando o tamanho de populações de *R. neglectus* em diferentes espécies de palmeiras poderiam apresentar resultados semelhantes aos observados por Diotaiuti *et al.* (2005).

Foi observada correlação positiva e significativa entre tamanho das asas e, principalmente, cápsulas cefálicas dos espécimes das populações de *R. neglectus* e a temperatura. Apesar do resultado ser inédito para triatomíneos, alguns estudos experimentais têm mostrado a influência da temperatura na morfologia de insetos (e.g. Bitner-Mathé & Klaczko 1999). Vários padrões ecológicos e evolutivos (regras ecogeográficas) associando tamanho com variáveis ambientais foram descritos, entre eles a regra de Bergmann (Atkinson & Simbly 1997) e a regra de Bergmann reversa (Mousseau 1997). De acordo com a primeira regra, espécimes maiores são esperados em ambientes mais frios, uma consequência da seleção relacionada à conservação do calor. Já a segunda regra sugere o oposto, que espécimes menores são esperados nos pólos e ambientes frios devido a ciclos mais curtos em resposta às curtas estações, que limitariam o tempo necessário para alimentação e, conseqüentemente, o crescimento. Em uma análise comparativa recente sobre a aplicação dessas regras ecogeográficas na variação de tamanho de várias espécies de artrópodes Blanckenhorn & Demont (2004) mostraram que ambas as regras (Bergmann e Bergmann reversa) são muito comuns entre os artrópodes.

5.3 Comparação entre a análise morfométrica (asas/cápsulas cefálicas) e molecular (citocromo b) das populações de *Rhodnius*

Nas análises morfométricas não foram observadas divergências significativas de forma de asas e cápsulas cefálicas entre as populações de diferentes bacias hidrográficas, concordando com a análise filogeográfica de *R. neglectus* do Brasil central baseada em seqüências do citocromo b. Apesar de diferenças de forma (principalmente o alongamento da região anteocular das cápsulas cefálicas) terem sido observadas entre populações de uma mesma bacia e até entre indivíduos de

uma mesma população, não foi possível relacionar essa característica morfológica com as diferenças genéticas entre as populações. Adicionalmente, espécimes com haplótipos diferentes apresentaram forma de asa muito semelhante, não permitindo a separação em grupos distintos na análise discriminante de asa (Figura 30).

Em análises morfométrias intra-específicas, o alongamento da cápsula cefálica está relacionado com o tamanho dos espécimes e, conseqüentemente, pode ser influenciado por variáveis ambientais como mostrado para *R. neglectus* no presente estudo. Indivíduos maiores têm cabeças mais alongadas enquanto indivíduos menores apresentam cabeças mais curtas e compactas. Esse padrão foi observado na análise morfométrica de populações de *R. neglectus*: valores elevados de PC2 foram relacionados com cabeças mais alongadas enquanto valores menores foram relacionados com cabeças mais curtas. Adicionalmente, PC2 apresentou relação com tamanho dos indivíduos, confirmando a relação entre tamanho e forma da cabeça. Analisando este fenômeno em diferentes espécies de triatomíneos, Patterson (2007) sugeriu um mecanismo de evolução da cápsula cefálica dos triatomíneos relacionado com a capacidade de ingestão de sangue. Cápsulas cefálicas longas e estreitas permitiriam uma hematofagia contínua à distância. Essa estratégia alimentar dificultaria a percepção dos hospedeiros à presença do triatomíneo e, conseqüentemente, uma hematofagia mais eficiente para populações/espécies maiores. Já triatomíneos com cabeças curtas dependeriam de uma associação mais próxima com seus hospedeiros; nesse caso tamanho menor seria uma adaptação eficiente para ficar sobre o hospedeiro sem serem percebidos, garantindo também uma hematofagia eficiente.

Segundo Lent & Wygodzinsky (1979), a cápsula cefálica dos triatomíneos possui características muito importantes para a classificação das espécies. Entretanto, em análises populacionais a variação morfométrica das cápsulas cefálicas pode ser resultado da plasticidade fenotípica e de pressões seletivas, não estando fortemente relacionada com a variação genética.

Patterson (2007) também comparou a morfometria alar e cefálica com os resultados de análises genéticas em triatomíneos; os resultados sugerem que a forma das asas está mais influenciada pelas diferenças genéticas entre as populações do que a forma das cápsulas cefálicas, cuja variação depende de diferenças ecológicas. Assim, as cápsulas cefálicas provavelmente refletem o efeito de pressões seletivas em curto prazo, enquanto a taxa de variação de forma das asas se correlaciona mais fortemente com a taxa de acúmulo de mutações. Resultado semelhante foi obtido para *R. neglectus*; as cápsulas cefálicas apresentaram maior variação de tamanho, sinais de alometria e fraca relação entre forma e haplótipos específicos. Dessa forma, essa estrutura não seria um bom marcador para estimar diferenças genéticas entre populações de *Rhodnius*.

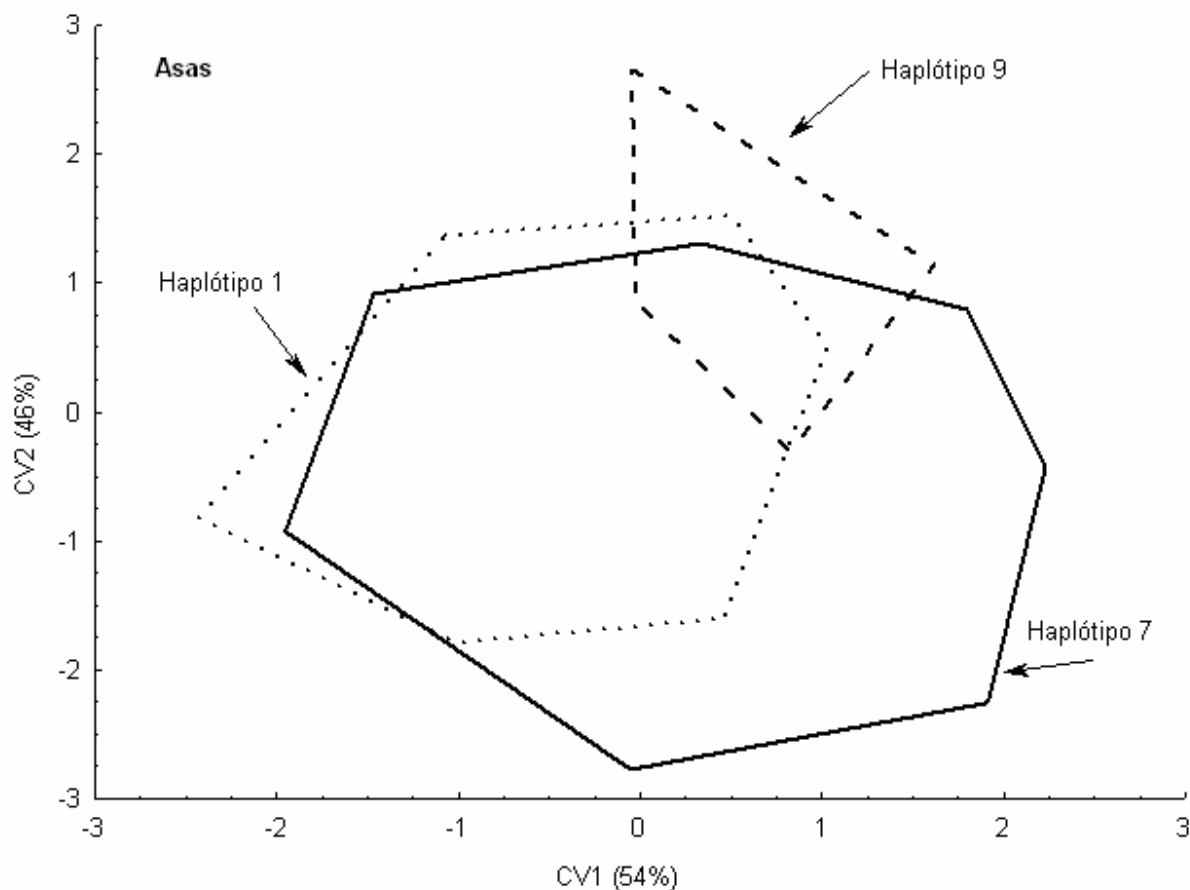


Figura 30. Mapa fatorial mostrando a variação de forma de asas de espécimes de *Rhodnius neglectus* com diferentes haplótipos do gene citocromo b (mt DNA). Os eixos representam as variáveis canônicas CV1 e CV2 derivadas da análise discriminante das variáveis de forma (deformações parciais e componentes uniformes). A distribuição geográfica dos haplótipos e respectivas populações estão apresentadas na Tabela 13.

Por outro lado, Fitzpatrick (2005), comparando morfometria geométrica de asas, seqüenciamento do citocromo b e uso de microssatélites para estudar populações de *R. prolixus* na Venezuela, mostrou que, apesar da morfometria detectar diferenças importantes de forma entre as populações domésticas e silvestres, houve uma convergência de forma nas populações que ocuparam um mesmo ecótopo, indicando que a morfometria alar também teria um uso limitado para estimar distâncias genéticas entre populações. Os resultados obtidos no presente estudo para populações de *R. neglectus* (Figura 30) também estão de acordo com Fitzpatrick (2005).

Em análises interespecíficas os resultados da morfometria geométrica de cápsulas cefálicas e asas não apresentaram resultados similares analisando os dendrogramas UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) derivados das distâncias de Mahalanobis (Figura 31). A morfometria da cápsula cefálica agrupou *R. nasutus* e *R. robustus*, sendo estes claramente separados de *R. prolixus*. Mais uma vez, esses resultados refletiram a principal alteração morfológica das cápsulas cefálicas de *Rhodnius*, o alongamento da região anteocular; *R. prolixus* foi a espécie mais divergente apresentando cápsulas muito curtas quando comparado com as outras espécies do ‘grupo *R. prolixus*’. Usando esse critério morfológico dois grupos de *R. neglectus* foram observados: espécimes de Alto Paraíso-GO e Buritizal-SP apresentaram cápsulas cefálicas mais curtas do que espécimes de Diamantino-MT, N.S. Livramento-MT e Taguatinga-TO. Esse agrupamento contrasta claramente com os dados moleculares que agruparam os espécimes de Alto Paraíso e populações do Mato Grosso, separando estes últimos da população de Taguatinga-TO (Figura 32).

O dendrograma UPGMA de asas (Figura 31) apresentou uma pequena distância entre as populações de *R. neglectus* de Taguatinga-TO e Mato Grosso (N.S. Livramento e Diamantino). Entretanto, essas populações apresentaram relevante divergência genética baseada no seqüenciamento do fragmento do citocromo b analisado. Esses resultados sugerem que as asas também não são bons marcadores para analisar a estrutura genética de populações. Analisando as

relações interespecíficas a partir desse dendrograma, observa-se que *R. neglectus* estaria mais próximo de *R. nasutus*, concordando com outros estudos baseados em padrões isoenzimáticos (Chávez *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2002) e morfologia (Lent & Wygodzinsky 1979, Harry 1993). Entretanto, análises usando marcadores nucleares e mitocondriais têm incluído *R. neglectus* em linhagens próximas a *R. robustus* e *R. prolixus* (Lyman *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2000, Hypsa *et al.* 2002, Paula *et al.* 2005), o que está de acordo com o presente estudo. Futuras análises incluindo mais populações de *R. nasutus* podem ajudar a esclarecer as relações evolutivas entre as espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*.

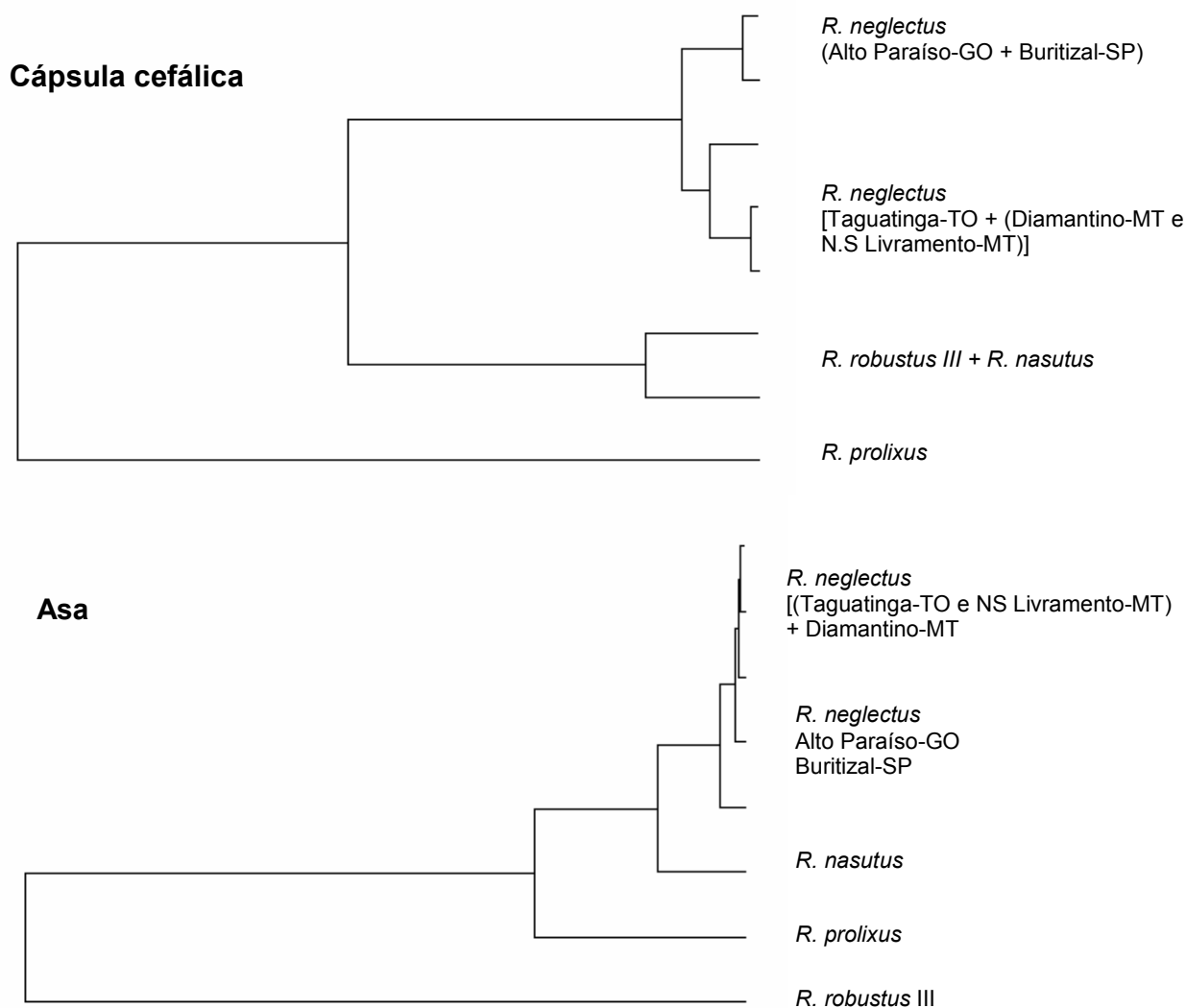


Figura 31. Dendrogramas UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) derivados das distâncias de Mahalanobis calculadas a partir das variáveis de forma resultantes da morfometria geométrica de cápsulas cefálicas (acima) e asas (abaixo) das populações de *R. neglectus* (Alto Paraíso-GO, Buritizal-SP, Taguatinga-TO, Diamantino-Mt e Nossa Senhora do Livramento-MT) e outras espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*: *R. robustus* [Marabá-PA, linhagem III segundo mapa biogeográfico de Abad-Franch & Monteiro (2007)], *R. prolixus* (Colômbia) e *R. nasutus* (Sobral-CE).

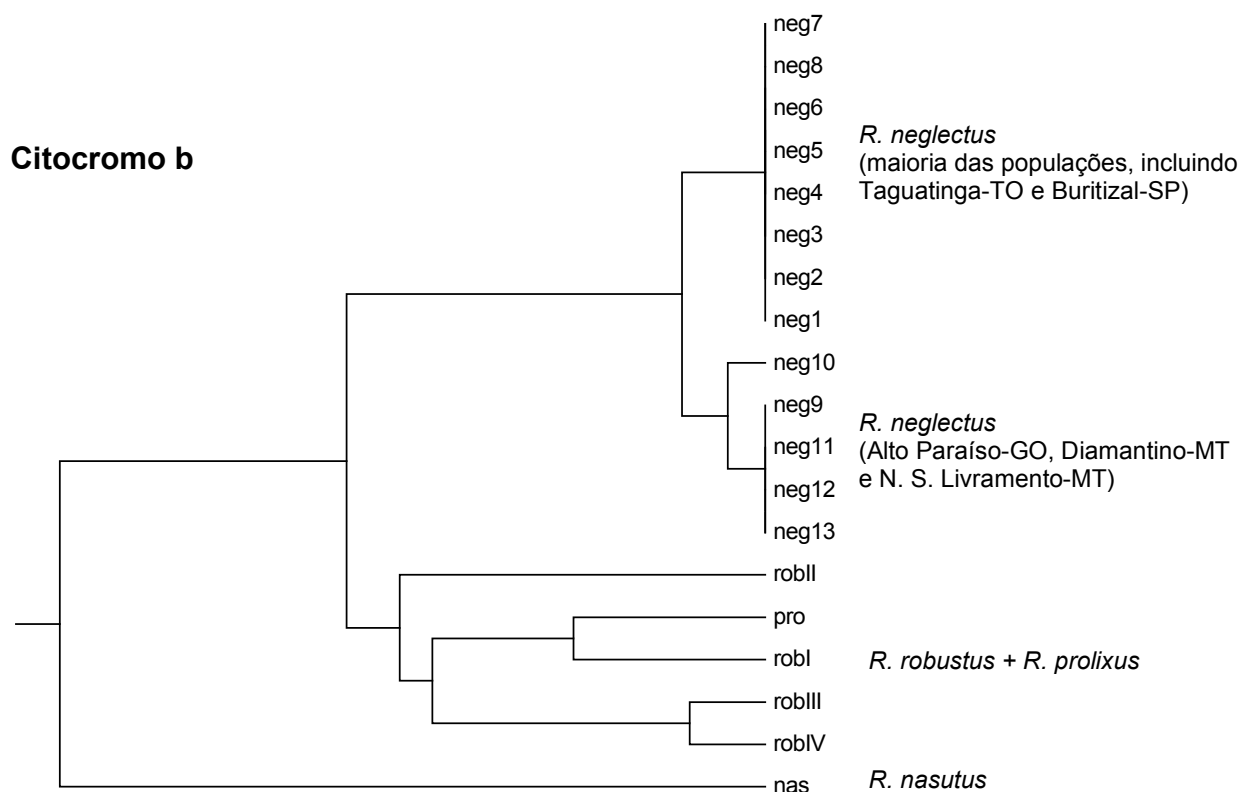


Figura 32. Dendrograma UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) baseado no modelo de distância genética Kimura 2 parâmetros de seqüências do citocromo b (567pb) das populações e espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*: *R. neglectus* (Alto Paraíso-GO, Buritizal-SP, Taguatinga-TO, Diamantino-MT e Nossa Senhora do Livramento-MT), *R. robustus* [linhagens I, II, III e IV segundo Abad-Franch & Monteiro (2007)], *R. prolixus* (Colômbia) e *R. nasutus* (Sobral-CE).

5.4 O status taxonômico de *Rhodnius neglectus*

O estudo suporta o argumento que *R. neglectus* é uma espécie claramente separada das outras espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*, confirmando uma série de evidências morfológicas (Lent & Wygodzinsky 1979, Harry 1993, Catalá & Schofield 1994) e moleculares (Chávez *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2000, 2002, Soares *et al.* 2000). A árvore filogenética baseada em seqüências do citocromo b também mostrou que *R. neglectus* estaria mais proximamente relacionada com *R. robustus* / *R. prolixus* do que com *R. nasutus*. Tradicionalmente, *R. neglectus* tem sido relacionada a *R. nasutus* a partir de características morfológicas similares (Lent & Wygodzinsky 1979, Harry 1993) e padrões isoenzimáticos (Chávez *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2002). Entretanto, análises usando marcadores nucleares e mitocondriais tem incluído *R. neglectus* em linhagens próximas a *R. robustus* e *R. prolixus* (Lyman *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2000, Hypša *et al.* 2002, Paula *et al.* 2005), o que está de acordo com o presente estudo.

Adicionalmente, o presente estudo não suporta a existência de um complexo *R. neglectus* formado por grupos monofiléticos separados por grandes distâncias genéticas e estruturados geograficamente, como já demonstrado para *R. robustus* na Amazônia (Monteiro *et al.* 2003). Apesar de alguns espécimes das populações da Chapada dos Veadeiros (nordeste de Goiás, principalmente Alto Paraíso) e da bacia do Paraguai (sul do Mato Grosso) terem sido separados de outros das populações de *R. neglectus* do Brasil por uma distância de até 2,1% (Kimura 2-p), não foi possível relacionar nenhum padrão morfológico (coloração, forma da asa e cápsula cefálica) com as diferenças genéticas. Além disso, a análise de parcimônia mostrou que os haplótipos de *R. neglectus* formaram um grupo monofilético bem suportado (Bootstrap=99) claramente separado das outras espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*. Essas evidências sugerem que *R. neglectus* seja uma unidade taxonômica em vez de um agrupamento de duas espécies crípticas.

Entretanto, em Alto Paraíso, haplótipos de ambos os agrupamentos foram encontrados em uma mesma palmeira (Rne1 pertencente ao clado que incluiu a maioria das populações do leste do Brasil e Rne9, encontrado somente em Alto Paraíso e populações do oeste de Goiás e Mato Grosso) e não foram observadas diferenças morfológicas marcantes entre esses indivíduos. Como os caracteres morfológicos não permitiram testar essa hipótese (ausência de relação clara entre a morfologia e haplótipos), futuros estudos analisando outro gene (preferencialmente nuclear) com um número maior de seqüências dessas populações (Alto Paraíso e populações do leste de Goiás e Mato Grosso) são necessários para avaliar se há mais de uma unidade panmíctica nas áreas onde os grupos leste e oeste ocorrem em simpatria, como no caso de Alto Paraíso.

5.5 Infestação de *Mauritia flexuosa* por *Rhodnius neglectus* no Brasil central

5.5.1 Frequência de *R. neglectus* em *M. flexuosa*

Aspectos populacionais de *R. neglectus* são conhecidos em condições de laboratório (Mello 1977, Heitzmann-Fontenelle 1984, Canale *et al.* 1999, Rocha *et al.* 2001) e em palmeiras em ambientes silvestres (e.g. Diotaiuti & Dias 1984, Gurgel-Gonçalves & Cuba 2007). Especificamente em *M. flexuosa*, os estudos mostram que há grande variação na frequência de ocorrência e densidade de *R. neglectus*. Em Uberaba-MG, a frequência de *R. neglectus* em 32 palmeiras amostradas foi de 93,7% com densidade de 15,6 indivíduos por palmeira (Barretto *et al.* 1969), em Mambai-GO essa frequência foi de 65,6% e densidade de 4,2 indivíduos por palmeira, pesquisando o mesmo número de palmeiras (Mello 1982) e em Frutal-MG a frequência foi 69,2% e densidade de 9,5 indivíduos por palmeira, em treze palmeiras amostradas (Forattini *et al.* 1983). Gurgel-Gonçalves *et al.* (2004) apresentaram uma frequência de 12 a 40% e densidade de 3,3 a 9,8 indivíduos por palmeira nas cinco áreas amostradas no Distrito Federal. No presente estudo a frequência variou de 11 a 100% e

densidade de 1 a 124 indivíduos por palmeira nas 40 áreas amostradas no Cerrado. A variação observada nos valores de frequência e densidade deve ser resultante dos métodos de amostragem (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2003) e também do tamanho da amostra, entretanto, esses resultados indicam que a palmeira *M. flexuosa* é um ecótopo favorável para a manutenção de populações de *R. neglectus* no bioma Cerrado.

5.5.2 Estrutura etária das populações

O predomínio de ninfas de *R. neglectus* nas populações está de acordo com a estrutura etária geralmente observada em populações de *Rhodnius* em palmeiras, com razão adulto/ninfa inferior a 1,00 variando entre 0,36 e 0,90 (Pizarro & Romaña 1998). Os machos foram mais abundantes na maioria das populações (razão macho/fêmea, média: 2,0); na cidade de Goiás 82% dos adultos eram machos. Esse padrão também já foi observado por Mello (1981) em populações de *R. neglectus* coletadas na palmeira *Acrocomia aculeata*, apresentando razão macho/fêmea (média) de 1,5; em algumas palmeiras 90% dos insetos adultos eram machos. Seria interessante analisar a razão macho/fêmea em outros estudos populacionais de *R. neglectus*; entretanto a maioria desses estudos apresenta somente a quantidade de adultos nas populações, não separando por sexo.

A razão macho/fêmea em condições de laboratório é aproximadamente 1 (1 macho: 1 fêmea). Entretanto, em populações silvestres de triatomíneos essa proporção pode variar, como observado em *Panstrongylus geniculatus*, com uma maior quantidade de machos capturados durante a estação seca (Naiff *et al.* 1998). Em populações silvestres de *Triatoma dimidiata* também foi observada uma maior quantidade de machos em diferentes regiões na Costa Rica, variando de 1,4 a 6,5 machos/fêmea (Zeledón *et al.* 2001). Adicionalmente, Monroy *et al.* (2003) sugerem haver uma relação entre abundância dos machos e mobilidade em populações de *T. dimidiata*, pois machos têm maior capacidade de vôo que fêmeas. Esses autores sugerem ainda que quanto maior a estabilidade

ambiental, menores são as diferenças na proporção de machos e fêmeas. Dessa forma, futuros estudos comparando a razão macho/fêmea entre populações silvestres e respectivas gerações de laboratório de *R. neglectus* poderiam contribuir para elucidar essa questão. Para outros grupos de insetos, a alimentação influencia a proporção de machos e fêmeas na população; em Lepidoptera (e.g. *Thyriniteina arnobia*) a razão macho/fêmea foi quatro vezes maior em populações cuja dieta incluiu eucalipto (Santos *et al.* 2000).

5.5.3 Fatores relacionados à variação da densidade de insetos por palmeira e índices de infecção por tripanossomatídeos

Fatores climáticos podem afetar a duração do ciclo biológico, a distribuição, a dispersão pelo vôo, o número de repastos e até a probabilidade de transmissão de *T. cruzi* pelos triatomíneos (Curto de Casas *et al.* 1999). O ciclo biológico de *R. neglectus* em condições de laboratório é muito rápido em comparação a outras espécies de triatomíneos, variando de 81 a 225 dias, dependendo das condições de temperatura e umidade relativa (Silva & Silva 1988, Canale *et al.* 1999). Para *R. neglectus*, Rocha *et al.* (2001) mostraram nítida correlação entre temperaturas mais altas e diminuição do período embrionário e período médio de desenvolvimento ninfal em condições de laboratório. No presente estudo não foi observada relação entre a densidade de insetos por palmeira e características ambientais das 40 áreas estudadas. Em condições naturais, a influência das variações climáticas do ambiente pode ser minimizada para as espécies de triatomíneos que vivem em palmeiras. Segundo Lorenzo *et al.* (2003), a variação de temperatura e umidade na base das folhas das palmeiras é menor do que a do ambiente externo, favorecendo o desenvolvimento das colônias silvestres em condições climáticas mais estáveis.

O microhabitat (tipo de material presente na bainha foliar da palmeira) influenciou a densidade de insetos por palmeira. Esse resultado confirma em uma escala mais ampla (bioma

Cerrado) observações já realizadas por Gurgel-Gonçalves *et al.* (2004) e Gurgel-Gonçalves & Cuba (2007) mostrando que a existência de ninhos de aves (principalmente *Phacelodomus ruber*, construídos com gravetos) nas bainhas foliares da palmeira é um dos principais fatores determinantes da abundância de *R. neglectus* em *M. flexuosa*. A presença de populações de *R. neglectus* em ninhos de aves explicaria os baixos índices de infecção observados no presente estudo (índice global: 3,8%), quando comparados com outras espécies de *Rhodnius* em palmeiras na Amazônia que apresentam índices de infecção muito altos alimentando-se principalmente de mamíferos (e.g. Miles *et al.* 1983). Entretanto *R. neglectus* também alimenta-se de forma eficiente em mamíferos (Diotaiuti & Dias 1987) e altos índices de infecção dessa espécie por *T. cruzi* e *T. rangeli* já foram descritos na literatura (Ramírez *et al.* 2002); a aparente preferência alimentar por sangue de ave (demonstrada em vários estudos usando reações de precipitina, e.g. Diotaiuti & Dias 1984) deve ser circunstancial e não seletiva na busca por sangue com o qual o triatomíneo obteria melhor desenvolvimento. Finalmente, em algumas palmeiras onde foram encontrados espécimes de *R. neglectus* infectados por *T. cruzi* (e.g. Riberão Cascalheira-MT), gambás (*Didelphis albiventris*) e tamanduás (*Tamandua tetradactyla*) foram observados na bainha foliar de *M. flexuosa*. Dessa forma, o baixo índice de infecção de *R. neglectus* por tripanossomatídeos observado no presente estudo não deve ser interpretado como uma evidência de menor susceptibilidade dessa espécie de triatomíneo ao parasito.

5.6 Influência de variáveis ambientais na distribuição geográfica de *Rhodnius neglectus*

Os resultados indicaram áreas potenciais de ocorrência de *R. neglectus* na América do Sul usando modelagem de nicho ecológico (GARP) baseada em variáveis ambientais como temperatura, precipitação e índices de vegetação. Alguns estudos avaliaram a influência de fatores climáticos na distribuição e abundância de triatomíneos (e.g. Curto de Casas *et al.* 1999, Costa *et al.* 2002), mostrando os limites de temperatura e precipitação dentro dos quais cada espécie pode ocorrer. Elevadas densidades populacionais de triatomíneos estão associadas a temperaturas altas e biomas com estações secas prolongadas (Carcavallo 1999). Segundo Gorla (2002) a temperatura é um bom indicador da distribuição geográfica de *T. infestans* na América do Sul. Implicações para a vigilância vetorial da doença de Chagas podem ser obtidas a partir desses estudos. Por exemplo, Abad-Franch & Monteiro (2007) sugerem que a infestação domiciliar de triatomíneos está restrita às regiões mais secas da Amazônia, enquanto que populações adaptadas a microhabitats extremamente úmidos teriam limitada capacidade de colonizar ambientes artificiais. Adicionalmente, todas as espécies de *Rhodnius* que apresentam capacidade de colonizar ambientes artificiais (principalmente *R. prolixus*, mas também *R. neglectus* e *R. nasutus*) derivaram de linhagens ancestrais adaptadas a climas áridos e semi-áridos. Nesse sentido, mapas de risco mostrando o potencial de domiciliação de vetores poderiam ser produzidos a partir de dados climatológicos, sendo uma ferramenta potencialmente importante para auxiliar as estratégias de vigilância vetorial. Além disso, a influência das mudanças climáticas globais pode ser avaliada futuramente nos modelos para estudar as suas consequências nos padrões de distribuição desses insetos, incluindo *R. neglectus*.

Os índices de vegetação também foram variáveis importantes para prever a distribuição geográfica potencial de *R. neglectus*. O NDVI é muito usado no estudo da distribuição potencial de vetores (Herbreteau *et al.* 2005) por ser uma variável que integra efeitos da temperatura,

precipitação e propriedades do terreno. Esse índice foi o que melhor explicou a distribuição geográfica de *T. infestans* na América Latina (Gorla 2002) em comparação com as outras variáveis estudadas (temperatura do ar, temperatura de superfície, radiação infravermelha e déficit de pressão de vapor).

A interação entre *R. neglectus* e algumas espécies de palmeiras também deve explicar os padrões de distribuição observados. No bioma Cerrado, um dos principais indicadores da ocorrência de populações de *R. neglectus* é a presença da palmeira *Mauritia flexuosa* (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2003, 2004, 2007). Porém, a modelagem de nicho ecológico de *R. neglectus* não mostrou áreas potenciais de ocorrência da espécie na bacia Amazônica, onde *M. flexuosa* é freqüente, sugerindo que essa palmeira não seria um bom indicador de *R. neglectus* fora do bioma Cerrado. Outras espécies de palmeiras são consideradas habitats relevantes de *R. neglectus* no Brasil (Carcavallo *et al.* 1997). A sobreposição entre os registros de ocorrência de *R. neglectus* obtidos no presente estudo e os limites de ocorrência dessas palmeiras indicou que *Syagrus oleracea* e *Acrocomia aculeata* também favorecem a manutenção de populações de *R. neglectus* no bioma Cerrado. Por outro lado, palmeiras como *Attalea speciosa* favorecem a ocorrência de *R. neglectus* fora dos limites deste bioma, principalmente em áreas de transição Cerrado-Amazônia e Cerrado-Caatinga.

A presença de manchas de Cerrado na Caatinga e Amazônia (Prance, 1982) e a ocorrência de *R. neglectus* em áreas de transição também sustentariam a distribuição geográfica potencial apresentada no presente estudo. As áreas de transição são mosaicos de dois ou três tipos de vegetação que podem ser observadas no limites do Cerrado com outros biomas, incluindo vegetação intermediária (e.g. babaçuais).

5.7 Influência de fatores históricos na distribuição geográfica atual de *Rhodnius neglectus*

Várias evidências sugerem que a tribo Rhodniini é de origem amazônica (Abad-Franch & Monteiro 2007). Algumas linhagens de *Rhodnius* dispersaram para ecorregiões áridas ou semi-áridas, particularmente os Llanos Venezuelanos-Colombianos (ao norte) e o Cerrado/Caatinga (ao sul). Algumas dessas linhagens devem ter estabelecido associações ecológicas com espécies de palmeiras de áreas secas (*R. prolixus-Copernicia tectorum*, *R. nasutus-C. prunifera* e *R. neglectus-Acrocomia* spp.) ou de áreas úmidas presentes nesses biomas (*R. neglectus* e *R. nasutus-M. flexuosa* em brejos e veredas da Caatinga e Cerrado, respectivamente). Outras linhagens (e.g. *R. domesticus*, restrita à Floresta Atlântica) ficaram isoladas das linhagens amazônicas (e.g. complexo *R. robustus*) quando os corredores de floresta úmida que ligavam essas regiões desapareceram. A evidência de um “corredor de savana” ou de “formações abertas em diagonal”, formado pelas províncias biogeográficas Chaco-Cerrado-Caatinga (Prado & Gibbs 1993, Morrone 2006) deve ter favorecido a dispersão de *R. neglectus* na província do Cerrado e, eventualmente, na Caatinga do nordeste do Brasil. Dessa forma, a hipótese biogeográfica é que a distribuição de *R. neglectus* acompanha o “corredor de savana”. A distribuição potencial apresentada no presente estudo está de acordo com esta hipótese, pois, apesar de indicar o Cerrado como principal área de ocorrência de *R. neglectus*, sugere que a espécie está provavelmente presente na Caatinga e no Chaco boliviano.

Uma amostragem mais ampla de *R. neglectus* nessas regiões permitiria confirmar as áreas preditas e reforçar essa hipótese. A análise genética das populações do oeste (e.g. Mato Grosso do Sul, Bolívia) e nordeste (e.g. Pernambuco, Paraíba) também permitiria verificar as relações entre os haplótipos do Brasil central observados neste estudo com os observados nas áreas extremas desse corredor savânico, analisando com mais detalhes os possíveis processos e rotas de dispersão de *R. neglectus* nessas áreas. O padrão biogeográfico descrito acima não está de acordo com o apresentado

por Paula *et al.* (2006), sugerindo que *R. neglectus* tem origem na Floresta Atlântica. Finalmente, futuros estudos usando modelagem de nicho ecológico para prever a distribuição geográfica de outras espécies da tribo Rhodniini podem auxiliar a esclarecer esses padrões biogeográficos.

5.8 Mecanismos de dispersão de *Rhodnius neglectus*

Estudos pioneiros sobre dispersão de triatomíneos foram feitos com *Rhodnius prolixus* na Venezuela. Inicialmente, verificou-se a possibilidade de transporte passivo, a partir de materiais de construção e de animais (Gamboa 1962). Posteriormente, com a utilização da técnica de marcação radioativa, foi comprovada a existência de dispersão ativa (Gómez-Nuñez 1969). No Brasil, a capacidade de dispersão de *R. neglectus* foi estudada usando galinheiros artificiais próximos de palmeiras (Forattini *et al.* 1971, 1979). A invasão dos galinheiros durante os 15 meses de acompanhamento demonstrou a ocorrência e dispersão ativa de *R. neglectus*. O vôo é um dos principais mecanismos envolvidos em deslocamentos de longa distância em insetos. Fatores como temperatura, estado nutricional, reprodução e densidade populacional podem influenciar a dispersão ativa pelo vôo em triatomíneos (Schofield *et al.* 1992, McEwen & Lehane 1993, 1994, McEwen *et al.* 1993, Noireau & Dujardin 2001).

Espécies da tribo Rhodniini, incluindo os gêneros *Psammolestes* e *Rhodnius*, possuem substâncias secretadas durante a oviposição que aderem seus ovos ao substrato (Carcavallo *et al.* 1997). Adicionalmente, estágios imaturos dessas espécies freqüentemente ficam agarrados nas penas das aves após a hematofagia. Esses mecanismos poderiam facilitar a dispersão passiva e favorecer a expansão da distribuição geográfica desses triatomíneos, pois as aves têm grande capacidade de deslocamento. *R. neglectus* é freqüentemente encontrado em ninhos aves da família Funariidae, como *Phacellodomus ruber* (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004, Gurgel-Gonçalves & Cuba 2007) e *Pseudoseisura cristata* (Carcavallo *et al.* 1997). Sobrepondo os registros de ocorrência de *R.*

neglectus observados no presente estudo com as distribuições geográficas dessas espécies de aves (Figura 22) observa-se relevante área de sobreposição. Essas evidências sugerem que um dos principais mecanismos de dispersão de *R. neglectus* no Brasil (incluindo dispersão entre as bacias hidrográficas) seja passivamente a partir de aves, o que suportaria a distribuição geográfica potencial a oeste/nordeste do Brasil e, conseqüentemente a hipótese biogeográfica de distribuição ao longo do ‘corredor de savana’. A dispersão passiva de triatomíneos a partir de deslocamentos de populações humanas seria outro mecanismo; há evidência que esse tipo de transporte possa ter ocorrido com *R. prolixus* na América Central (Dujardin *et al.* 1998). Entretanto, esse mecanismo deve ser pouco provável para espécies que não desenvolvem grandes colônias em ambiente domiciliar, como *R. neglectus*.

5.9 Análise filogeográfica de *Rhodnius neglectus*

A análise das seqüências do gene citocromo b do DNA mitocondrial mostrou ser uma ferramenta apropriada para realizar inferências sobre as relações intra e interespecíficas de *R. neglectus*, assim como observado em outros estudos taxonômicos e populacionais de triatomíneos (e.g. Abad-Franch *et al.* 2004, Monteiro *et al.* 2003, 2004). A seqüência resultante foi menor que a obtida por Monteiro *et al.* (2003) usando os mesmos ‘primers’; isso ocorreu devido à exclusão de fragmentos no início e final da seqüência por não apresentarem qualidade (nucleotídeos com baixo sinal e picos não bem definidos nos eletroferogramas) não sendo, portanto, confiáveis. Apesar de menores, as seqüências resultantes apresentaram alta qualidade e ausência de inserções ou deleções, permitindo um alinhamento confiável. Adicionalmente, a amostragem foi muito ampla, cobrindo cerca de 90% da distribuição geográfica da espécie, o que permitiu realizar um estudo filogeográfico abrangente de *R. neglectus*.

Outros marcadores moleculares (mitocondriais e nucleares) têm sido usados em estudos filogeográficos de triatomíneos. Entretanto, estudos comparando marcadores mitocondriais e nucleares mostram congruência nos resultados obtidos; e.g. o parafiletismo em *R. robustus* usando citocromo b foi confirmado a partir da análise do polimorfismo da região nuclear D2 do rRNA (28S) (Monteiro *et al.* 2003). Adicionalmente, análises filogenéticas usando espaçadores de RNA ribossomal (ITS) também corroboram as filogenias baseadas em genes do DNA mitocondrial (ver referências em Abad-Franch & Monteiro 2005). Esses resultados sugerem que o uso de um marcador nuclear para estudar o polimorfismo das populações de *R. neglectus* apresenta o mesmo resultado que o citocromo b.

As análises filogenéticas e filogeográficas das populações de *Rhodnius* do Brasil central mostraram: i) a linhagem de *Rhodnius* do Brasil central compartilha um ancestral comum mais recente com a linhagem *R. prolixus/R. robustus* I, da bacia do Orinoco, ao norte da Amazônia; ii) o tempo estimado de separação entre *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus* I foi entre 2,6 e 3,8 milhões de anos atrás (Maa); iii) existência de dois agrupamentos de populações de *R. neglectus*, um formado pelas populações do Mato Grosso e oeste de Goiás (grupo oeste) e outro formado pelo restante das populações de *R. neglectus* do Brasil central (grupo leste); iv) a população de Alto Paraíso-GO apresentou haplótipos desses dois agrupamentos e os maiores valores de diversidade nucleotídica; v) os dois haplótipos mais frequentes incluíram indivíduos de diferentes bacias hidrográficas e da maioria das populações amostradas; vi) os haplótipos das populações dos lados esquerdo e direito da Serra Geral de Goiás foram compartilhados, assim como haplótipos das margens esquerda e direita dos principais rios e, adicionalmente, vii) não foi observado isolamento por distância comparando as distâncias genéticas e geográficas.

De acordo com esses resultados, a origem da linhagem de *Rhodnius* no Brasil central deve ter ocorrido no final do Terciário. Entre os eventos vicariantes propostos nessa época destaca-se a

transgressão marinha na América do sul (Mioceno/Plioceno). Essa hipótese propõe que movimentos de placas tectônicas e mudanças no nível do mar resultaram em um alagamento extensivo da América do Sul, principalmente nas planícies amazônicas, deixando três escudos relativamente isolados: o Planalto Central Brasileiro, o Guianense e o Andino (Frailey *et al.* 1988). Essa transgressão pode ter influenciado a evolução de linhagens de *Rhodnius* de áreas abertas, a partir de ancestrais amazônicos. Segundo esse cenário, populações ancestrais de *Rhodnius* no escudo brasileiro, ao sul da Amazônia, podem ter ficado isoladas das populações do escudo guianense (ancestrais de *R. prolixus*/ *R. robustus* I), ao norte da Amazônia (Figura 33). No escudo brasileiro, os ancestrais de *R. neglectus* devem ter estabelecido associações ecológicas com espécies de palmeiras de áreas secas (*Acrocomia aculeata*, *Syagrus oleracea*), colonizando também *M. flexuosa* em áreas úmidas (veredas). No escudo guianense, as linhagens de *Rhodnius* (*R. prolixus*/*R. robustus* I) também evoluíram em palmeiras de ecorregiões semi-áridas no Llanos Venezuelanos-Colombianos (e.g. *Acrocomia aculeata*, *Copernicia tectorum*). Essa hipótese poderia explicar a origem da linhagem ancestral de *R. neglectus* no Brasil central; a diversificação desta linhagem pode ter tido ainda influência do soerguimento do planalto central (Plioceno) que promoveu uma compartimentalização da paisagem com a formação de amplas depressões e platôs (Del'Arco & Bezerra 1989).

Eventos mais recentes ocorridos no Quaternário (Pleistoceno) também devem ter influenciado a diversificação da linhagem de *Rhodnius* no Brasil central. Alguns estudos têm sugerido a existência de corredores de conectividade entre áreas abertas ao norte e sul da Amazônia durante o Pleistoceno (há aproximadamente 1 Maa); três corredores principais foram propostos: i) o corredor andino conectando diretamente as savanas do sul com as savanas colombianas, venezuelanas (Llanos) e de Roraima; ii) o corredor central conectando savanas do sul com fragmentos savânicos do norte do Amazonas (Monte Alegre, Parú e Roraima) e iii) o corredor

costeiro conectando os blocos savânicos sul e norte a partir de fragmentos savânicos da Ilha de Marajó, Amapá e Guianas, próximos da costa atlântica (Webb 1991, Haffer 1997, Cardoso da Silva & Bates 2002). Em um estudo filogeográfico do complexo *Crotalus durissus*, Quijada-Mascareñas *et al.* (2007) apresentam fortes evidências genéticas (estrutura populacional, demografia histórica, rede de haplótipos e NCA ‘nested clade analysis’) da presença de um corredor transamazônico central no Pleistoceno; os haplótipos mais divergentes foram observados no Mato Grosso e a rede de haplótipos mostrou relação entre as populações de Roraima e Mato Grosso.

A divergência entre os grupos oeste e leste de *R. neglectus* deve ter ocorrido entre 0,9 e 1,1 Ma, coincidindo com a formação dos corredores transamazônicos secos. Este evento poderia ter favorecido contato secundário entre linhagens amazônicas e a linhagem de *R. neglectus*, promovendo a diversificação oeste-leste e, provavelmente norte-sul do grupo do leste (Figura 33). Vários estudos têm sugerido que altos valores de diversidade nucleotídica são indicativos de populações ancestrais (ver referências em Cheviron *et al.* 2005); as populações de Alto Paraíso e do Mato Grosso seriam então populações ancestrais pois apresentaram os maiores valores de diversidade nucleotídica, concordando com o cenário proposto. Com a formação dos corredores transamazônicos, contatos secundários entre as linhagens de *Rhodnius* amazônicas e a linhagem do Brasil central podem ter ocorrido no norte do Mato Grosso (oeste) e norte de Goiás/Tocantins (leste), sendo que as populações do leste podem ter se diferenciado no sentido norte-sul (Figura 34).

A história evolutiva de *R. neglectus* também deve estar relacionada com a de palmeiras de áreas secas como *Acrocomia aculeata*. Interessante observar que a distribuição dos haplótipos de *R. neglectus* do agrupamento do leste (Figura 25) coincide com a distribuição geográfica dessa espécie de palmeira (Figura 21). Futuros estudos comparando a filogeografia de *R. neglectus* e *A. aculeata* podem auxiliar a entender a diversificação das linhagens de *Rhodnius* do Brasil central. Com relação a *M. flexuosa*, dados filogeográficos preliminares (Baiocchi *et al.* 2007) mostram ocorrência de

expansão populacional recente para essa espécie de palmeira; as flutuações climáticas no terciário parecem ter afetado a distribuição das espécies de *Mauritia* sendo que o registro fóssil mostra uma expansão na distribuição geográfica desse gênero, levando ao padrão atual (ampla distribuição no Cerrado e Amazônia).

Comparando o cenário biogeográfico exposto acima para *R. neglectus* com as hipóteses biogeográficas propostas para espécies de vetores neotropicais - transgressão marinha, rios como barreiras e refúgios (Conn & Mirabello 2007), observa-se que a hipótese de transgressão marinha seria a que melhor explica a origem de *R. neglectus* no Brasil central e a formação de corredores transamazônicos secos seria o evento mais recente influenciando a estrutura genética dessas populações de acordo com as evidências moleculares apresentadas. Não foram obtidos sinais de expansão demográfica recente em *R. neglectus* sugerindo que as conseqüências das flutuações climáticas no final do Pleistoceno não devem ter sido marcantes para a estruturação genética dessa espécie de triatomíneo. Adicionalmente, *R. neglectus* ocorre em palmeiras de áreas secas e úmidas; durante os períodos mais úmidos as populações podem ter sido mantidas em *M. flexosa* e, em períodos mais secos em *A. aculeata* ou *Syagrus oleracea*. Essa hipótese poderia explicar o fato de não terem sido detectadas grandes mudanças populacionais em *R. neglectus*.

Essas hipóteses também já foram testadas para outras espécies de *Rhodnius* (Monteiro *et al.* 2003, Conn & Mirabello 2007). *R. prolixus* apresentou sinais de expansão demográfica associada com expansão de refúgios e fraca estrutura filogeográfica, evidências da hipótese dos refúgios florestais do Pleistoceno. A estrutura filogeográfica de *R. robustus* esteve de acordo com as predições da hipótese de transgressão marinha (monofiletismo de linhagens presentes nos escudos brasileiro, guianense e andino, populações ancestrais encontradas nesses escudos e populações recentemente derivadas encontradas nas planícies amazônicas).

Já a hipótese de rios como barreiras geográficas foi levantada para o mosquito-prego (vetor de *Plasmodium* spp., agente etiológico da Malária) *Anopheles aquasalis* (Fairley *et al.* 2002). Neste estudo foi aplicado o seqüenciamento do mtDNA (citocromo oxidase I) de cinco populações de *A. aquasalis* da Amazônia, incluindo as margens direita e esquerda do rio, mostrando compartilhamento de haplótipos entre as populações e sugerindo que o rio não seria uma barreira para evitar o fluxo gênico de populações dessa espécie. Adicionalmente, outros estudos genéticos e ecológicos incluindo diferentes táxons (ver referências em Gascon *et al.* 2000) não apresentaram evidências a favor da hipótese de rios como barreiras na Amazônia. Finalmente, a análise filogeográfica de *R. neglectus* também indica que os rios, divisores de águas/bacias e a Serra Geral de Goiás não seriam barreiras geográficas para isolar as populações no Brasil.

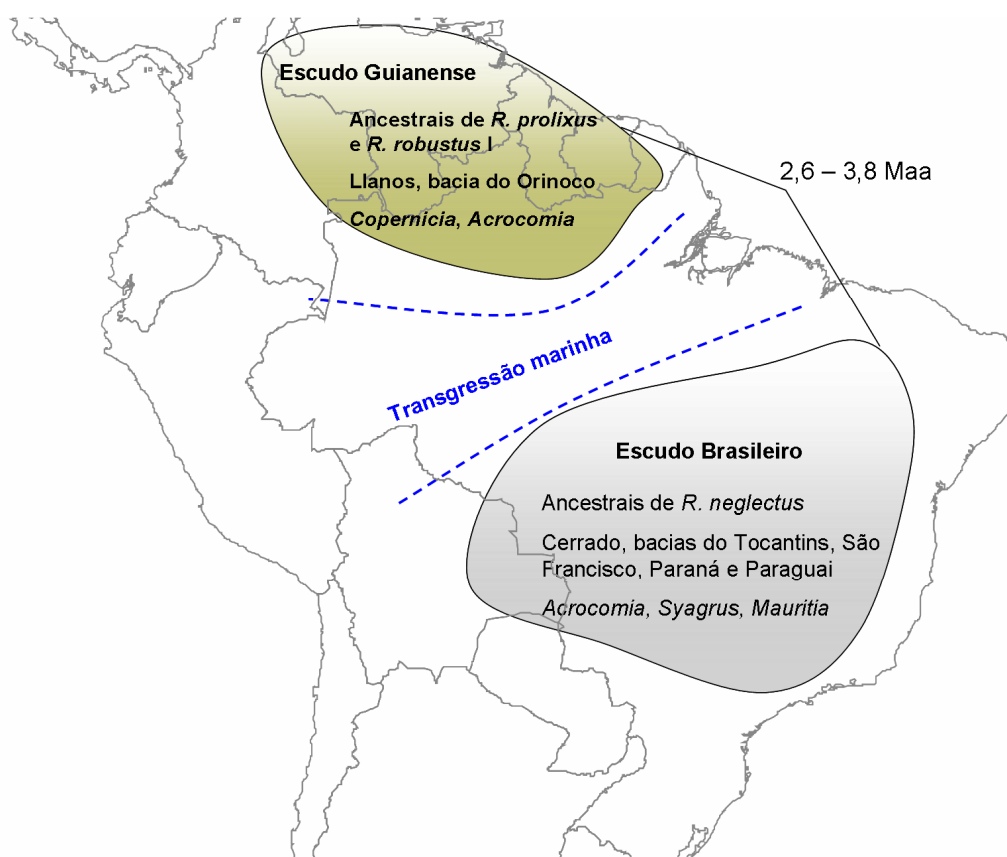


Figura 33. Hipótese de origem das linhagens de *Rhodnius* de ecorregiões semi-áridas na América do Sul a partir da genealogia baseada no citocromo b e tempos de divergência. A linhagem de *R. neglectus* (Cerrado, Brasil central) compartilha um ancestral comum mais recente com a linhagem *R. prolixus*/*R. robustus* I, ao norte da Amazônia (Llanos Venezuelanos/Colombianos); o tempo estimado de separação entre *R. neglectus*, *R. prolixus* e *R. robustus* I foi entre 2,6 e 3,8 milhões de anos atrás (Maa) no Plioceno. Durante o final do Terciário, movimentos de placas tectônicas e mudanças no nível do mar resultaram em um alagamento extensivo da América do Sul, principalmente nas planícies amazônicas (Frailey *et al.* 1988). Segundo esse cenário, populações ancestrais de *Rhodnius neglectus* no escudo brasileiro podem ter ficado isoladas das populações do escudo guianense (ancestrais de *R. prolixus*/*R. robustus* I). No escudo brasileiro, os ancestrais de *R. neglectus* devem ter evoluído em espécies de palmeiras de áreas secas no Cerrado (*Acrocomia aculeata*, *Syagrus oleracea*), colonizando também *M. flexuosa* em áreas úmidas (veredas). No escudo guianense, as linhagens de *Rhodnius* evoluíram em palmeiras de ecorregiões semi-áridas nos Llanos (e.g. *Acrocomia aculeata*, *Copernicia tectorum*).

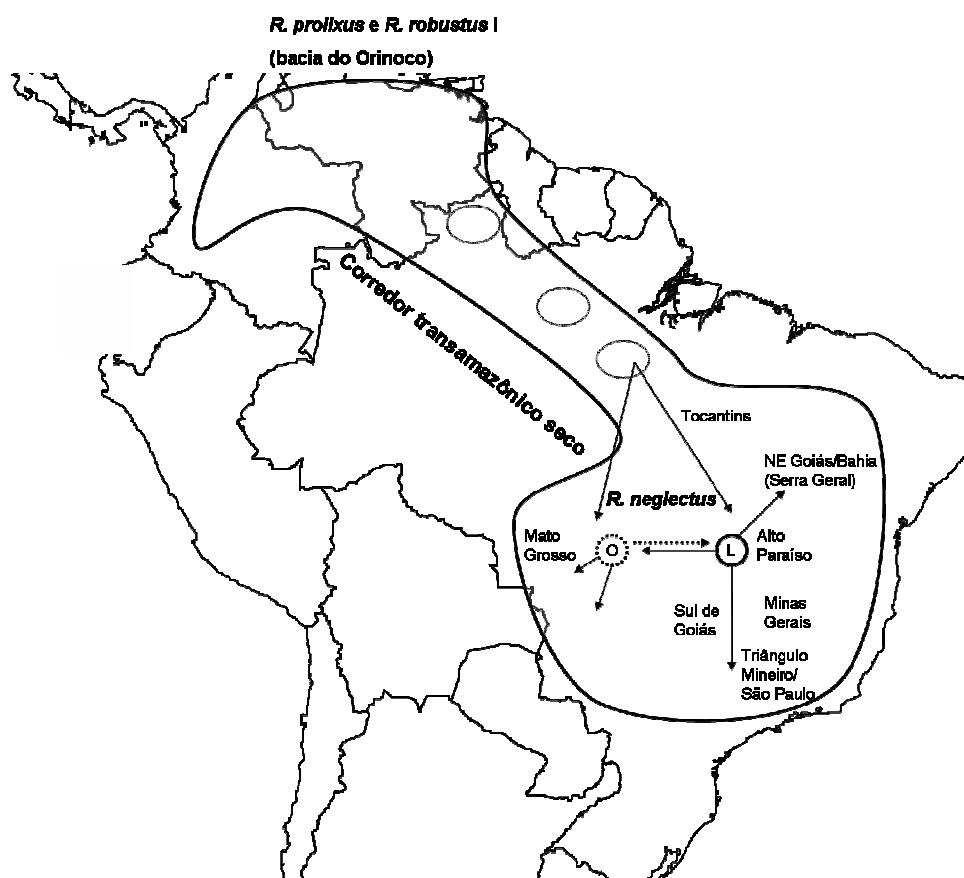


Figura 34. Hipótese de diversificação das populações de *Rhodnius* do Brasil central a partir da genealogia baseada no citocromo b. A alta diversidade nucleotídica observada nos haplótipos das populações do Mato Grosso e Alto Paraíso (norte de Goiás), principalmente no Rne 9, sugere que esse seja o haplótipo ancestral de *R. neglectus*, que foi observado nas populações do oeste (O, círculo pontilhado) e leste (L, círculo contínuo). Essas populações podem ter tido contato secundário com as linhagens de *Rhodnius* de savanas amazônicas e dos Llanos venezuelanos via corredores transamazônicos secos contínuos no Pleistoceno, principalmente no norte do Mato Grosso e de Tocantins. A área contínua cinza indica o corredor seco transamazônico; os círculos presentes no corredor indicam a localização aproximada de savanas amazônicas de acordo Sombroek (2001). As setas contínuas finas indicam as áreas onde *R. neglectus* é encontrada atualmente no Brasil.

5.10 Potencial de *Rhodnius neglectus* como vetor de *Trypanosoma cruzi* no Brasil central

Populações de várias espécies da tribo Rhodniini apresentam capacidade de colonização de ambientes artificiais em diferentes regiões. O grau de adaptação ao ambiente doméstico varia bastante na tribo, com populações exclusivamente silvestres, sinantrópicas ou bem adaptadas ao ambiente domiciliar. Baseando-se nesses diferentes graus de adaptação, alguns autores (Barretto 1979, Dujardin *et al.* 2002) propuseram a seguinte classificação: i) espécies exclusivamente silvestres, como *Psammolestes tertius*, encontrada somente em ninhos de pássaros da família Furnariidae; ii) espécies silvestres cujos adultos invadem ecótopos artificiais, como *R. domesticus* na Floresta Atlântica e *R. robustus/R. pictipes* na Amazônia; iii) espécies silvestres que invadem ecótopos artificiais e formam pequenas colônias como *R. neglectus* no Brasil central e *R. nasutus* na região nordeste e iv) espécies bem adaptadas aos ecótopos artificiais, como *R. prolixus*, o principal vetor da doença de Chagas na América Central e na Colômbia (com populações exclusivamente domiciliadas), cuja presença não foi observada no Brasil central de acordo com os resultados apresentados.

Segundo esses autores, as espécies adaptadas ao ambiente domiciliar (domiciliadas) podem ainda ser classificadas de acordo com a extensão da distribuição geográfica, densidade populacional e taxas de infecção por *T. cruzi*. Espécies domiciliadas com ampla distribuição geográfica, altas densidades populacionais nos domicílios e altas taxas de infecção por *T. cruzi* seriam consideradas primárias na transmissão do parasito ao homem; espécies domiciliadas com distribuição geográfica restrita, menores densidades populacionais e baixas taxas de infecção seriam consideradas secundárias. As espécies do grupo que inclui *R. neglectus* estariam em fase inicial de adaptação ao ambiente domiciliar, porém com papel vetorial não bem estabelecido. *R. neglectus* e *R. nasutus* têm importante papel na manutenção da transmissão de *T. cruzi* em ambientes silvestres (ciclos

enzoóticos) e podem invadir ecótopos artificiais, eventualmente participando do ciclo doméstico com a formação de pequenas colônias no ambiente peridomiciliar (e.g. galinheiros) onde é possível encontrar adultos, ovos, ninfas e exúvias. Entretanto, colônias intradomiciliares de *R. neglectus* já foram observadas em Tocantins e Goiás (Silveira *et al.* 1983); entre 1979 e 1983, 271 habitações (43% das casas investigadas) apresentaram colônias intradomiciliares, que foram eliminadas após borrifação das casas com inseticida de ação residual.

A presença de *R. neglectus* em ambiente domiciliar foi registrada em Goiás nas últimas décadas (Silveira *et al.* 1984, Garcia-Zapata *et al.* 1985, Silva *et al.* 1992, Oliveira & Silva 2007). *R. neglectus* é atualmente a segunda espécie de triatomíneo mais comum encontrada em ambientes artificiais no estado de Goiás (geralmente insetos adultos que invadem as casas, sem colonizar). A infestação domiciliar foi detectada em 79% dos municípios do estado e cerca de 4.500 espécimes de *R. neglectus* (~1% infectados com *Trypanosoma cruzi*) foram coletados nos últimos dois anos (Oliveira & Silva 2007). A invasão de ambientes domésticos por espécimes adultos de *R. neglectus* tem sido registrada também nos estados de Minas Gerais, Paraná e São Paulo (Barretto *et al.* 1968, Guilherme *et al.* 2001, Silva *et al.* 1999, 2003, 2007).

Alguns autores (Barretto *et al.* 1968, Diotaiuti & Dias 1984) concordam que *R. neglectus*, apesar de ser capaz de colonizar o ambiente artificial (principalmente galinheiros e pombais), não representa uma espécie importante na transmissão do *T. cruzi* ao homem, porém assumindo relevante papel na manutenção do ciclo silvestre do parasito. Na periferia de Belo Horizonte, onde predominam as palmeiras da espécie *Acrocomia aculeata* (macaúba), raramente são encontrados espécimes adultos no ambiente artificial, apesar de taxas de infestação por *R. neglectus* de aproximadamente 60% já terem sido documentadas (Diotaiuti & Dias 1984). O mesmo padrão é observado no Distrito Federal, onde a infestação de *R. neglectus* pode chegar a 40% na palmeira *Mauritia flexuosa* (buriti), sendo poucos espécimes adultos encontrados nas casas nos últimos anos

(Gurgel-Gonçalves 2003). Adicionalmente, as taxas de infecção de *R. neglectus* são relativamente baixas quando comparadas com outras espécies de *Rhodnius*; em ambiente silvestre (*M. flexuosa*, em vários estados brasileiros) a infecção global para *T. cruzi* foi de aproximadamente 3% (Gurgel-Gonçalves *et al.* 2004, Tabela 9); em São Paulo e Minas Gerais a taxa média de infecção de espécimes adultos em ambiente domiciliar foi de 3,4% (Barretto 1979) e em Goiás aproximadamente 1% (Oliveira & Silva 2007). A forte associação entre *R. neglectus* e aves explica esses baixos índices de infecção, quando comparados com outras espécies de *Rhodnius* que alimentam-se em mamíferos presentes em palmeiras da Amazônia (Miles *et al.* 1983, Abad-Franch & Monteiro 2007).

As observações acima mostram que *R. neglectus* possui: i) capacidade de invadir domicílios, eventualmente formando pequenas colônias, ii) ampla distribuição geográfica, iii) baixos índices de infecção por *T. cruzi*. Considerando os critérios usados por Dujardin *et al.* (2002) para a classificação das espécies primárias e secundárias, *R. neglectus*, apesar de apresentar ampla distribuição geográfica no Brasil, ainda é considerada um vetor secundário, potencialmente envolvido na transmissão de *T. cruzi* ao homem no Brasil central e áreas de transição ao sul e nordeste da Amazônia. As populações de triatomíneos sinantrópicos (de espécies primárias ou secundárias) devem ser alvo dos programas de controle baseados no uso de inseticidas (e.g. Dias, 2007). Entretanto, a presença de populações silvestres próximas das casas limita as intervenções de controle em muitas regiões. Triatomíneos adultos repetidamente invadem as casas (sem colonizar), mantendo o risco de transmissão da doença e eventualmente originando novas colônias em ambiente domiciliar (Miles *et al.* 2003). Por isso, os sistemas de vigilância devem ser capazes de detectar e eliminar populações sinantrópicas de *R. neglectus* ao longo de sua distribuição geográfica.

6. Considerações finais e perspectivas

Morfometria

A correta identificação taxonômica de organismos é fundamental quando a saúde de pessoas depende do desenvolvimento de estratégias para o manejo de uma espécie e não outra similar pertencente ao mesmo grupo. A maioria dos triatomíneos pode ser identificada usando caracteres morfológicos externos e cromáticos. Entretanto, alguns grupos são problemáticos e alguns táxons são essencialmente isomórficos. Várias espécies epidemiologicamente importantes apresentam essas dificuldades, incluindo as do grupo *R. prolixus*.

Vários marcadores taxonômicos alternativos têm sido testados para a identificação específica de triatomíneos morfológicamente similares, mas geralmente são caros e/ou exigem muito tempo, sendo limitados a laboratórios especializados. A morfometria geométrica é provavelmente muito complexa para se tornar amplamente utilizada na rotina dos programas de vigilância descentralizados. Entretanto, não é difícil visualizar um sistema de referência para identificação de triatomíneos onde os agentes do programa poderiam enviar os ‘espécimes problema’ (ou imagens digitalizadas das estruturas chave - asas ou cápsulas cefálicas) para um laboratório de suporte onde eles seriam comparados com auxílio de uma base de dados morfométricos de referência e então identificados em nível específico. Os resultados apresentados mostram como essa abordagem pode ser colocada eficientemente em prática, mesmo analisando espécies de triatomíneos muito similares, como no caso das espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*.

Finalmente, os resultados da análise morfométrica intra-específica mostraram que a temperatura pode influenciar o tamanho de espécimes de *R. neglectus*. Experimentos acompanhando espécimes em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade podem ser realizados para testar com maior poder estatístico a hipótese de plasticidade fenotípica de *R. neglectus*. Da

mesma forma, o estudo das alterações morfológicas durante a passagem do ambiente silvestre para o artificial (laboratório) deve ser realizado em breve; várias das populações analisadas no presente estudo ainda são mantidas no Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da UnB com essa finalidade.

Infestação de *Mauritia flexuosa* por *Rhodnius neglectus*

Algumas espécies de palmeiras podem ser consideradas indicadores ecológicos de áreas de risco de transmissão da doença de Chagas, sendo úteis na identificação da presença de vetores e hospedeiros dos ciclos silvestres de transmissão do *T. cruzi*. A palmeira *M. flexuosa* já era reconhecida como um importante ecótopo para *R. neglectus* nos estados de Minas Gerais, Goiás, Tocantins e Distrito Federal. O presente estudo mostrou que essa palmeira também é um ecótopo favorável para a manutenção de populações de *R. neglectus* em áreas de Cerrado dos estados de São Paulo, Bahia e Mato Grosso, nas quatro principais bacias hidrográficas do Brasil central. Ao longo do rio Amazonas, onde *M. flexuosa* é freqüente, outras espécies de *Rhodnius* são encontradas (e.g. *R. robustus*, *R. pictipes*) e não há evidências da presença de *R. neglectus*. Dessa forma, *M. flexuosa* seria um indicador da presença de *R. neglectus* somente nos limites e ecótonos do bioma Cerrado. Futuros estudos amostrando populações de *Rhodnius* em *M. flexuosa* ao longo dos principais rios amazônicos, em savanas amazônicas e áreas úmidas da caatinga (brejos) poderiam confirmar essa hipótese.

Distribuição geográfica potencial de *Rhodnius neglectus*

A modelagem de nicho ecológico usando GARP produz modelos de distribuição geográfica de espécies que revelam boa acurácia e sensibilidade. Essa abordagem tem sido aplicada em estudos sobre vetores de patógenos, contribuindo no estudo epidemiológico de doenças tropicais. Nosso

estudo atualizou a dispersão alti-latitudinal de *Rhodnius neglectus*, com novos registros da espécie em ambiente silvestre e doméstico, e apresentou modelos de distribuição geográfica potencial desse triatomíneo, confirmando a sua distribuição no Cerrado e indicando que áreas de Caatinga, Savana amazônica, Pantanal e Chaco Boliviano também apresentam condições ambientais favoráveis para a ocorrência da espécie. Estas áreas devem ser investigadas em futuros estudos para comparar de forma mais abrangente e inequívoca a distribuição real e a predita pelo modelo. Algumas dessas áreas podem ter sido ocupadas por espécies similares (e.g. *R. nasutus* na Caatinga) ou podem representar regiões que *R. neglectus* não conseguiu colonizar. Dessa forma, a modelagem de nicho ecológico pode ser uma ferramenta útil para estudar aspectos biogeográficos, ecológicos e evolutivos das espécies.

Além das variáveis abióticas, a interação entre *R. neglectus* e algumas espécies de aves e palmeiras também devem explicar os padrões de distribuição desta espécie de triatomíneo, considerando que os resultados mostraram uma ampliação da distribuição a oeste e nordeste do Brasil. Estes resultados podem auxiliar a vigilância entomológica dos programas de controle da doença de Chagas, considerando que espécimes de triatomíneos do gênero *Rhodnius* freqüentemente invadem as casas na América Latina, mantendo o risco de transmissão da doença e limitando as estratégias de controle. A pesquisa também contribui adicionando resultados sobre padrões de distribuição de insetos no Cerrado, considerando que existem poucos estudos descritos nesse bioma em comparação com outros grupos de organismos.

A modelagem de nicho ecológico apresentada para *R. neglectus* pode ser aplicada no futuro para outras espécies de *Rhodnius*, como *R. nasutus* na Caatinga e as espécies de *Rhodnius* amazônicos (e.g. *R. robustus*, *R. pictipes*). Além de permitir conhecer melhor os potenciais limites de distribuição das espécies de vetores, estudos comparativos seriam interessantes para conhecer as

variáveis ambientais indicadoras da presença dessas espécies e os respectivos fatores limitantes da ocorrência.

Estrutura genética e filogeografia de *Rhodnius neglectus*

Uma primeira implicação da análise filogeográfica desse estudo está associada à confirmação das identificações de *R. neglectus* no Brasil central usando morfometria geométrica, mostrando que *R. prolixus* não está presente nessa região. Esse resultado tem grande importância epidemiológica, pois *R. neglectus* é uma espécie secundária na transmissão da doença de Chagas, capaz de invadir domicílios e formar colônias, mas ainda predominantemente silvestre, habitando diferentes espécies de palmeiras no Brasil. Já *R. prolixus* é considerada uma espécie capaz de formar grandes colônias domiciliares, sendo o principal vetor da doença de Chagas na América Central e alguns países de América do Sul.

Segundo, a abordagem filogeográfica evidencia que os rios e a Serra Geral de Goiás não seriam barreiras geográficas capazes de limitar a dispersão e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre populações de *R. neglectus*. Adicionalmente, não foi observado isolamento por distância. A análise filogeográfica apresentada forneceu informações importantes para a compreensão da história evolutiva da linhagem de *R. neglectus* no Cerrado, mostrando compartilhamento de um ancestral comum mais recente com a linhagem *R. prolixus/R. robustus* I, da bacia do Orinoco, ao norte da Amazônia e a existência de dois agrupamentos de populações de *R. neglectus* (grupos oeste e leste). Para fortalecer as hipóteses filogeográficas sugeridas para *R. neglectus* há a necessidade de: i) ampliar a amostragem, incluindo populações do Maranhão, Pernambuco e Paraíba; ii) aumentar o número de indivíduos amostrados nas populações de Alto Paraíso e da bacia do Paraguai (grupo do oeste); iii) fazer a análise de coalescência para entender melhor a demografia histórica da espécie; iv) fazer uma análise comparativa entre a filogeografia de *R. neglectus*, espécies de palmeiras (e.g.

Acrocomia aculeata) e pássaros (*Phacellodomus ruber*) associados e, v) verificar o resultado com marcadores nucleares como os microssatélites que atualmente estão sendo desenvolvidos para *R. prolixus* e *R. robustus* e cuja transferibilidade para *R. neglectus* deve ser testada em futuros estudos.

Adicionalmente, o presente estudo não suporta a existência de um complexo *R. neglectus* formado por linhagens estruturadas geograficamente, apesar de alguns espécimes das populações de Alto Paraíso-GO e da bacia do Paraguai (grupo do oeste) terem apresentado maiores níveis de divergência genética. Como não foi possível relacionar nenhum padrão morfológico com as diferenças genéticas, cruzamentos experimentais entre as populações mais divergentes geneticamente serviriam para testar a hipótese de isolamento reprodutivo.

7. Conclusões gerais

Morfometria

1. A morfometria geométrica de cápsulas cefálicas e, especialmente, asas é um método útil na identificação de espécies similares de *Rhodnius*;
2. Espécimes de *R. neglectus* estão invadindo as casas e anexos no Brasil central. *R. robustus* e *R. neglectus* ocorrem simpatricamente ao sul da Amazônia, mas *R. prolixus* está ausente nas casas dos municípios amostrados no Brasil central;
3. Houve variação significativa de tamanho das asas e, especialmente, cápsulas cefálicas entre populações de *R. neglectus* do Brasil;
4. A temperatura foi a variável ambiental que mais influenciou o tamanho de *R. neglectus*; os menores espécimes foram observados em áreas mais frias;
5. A forma de asas e cápsulas cefálicas de populações de *R. neglectus* de diferentes bacias hidrográficas foi similar;
6. Houve variação intrapopulacional na forma da cápsula cefálica de *R. neglectus*, com espécimes apresentando diferentes graus de alongamento dessa estrutura.

Infestação de *Mauritia fleuxosa* por *Rhodnius neglectus*

1. A palmeira *M. fleuxosa* é um ecótopo favorável para a manutenção de populações de *R. neglectus* no bioma Cerrado;
2. A existência de ninhos de aves (principalmente de *Phacellodomus ruber*, construídos com gravetos) nas bainhas foliares das palmeiras é um dos principais fatores determinantes da abundância de *R. neglectus* em *M. fleuxosa*;

3. O baixo índice de infecção de *R. neglectus* por tripanossomatídeos observado no presente estudo não deve ser interpretado como uma evidência de menor susceptibilidade dessa espécie de triatomíneo aos parasitos, mas como uma consequência da maior frequência de aves nas palmeiras investigadas.

Distribuição geográfica potencial de *Rhodnius neglectus*

1. Os resultados apresentados neste estudo atualizaram e ampliaram os limites de ocorrência de *R. neglectus*; o estudo revelou uma ampliação da distribuição a sudoeste e nordeste do Brasil na ‘diagonal de ecorregiões abertas/secas da América do Sul’;
2. A modelagem usando GARP confirmou a distribuição de *R. neglectus* no Cerrado e indicou áreas potenciais de ocorrência na Caatinga, Pantanal e savanas amazônicas;
3. A ocorrência de *R. neglectus* fora do Cerrado pode estar relacionada com a distribuição de algumas espécies de aves (*Phacelodomus ruber*, *Pseudoseisura cristata*) e palmeiras (*Attalea speciosa*, *Acrocomia aculeata*).

Estrutura genética e filogeográfica de *Rhodnius neglectus*

1. *R. neglectus* apresentou uma baixa, mas significativa, diferenciação entre as populações. A maior parte da variação genética foi explicada pela separação entre as populações do oeste (Mato Grosso/oeste de Goiás) e leste (Tocantins, leste de Goiás, Bahia, Minas Gerais, nordeste de São Paulo);
2. Os rios e a Serra Geral de Goiás não seriam barreiras geográficas capazes de limitar a dispersão e, conseqüentemente, o fluxo gênico entre populações de *R. neglectus*. Adicionalmente, não houve evidência de isolamento por distância;

3. A linhagem de *R. neglectus* deve ter originado no Brasil central no final do Terciário (entre 2,6 e 3,8 Maa), a partir de eventos vicariantes como a transgressão marinha na América do sul (Mioceno/Plioceno). Eventos mais recentes ocorridos no Quaternário (formação de corredores transamazônicos secos no Pleistoceno) também devem ter influenciado a diversificação da linhagem de *R. neglectus* no Brasil central.
4. *R. neglectus* é uma espécie claramente separada das outras espécies de *Rhodnius* do grupo *R. prolixus*; a linhagem de *R. neglectus* compartilha um ancestral comum mais recente com a linhagem *R. prolixus/R. robustus* I.

8. Glossário¹

Algoritmos: processos de cálculo ou de resolução de problemas semelhantes em que se estipulam regras formais para garantir a obtenção do resultado.

Alometria: em morfometria significa qualquer mudança de forma influenciada pelo tamanho; presença de correlação da forma com o tamanho.

Árvore filogenética: representação gráfica das relações genealógicas entre táxons. É uma hipótese das relações genealógicas.

Análise de Componentes Principais (ACP): análise multivariada que transforma um conjunto de variáveis correlacionadas em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas. Essas novas variáveis (componentes principais) são combinações lineares das variáveis originais e são deduzidas em ordem decrescente de importância, de modo que o primeiro componente principal contém o máximo possível da variação nos dados originais. O objetivo da análise é verificar se alguns componentes podem explicar a maior parte da variação nos dados originais.

Análise de Funções Discriminantes (AFD): análise multivariada em que os grupos são previamente definidos e as diferenças entre esses grupos são analisadas a partir da magnificação da variação entre os grupos em relação à variação dentro de cada grupo. A especificação dos grupos depende essencialmente do delineamento do problema biológico; os grupos podem representar indivíduos de populações de uma espécie ou espécies diferentes, por exemplo. Os princípios fundamentais de redução da dimensionalidade e explicação da variação em termos de variáveis latentes também são aplicados nessa análise.

Análise Generalizada de Procrustes (AGP): análise morfométrica baseada na sobreposição de um conjunto de configurações dos espécimes analisados em relação à configuração consenso do grupo. O método de Procrustes é baseado no critério de mínimos quadrados, que transforma uma configuração de marcos, superpondo-a sobre uma configuração de referência, de modo que a soma

dos quadrados das distâncias entre os pontos correspondentes em ambas as configurações seja a menor possível. Para que isso ocorra, a configuração dos marcos deve passar pelos processos de translação, colocando-se o centróide (ponto médio das configurações) na origem do sistema de coordenadas cartesianas; proporcionalização, extraindo o **Tamanho do Centróide** e deixando as configurações em uma mesma escala e, finalmente, rotação que removerá os efeitos da orientação das coordenadas. As coordenadas dos marcos anatômicos de cada espécime analisado por esse método são chamadas de variáveis de forma e podem ser analisadas por métodos multivariados (**ACP** e **AFD**).

Bioma: grande ecossistema regional ou subcontinental, determinado primariamente pelo clima predominante e que se caracteriza por um tipo principal de vegetação clímax.

Bottleneck: uma redução drástica no tamanho da população seguida de expansão. Esse processo também pode ocorrer no caso de colonizações envolvendo um número pequeno de indivíduos (efeito fundador), resultando em alteração das frequências gênicas das populações. Dessa forma, as características da nova população podem ser notavelmente diferentes daquelas da população ancestral, porque a fonte genética dos fundadores pode ser influenciada pela pequena amostra da população ancestral que eles representam.

Cladograma: tipo de árvore filogenética apresentando as relações de parentesco, incluindo os ancestrais hipotéticos em comum e grupos monofiléticos (clados).

Configuração consenso: configuração média dos marcos anatômicos de vários espécimes obtida pelo método dos mínimos quadrados em uma **AGP**.

Dispersão: movimento de organismos além de seus pontos de origem; pode ser ativa, quando ocorre a partir de sua própria mobilidade ou passiva, quando ocorre por intermédio de outras forças como vento, água ou outros organismos.

Ecótonos: regiões de transição entre duas comunidades ou entre dois ecossistemas. Na área de transição (ecótono) vivem espécies das comunidades limítrofes, além de espécies peculiares da região.

Endêmica: no contexto epidemiológico, uma doença endêmica ou endemia é aquela cuja incidência permanece constante em uma determinada área por vários anos. O termo “endêmica” pode caracterizar também uma espécie nativa de uma área ou região particular e encontrada somente nessa área; um táxon restrito a uma área geográfica específica.

Escudo: um escudo, ou escudo cristalino, em geologia, é uma grande área de rochas ígneas e metamórficas de alta temperatura do Pré-cambriano que se encontram expostas, formando zonas tectonicamente estáveis. Em todos os escudos a idade das rochas é superior a 570 milhões de anos chegando aos 3.5 bilhões de anos.

Espécies crípticas: linhagens dentro de um gênero geneticamente muito distintas, porém morfológicamente tão similares que não podem ser visualmente distinguíveis usando características superficiais.

Filogenia: genealogia entre táxons; qualquer relação evolutiva entre um ancestral e todos seus descendentes conhecidos.

Fluxo gênico: movimento de alelos ou haplótipos dentro de uma população ou entre elas, causado pela dispersão dos gametas ou descendentes.

Forma: em morfometria geométrica é a configuração dos pontos de referência (marcos anatômicos) de uma estrutura, invariante por efeitos de tamanho, posição ou orientação.

GARP: método de modelagem do nicho ecológico de espécies a partir de uma abordagem baseada em algoritmos genéticos, conhecido por “Genetic Algorithm for Rule-set Production”. O método relaciona variáveis climáticas, topológicas e índices de vegetação com os pontos de ocorrência da espécie, predizendo áreas potenciais de distribuição.

Genealogia: representação gráfica dos descendentes a partir de seus ancestrais; estudo do parentesco.

Grupo externo: qualquer espécie ou táxon supraespecífico que não pertence ao grupo monofilético sob estudo em uma análise filogenética. O grupo externo mais importante é o grupo irmão (táxon mais estreitamente relacionado a uma espécie ou a um táxon supraespecífico). Os grupos externos são usados para enraizar a árvore filogenética.

Grupo interno: é o grupo de interesse do pesquisador em uma análise filogenética.

Grupo monofilético: grupo que inclui um ancestral em comum e todas as espécies descendentes desse ancestral comum. Grupos monofiléticos e clados são usados como sinônimos na literatura.

Grupo parafilético: um grupo que não inclui um ancestral comum e todos os seus descendentes. Dessa forma, um ou mais descendentes do ancestral em comum são excluídos do grupo.

Grupo polifilético: um grupo em que seus membros possuem vários ancestrais comuns, um em cada grupo; é um taxon definido por uma semelhança que não foi herdada de um antepassado comum; designa um conjunto de espécies que apresentam caracteres comuns, mas que agrupam clados de origens variadas.

Haplótipo: em estudos filogeográficos é uma seqüência única de nucleotídeos de um fragmento de DNA mitocondrial (haplóide) em uma amostra ou população.

Homoplasias: caráter compartilhado por dois táxons, mas que não foi herdado do ancestral comum mais recente a ambos.

Índices de consistência (IC) e retenção (IR): a quantidade de **homoplasias** relativamente ao número total de passos na árvore pode ser medida a partir do índice de consistência. Porém, nem todos os caracteres podem estar contribuindo para a topologia da árvore, de modo que o IC pode ser uma superestimativa. Isto é, alguns caracteres são apomórficos apenas para ramos terminais (autopomorfias) e, assim, não conectam ramos. Isso pode ser medido a partir do índice de retenção.

Isolamento por distância: mecanismo evolutivo em que a similaridade genética entre duas populações seria inversamente proporcional à distância geográfica entre elas.

Morfometria: durante muito tempo o termo foi usado para qualquer estudo que analisava quantitativamente a variação da morfologia encontrada nos organismos. Após a década de 1990 a morfometria foi definida como “o estudo estatístico da covariância entre mudanças de forma e fatores causais”, ficando explícito que a morfometria estuda exatamente as causas das diferenças de forma entre organismos, sejam elas ecológicas ou filogenéticas.

Morfometria tradicional: morfometria baseada na análise multivariada de matrizes de distâncias entre partes homólogas de uma estrutura.

Morfometria geométrica: morfometria baseada no uso de coordenadas cartesianas (de pontos homólogos de uma estrutura) e métodos de superposição para analisar a variação de forma entre espécimes.

Panmixia: cruzamentos aleatórios entre indivíduos de uma população. Nessa situação, a frequência dos alelos ou haplótipos de uma população se mantém inalterada.

Plasticidade fenotípica: a capacidade de organismos geneticamente semelhantes apresentarem diferentes fenótipos em resposta às condições ambientais.

Rede de haplótipos: representação gráfica formada por círculos conectados por linhas, representando as relações entre os haplótipos de uma população. O tamanho dos círculos indica a frequência dos haplótipos e as conexões as relações de parentesco.

Regra de Bergmann: regra ecogeográfica em que o tamanho dos indivíduos aumenta com a latitude e a temperatura: formas maiores são esperadas em ambientes mais frios, uma consequência da seleção relacionada à conservação do calor.

Sensores remotos: sensores a bordo de satélites em órbita da Terra que medem a quantidade de energia eletromagnética refletida na superfície terrestre e atmosfera.

Variável de forma: qualquer medida da geometria de uma forma biológica ou imagem de uma forma que não muda após translação, rotação ou mudanças de escala geométrica (aumento ou diminuição de tamanho). Variáveis de forma úteis incluem ângulos, razões de distância ou qualquer conjunto de coordenadas de forma originadas em morfometria geométrica

Tamanho do Centróide: estimador de tamanho obtido a partir da morfometria geométrica. É extraído a partir da raiz quadrada da soma das distâncias elevada ao quadrado entre o centro de gravidade de cada estrutura (centróide) e os marcos anatômicos que a definem.

Táxon: grupo de organismos ao qual foi dado um nome.

Vicariância: separação de uma população ancestral ou espécie em duas populações distintas devido ao desenvolvimento de uma barreira topográfica ou ecológica (eventos vicariantes).

¹O Glossário foi baseado nas seguintes publicações:

Brown HJ, Lomolino MV 2006. *Biogeografia*. 2ed. Funpec Editora. Riberão Preto, São Paulo.

Monteiro LR, Reis SF 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. Holos Editora, Riberão Preto, São Paulo.

Schneider H 2003. *Métodos de análise filogenética. Um guia prático*. 2ed. Holos Editora, Riberão Preto, São Paulo.

Stockwell DRB, Peters AT 1999. The GARP modeling system: problems and solutions to automated spatial prediction. *Int J Geog Inf Sci* 13: 143-158.

Wiley EO, Siegel-Causey D, Brooks DR, Funk VA 1991. The complet cladist. A primer of phylogenetic procedures. The University of Kansas Museum of Natural History. Special Publication No. 19.

9. Referências

- Abad-Franch F 2003. *The ecology and genetics of Chagas disease vectors in Ecuador with emphasis on Rhodnius ecuadoriensis (Triatominae)*. PhD Thesis, London School of Hygiene and Tropical Medicine, University of London, London, UK, 411pp.
- Abad-Franch F, Monteiro FA 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc* 77: 437-454.
- Abad-Franch F, Monteiro FA 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 57-70.
- Abad-Franch F, Monteiro FA, Aguilar VHM, Miles MA 2004. Population-level mitochondrial DNA sequence diversity in *Rhodnius ecuadoriensis*. *IX European Multicolloquim of Parasitology*. Programme and abstracts. Valencia, Spain.
- Achee NL, Grieco JP, Masuoka P, Andre RG, Roberts DR, Thomas J, Briceno I, King R, Rejmankova E. 2006. Use of remote sensing and geographic information systems to predict locations of *Anopheles darlingi*-positive breeding sites within the Sibun River in Belize, Central America. *J Med Entomol* 43: 382-92.
- Adams DC, Slice DE, Rohlf FJ 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Ital J Zool* 71: 5-16.
- Agência Nacional de Águas (ANA) 2007. *Regiões hidrográficas e principais rios*. Brasília: ANA. Disponível em http://www.ana.gov.br/AcoesAdministrativas/CDOC/CatalogoPublicacoes_2007.asp.

- Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR 2007. Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 47-56.
- Aleixo A 2004. Historical diversification of a Terra-firme Forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypothesis of Amazonian diversification. *Evolution* 58: 1303-1317.
- Anderson RP, Lew D, Peterson AT 2003. Evaluating predictive models of species' distributions: criteria for selecting optimal models. *Ecol Model* 162: 211-232.
- Atkinson D, Sibly RM 1997. Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol Evol* 12: 235-239.
- Avise JC 2001. *Phylogeography. The history and formation of species*. 3ed. Harvard University Press, London, 446pp.
- Avise JC, Arnold R, Ball RMJr, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC 1987. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 489-522.
- Baiocchi M, Caparroz R, Collevatti RG 2007. Filogeografia e eventos históricos relacionados ao buriti (*Mauritia flexuosa*, Arecaceae). In: 53° Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, 1: 47-47.
- Bandelt HJ, Foster, P, Rohlf A 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Barata JMS 1998. Macroscopic and exochorial structures of Triatominae eggs. In: RU Carcavallo Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H (eds), *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Vol. II, p. 409-514.

- Bargues MD, Marcilla JA, Ramsey J, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2000. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 567-573.
- Barrett TV 1991. Advances in triatomine bug ecology in relation to Chagas Disease. *Adv Dis Vec Res* 8: 143-176.
- Barrett TV 1996. Species interfertility and crossing experiments in triatomine systematics. In: CJ Schofield, JP Dujardin and J Jurberg (Eds), *Proceedings of the International Workshop on population genetics and control of Triatominae*, INDRE, Mexico City, p. 72-77.
- Barretto MP 1979. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA (eds). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 89-291.
- Barretto MP, Albuquerque DRR, Funayama GK 1969. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVI: Investigação sobre triatomíneos de palmeiras no município de Uberaba, MG, Brasil. *Rev Bras Biol* 29: 577-588.
- Barretto MP, Carvalheiro JR 1968. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*: XXVIII: Sobre o encontro de *Triatoma sordida*, Stal 1859 e *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em ninhos de pássaros da família Furnariidae. *Rev Bras Biol* 28: 289-293
- Barretto MP, Siqueira AF, Ferriolli FF, Carvalheiro JR 1968. Estudos sobre reservatórios e vetores do *Trypanosoma cruzi*. XXIII. Observações sobre criadouros do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em biótopos artificiais (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 10: 163-170.
- Bates JM 2001. Avian diversification in Amazonia: evidence for historical complexity and a vicariance model for a basic pattern of diversification. In: Viera I, D'Incão MA, Silva JMC, Oren E (eds). *Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia Museu Paraense Emilio Goeldi*, Belém, p. 119-138.

- Baylac M, Villemant C, Simbolotti G 2003. Combining geometric morphometrics with pattern recognition for the investigation of species complexes. *Biol J Linn Soc* 80: 89-98.
- Bento DNC, Farias LM, Godoy MF, Araújo JFP 1992. Epidemiologia da doença de Chagas na zona rural do município de Teresina-Piauí, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 25: 51-58.
- Bérenger J, Blanchet D 2007. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 733-736.
- Bitner-Mathé BC, Klaczko LB 1999. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105: 203-210.
- Blanckenhorn WU, Demont M 2004. Bergmann and converse Bergmann latitudinal clines in arthropods: Two ends of a continuum? *Integ Comp Biol* 44: 413-424.
- Bookstein FL 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 435pp.
- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L 2000. Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *J Med Entomol* 37: 872-877.
- Brower AVZ 1994. Rapid morphological radiation and convergence in the butterfly, *Heliconius erato*, inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 6491-6495.
- Brown KS Jr 1974. Quaternary refugia in tropical America: evidence from race formation in *Heliconius* butterflies. *Proc Roy Soc London* 187: 369-378.
- Burmeister H 1835. *Handbuch der Entomologie*. Tome 2, part 1. T.Enslin, Berlin, 400pp.
- Bustamante DM, Monroy C, Menes M, Rodas A, Salazar-Schettino PM, Rojas G, Pinto N, Guhl F, Dujardin JP 2004. Metric variation among geographic populations of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *J Med Entomol* 41: 296-301.

- Campbell KE Jr, Frailey CD, Romero-Pittman L 2006. The Pan Amazonian Ucayli Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and birth of the modern Amazonian River system. *Palaeogeog Palaeoclimatol Paleoecol* 239: 166-219.
- Canale MD, Jurberg J, Carcavallo RU, Galvão C, Galíndez Giron I, Mena Segura CA, Rocha DS, Martinez A 1999. Bionomics of some species In: RU Carcavallo, I Galíndez Girón, J Jurberg, H Lent (Eds.) *Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Vol. III, p. 839-890.
- Carcavallo RU 1999. Climatic factors related to Chagas disease transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 367-369.
- Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock I, Galíndez Girón I, Jurberg J, Galvão C, Mena Segura CA, Noireau F 1999. Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion. In: RU Carcavallo, I Galíndez Girón, J Jurberg, H Lent (eds) *Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Vol. III, p.747-792.
- Carcavallo RU, Rodríguez MEF, Salvatella R, Curto de Casas SI, Sherlock I, Galvão C, Rocha DS, Galíndez Girón, I, Arocha MAO, Martinez A, Rosa J.A. da, Canale, D.M, Farr TH , Barata JMS. 1997. Habitat and related fauna In: RU Carcavallo, I Galíndez Girón, J Jurberg, H Lent (eds.) *Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Vol. II, p.561-620.
- Cardoso da Silva JM, Bates JM 2002. Biogeographical patterns and conservation in the South American cerrado: a tropical savanna hotspot. *Bioscience* 52: 225-233.
- Carreira VP, Soto IM, Hasson E, Fanara JJ 2006. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *J Evol Biol* 19: 1275-1282
- Catalá S 1997. Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): a comparative study over five genera. *Int J Insect Morph Embryol* 228: 67-73.

- Catalá S, Schofield CJ 1994. The antennal sensilla of *Rhodnius*. *J Morph* 219: 193-203.
- Chagas CRJ 1909. Nova Trypanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida no homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- Chapman JW, Goulson D 2000. Environmental versus genetic influences on fluctuating asymmetry in the house fly, *Musca domestica*. *Biol J Linn Soc* 70: 403-413.
- Chávez T, Moreno J, Dujardin JP 1999. Isoenzyme electrophoresis of *Rhodnius* species: a phenetic approach to relationships within the genus. *Ann Trop Med Parasitol* 93: 229-307.
- Cheviron ZA, Hackett SJ, Capparella AP 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Mol Phylogenet Evol* 36: 338-357.
- Conn JE, Mirabello L 2007. The biogeography and population genetics of Neotropical vector species. *Heredity* 99: 245-246.
- Costa GC, Nogueira C, Machado RB, Colli GR 2007. Squamate richness in the Brazilian Cerrado and its environmental-climatic associations. *Divers Distrib* 13, 714-724
- Costa J, Argolo AM, Felix M 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva, Lent 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-52.
- Costa J, Felix M. 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.
- Costa J, Peterson AT, Beard CB 2002. Ecologic niche modeling and differentiation of populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, the most important Chagas' disease vector in Northeastern Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg* 67: 516-520.
- Cox CB, Moore PD 2000. *Biogeography. An ecological and evolutionary approach*. Blackwell Science, Oxford, 298 pp.

- Cuba Cuba AC 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 207-220.
- Cuba Cuba AC, Vallejo GA, Gurgel-Gonçalves R 2007. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) prevalent in the northwestern of Peru: current evaluation of species with epidemiological vectorial capacity. *Parasitol Latinoamer* 62: 154-164.
- Curto de Casas SI, Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Burgos JJ 1999. Bioclimatic factors and zones of life. In: RU Carcavallo, I Galíndez Girón, J Jurberg, H Lent (eds.) *Atlas of Chagas Disease Vectors in Americas*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Vol. III, p. 793-838.
- Del'Arco JO, Bezerra PEL 1989 Geologia. In: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (ed.), *Geografia do Brasil*, Região Centro Oeste, IBGE, Rio de Janeiro, vol. I.
- Dias FBS 2007. *Ecologia de Rhodnius nasutus Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) em palmeiras da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil*, MSc. Thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 118 pp.
- Dias JCP 2007. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 11-18.
- Dias JCP, Schofield CJ. 1999. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I): 103-121.
- Dick CW, Roubik DW, Gruber KF, Bermingham E 2004. Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglosini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Mol Ecol* 13: 3775-3785.
- Diotaiuti L, Dias JCP 1984. Ocorrência e biologia de *Rhodnius neglectus*, Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 293-301.

- Diotaiuti L, Dias JCP 1987. Estudo comparativo do ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* alimentados em pombos e camundongos. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 95-100.
- Diotaiuti L, Lorenzo MG, Dias FBS, Bezerra CM, Garcia MHM, de Paula AS 2005. Influência da espécie de palmeira sobre o tamanho de *Rhodnius nasutus* provenientes de carnaúbas ou babaçus do Ceará, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (Suppl. I): 44.
- Dotson EM, Beard CB 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Mol Biol* 10: 205-225.
- Dujardin JP, Beard CB, Ryckman R 2007. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Infect Gen Evol* 7: 161-167.
- Dujardin JP, Bermudez H, Schofield CJ 1997. The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Tropica* 66: 145-153.
- Dujardin JP, Chávez T, Moreno JM, Machane M, Noireau F, Schofield CJ 1999a. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *J Med Entomol* 36: 653-659.
- Dujardin JP, Forgues G, Torrez M, Martínez E, Córdoba C, Gianella A 1998a. Morphometrics of domestic *Panstrongylus rufotuberculatus* in Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 219-228.
- Dujardin JP, Garcia-Zapata MT, Jurberg L, Roelants P, Cardozo L, Panzera F, Dias JCP, Schofield CJ 1991. Which species of *Rhodnius* is invading houses in Brazil? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 679-680.
- Dujardin JP, Muñoz M, Chávez T, Ponce C, Moreno J 1998b. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. *Med Vet Entomol* 12: 113-115.
- Dujardin JP, Panzera P, Schofield CJ 1999c. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl I): 223-228.

- Dujardin JP, Schofield CJ, Panzerra F 2002. *Los vectores de la enfermedad de Chagas*. Academie Royale des Sciences D'Outre-Mer, Bruxelles, 189 pp.
- Dujardin JP, Steindel M, Chavez T, Ponce C, Moreno J, Schofield CJ 1999b. Changes in sexual dimorphism of Triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 565-569.
- Empeiraire L, Romaña C 2006. Triatominae et Cactaceae: un risque pour la transmission de la Trypanosomose Américaine dans le péri-domicile (Nord-Est du Brésil). *Parasite* 13: 171-178.
- Erwin T 1998. Forest and insects. In: Watt AD, Stork NE, Hunter MD (eds). *A Review in Biodiversity and Conservation*. Chapman and Hall, London.
- Erwin T, Pogue M 1988. *Agra*, arboreal beetles of neotropical forest. Biogeography and forest refugium hypothesis (Carabidae). In: Vanzolini P, Heyer W (eds). *Proceedings of Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- ESRI. 2004. Arcview GIS. Environmental Systems Research Institute, Redlands.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro J 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fairley TL, Póvoa MM, Conn JE 2002. Evaluation of the Amazon River delta as a barrier to gene flow for the regional vector, *Anopheles aquasalis* (Diptera : Culicidae) in northeastern Brazil. *J Med Entomol* 30: 861-869.
- Feliciangeli MD, Sánchez-Martin M, Marrero R, Davies C, Dujardin JP 2007. Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). *Acta Tropica* 101: 169-177.

- Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791
- Fernández G, Juaréz MP, Monroy MC, Meses M, Bustamante DM, Mijailovsky S 2005. Intraspecific variability in *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Guatemala based on chemical and morphometric analyses. *J Med Entomol* 42: 29-35.
- Fitzpatrick SO 2005. *The analysis of the relationship between silvatic and domestic populations of Rhodnius prolixus/robustus (Hemiptera, Reduviidae) in Venezuela by morphometric and molecular methods*. PhD thesis, London School of Hygiene and Tropical Medicine, University of London, UK.
- Forattini OP, Ferreira OA, Rabello EX, Barata JMS, Santos JLF 1983. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana XVII - Desenvolvimento da domiciliação triatomínea regional em centro de endemismo de *Triatoma sordida*. *Rev Saúde Publ São Paulo* 17: 159-199.
- Forattini OP, Ferreira OA, Rocha e Silva EO, Rabello ES 1979. Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana XV - Desenvolvimento, variação e permanência de *Triatoma sordida*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius neglectus* em ecótopos artificiais. *Rev Saúde Publ São Paulo* 12: 220-234.
- Forattini OP, Ferreira OA, Rocha e Silva, EO, Rabello EX, Santos JLF 1971. Aspectos ecológicos da Tripanossomose Americana II - Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. *Rev Saúde Publ São Paulo* 5: 163-191.
- Forster P, Bandelt HJ, Röhl A 2000. *Network 3.1.1.0*. Software free available at www.fluxus-engineering.com. Fluxus Technology Ltda.
- Frailey CD, Lavina EL, Rancy A, de Souza JP 1988. A proposed Plesitocene/Holocene lake in the Amazon basin and its significance to Amazonian geology and biogeography. *Acta Amazonica* 18: 119-143.

- Fu Y-X 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Funk WC, Caldwell JP, Peden CE, Padial JM, De la Riva I, Cannatella DC 2007. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Mol Phylogenet Evol* 44: 825-837.
- Galíndez Girón I, Torres E 1999. Morphometry in the systematics and ecology of the Triatominae. In: Carcavallo RU, Galíndez Girón I, Jurberg J, Lent H (eds). *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Vol II, p. 1115-1159.
- Galíndez Girón I, Valderrama A, Añez N, Marquez V, Torres E, Madrid S, Barazarte R, Marquez J, Gonzalez R 1994. Algunos estudios morfométricos en los Triatominae. I. *Rhodnius prolixus* y *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol Vect* 1: 99-111.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae, Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographic distribution. *Zootaxa* 202:1-36.
- Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Mena Segura CA, Galíndez Girón I, Curto-de-Casas SI 1998. Distribuição geográfica e dispersão alti-latitudinal de alguns gêneros e espécies da tribo Triatomini Jeannel 1919 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 33-37.
- Galvão C, Angulo V 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Department of Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241: 61–68.
- Gamboa CJ 1962. Dispersión de *Rhodnius prolixus* en Venezuela. *Bol Dir Malariol San Amb* 3: 262-272.

- García BA, Powell JR 1998. Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *J Med Entomol* 35: 232-238.
- García BA, Manfredi C, Fichera L, Segura EL 2003. Variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg* 68: 692-694.
- García-Zapata MT, Virgens D, Soares VA, Bosworth A, Marsden PD 1985. House invasion by secondary Triatominae species in Mambaí, Goiás-Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 18: 199-201.
- Gascon C, Malcolm JR, Patton JL, Silva MNF, Bogart JP, Loughheed SC, Peres CA, Neckel S, Boag PT 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of amazonian species. *Proc Nat Acad Sci USA* 97:13672-13677.
- Gaunt MF, Miles MA 2000 The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 557-565.
- Goetz SJ, Prince SD, Small J. 2000. Advances in satellite remote sensing of environmental variables for epidemiological applications. *Adv Parasitol* 47: 289-307.
- Gómez-Nuñez JC. 1969. Resting places, dispersal and survival of Co₆₀-tagged adult *Rhodnius prolixus*. *J Med Entomol* 6: 83-86.
- Gorla DE 2002. Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans*. *Ecol Austral* 12: 117-127.
- Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ 1997. Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Tropica* 63: 127-140.
- Gorla DE, Jurberg J, Catalá S, Schofield CJ 1993. Systematics of *Triatoma sordida*, *T. guasayana* and *T. patagonica* (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 379-385.
- Gorla DE, Porcasi X, Catalá S 2005. Sistemas de información geográfica y sensores remotos como herramientas en los programas de control vectorial de la enfermedad de Chagas. In: Felipe

- Guhl. (Org.). *Memorias primer taller internacional sobre control de la enfermedad de Chagas*. VI Reunión de la Iniciativa Andina para el control de la enfermedad de Chagas, Universidad de los Andes, Bogotá, p. 259-270.
- Guhl F 2007. Chagas disease in Andean countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 29-37.
- Guilherme AL, Pavanelli GC, Silva SV, Costa AL, de Araújo SM 2001. Secondary triatomine species in dwellings and other nearby structures in municipalities under epidemiological surveillance in state of Paraná, Brazil. *Rev Panam Salud Publ* 9: 385-392.
- Gumiel M, Catalá S, Noireau F, Rojas de Arias A, García A, Dujardin JP 2003. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martínez, Olmedo and Carcavallo (Hemiptera, Reduviidae). *Syst Entomol* 28: 173-179.
- Gurgel-Gonçalves R 2003. *Distribuição espacial de populações de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras da espécie Mauritia flexuosa e circulação enzoótica de Trypanosoma cruzi e Trypanosoma rangeli no Distrito Federal, Brasil*. MSc Thesis, Universidade de Brasília, Brasília. 141pp.
- Gurgel-Gonçalves R, Cuba CAC 2007. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* (Lent) e *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg) (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev Bras Zool* 24: 157-163.
- Gurgel-Gonçalves R, Duarte MA, Ramalho ED, Romaña CA, Cuba CAC 2004. Distribuição espacial de populações de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 241-247.
- Gurgel-Gonçalves R, Palma ART, Menezes MNA, Leite RN, Cuba CAC 2003. Sampling *Rhodnius neglectus* (Triatominae) in *Mauritia flexuosa* palm trees (Arecaceae): a field study in the Brazilian Savanna. *Med Vet Entomol* 17: 347-349.

- Haffer J 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Haffer J 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiv Conserv* 6: 451-476.
- Hall JPW, Harvey DJ 2002. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence of Riordinid butterflies. *Evolution* 56: 1489-1497.
- Harry M 1993. Isozymic data question the specific status of some blood-sucking bugs of the genus *Rhodnius*, vectors of Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 492-493.
- Harry M 1994 Morphometric variability in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus*. *Japan J Genet* 96: 233-250.
- Hay SI 2000. An overview of remote sensing and geodesy for epidemiology and public health applications. *Adv Parasitol* 47: 2-35.
- Heitzmann-Fontenelle TJ 1984. Bionomia comparativa de triatomíneos. VII – *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Butantan* 48: 183-188.
- Hendy MD, Penny D 1982. Branch and bound algorithms to determine minimal evolutionary trees. *Mathe Biosci* 59: 277-290.
- Herbreteau V, Salem G, Souris, M, Hugot, JP, González JP 2005. Sizing up human health through remote sensing: uses and misuses. *Parassitologia* 47: 65-81.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 25: 1965-1978.
- Hillis DM, Bull JJ 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst Biol* 42: 38.
- Holsinger KE, Mason-Gamer RJ 1996. Hierarchical analysis of nucleotide diversity in geographically structured populations. *Genetics* 142: 629-639.

- Hutcheson HJ, Oliver JH Jr 1996. Multivariate morphometrics of larvae of the blacklegged tick (*Ixodes scapularis*) with notes on nomenclature. *J Parasitol* 82: 916-925
- Hypša V, Tietz DF, Zrzavý J, Rego ROM, Galvão C, Jurberg J 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 23: 447-457.
- Jaramillo N, Castillo D, Wolff ME 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 667-673.
- Jurberg J, Galvão C 2006. Biology, ecology and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease and implications for human health. In: Wolfgang Rabitsch (Org.), *Hug the bug - For love of true bugs*. Festschrift zum 70. Geburtstag von Ernst Heiss. Denisia zugleich Kataloge Landesmuseen Neue Serie 50. Linz: 19: 1095-1116.
- Kimura M 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- Klug JCF 1834. In: Meyen FJF. *Reise um die Erde, in den Jahren 1830, 1831, und 1832, ausgeführt von FJF Meyen* CW Eichhoff, Berlin.
- Kumar S, Tamura K, Nei M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5:150-163.
- Kristensen TK, Malone JB, Mc Carroll JC 2001. Use of satellite remote sensing and geographic information systems to model the distribution and abundance of snail intermediate hosts in Africa: a preliminary model for *Biomphalaria pfeifferi* in Ethiopia. *Acta Tropica* 79: 73-78.
- Landis JR, Koch GG 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.

- Latreille PA 1811. Insectes de l'Amérique recueillis pendant le voyage de MM de Humboldt et Bonpland. In: Humboldt A & Bonpland A. *Voyage aux régions équinoxiales du nouveau continent*. Vol 1 pp. 197-397.
- Lent H 1948. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Biol* 8: 297-339.
- Lent H 1954. Comentários sobre o gênero *Rhodnius* Stål com descrição de uma nova espécie do Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Biol* 14: 237-247.
- Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas Disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 520-529.
- Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Córdón-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP, Beard CB 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 60: 377-386.
- Levine RS, Peterson AT, Benedict MQ 2004. Geographic and ecologic distributions of the *Anopheles gambiae* complex predicted using a genetic algorithm. *Am J Trop Med Hyg* 70:105-109.
- Lorenzi H, de Souza HM, Costa JTM, de Cerqueira LSC, Ferreira E 2004. *Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 415 pp.
- Lorenzo MG, Minoli SA, Lazzari CR, Paula AS, Diotaiuti L 2003. Microclima dos ecótopos naturais das espécies do gênero *Rhodnius* no município de Tocantinópolis, estado de Tocantins, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 36 (Suppl. I): 425.
- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallón-Gastélum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S 2001. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol* 18: 136-142.

- Martínez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Vargas B, Vidaurre P 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) similar a *Triatoma nigromaculata* Stal, 1859. *Bol Inst Investig S Desarrol* 3: 1-11.
- Matías A, de la Riva JX, Torrez M, Dujardin JP 2001. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 947-950.
- McEwen PK, Lehane MJ 1993. Factors influencing flight initiation in the triatomine bug *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Sci Appl* 14: 321-325.
- McEwen PK, Lehane MJ. 1994. Relationship between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *J Appl Entomol* 117: 217-223.
- McEwen PK, Lehane MJ, Whitaker CJ 1993. The effects of population density on flight initiation in *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *J Appl Entomol* 116: 321-325
- McKenna MC 1973. Sweepstakes, filters, corridors, Noah'arks and beached viking funeral ships in paleogeography. In: Tarling DF, Runcorn SK (eds.) *Implications of continental drift to the earth sciences*. Academic Press, London.
- Mello DA 1977. Biology of Triatominae (Reduviidae, Hemiptera) from north of Formosa county (Goiás-Brazil). II Length of life cycle of *Rhodnius neglectus* Lent 1964. *Rev Soc Bras Med Trop* 11: 63-66.
- Mello DA 1981. Aspectos do ciclo silvestre do *Trypanosoma cruzi* em regiões do cerrado (Município de Formosa, Goiás). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76: 227-246.
- Mello DA 1982. Roedores, marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambai-Goiás. *Rev Saúde Públ* 16: 282-291.
- Miles MA, Arias JR, Souza AA. 1983. Chagas disease in the Amazon basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes* - triatomine vectors of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 391-398.

- Miles MA, Feliciangeli MD, Rojas de Arias A 2003. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 326: 1444-1448.
- Monroy C, Rodas A, Mejía M, Rosales R, Tabaru Y 2003. Epidemiology of Chagas disease in Guatemala: infection rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 305-310.
- Monteiro LR, Reis SF 1999. *Princípios de morfometria geométrica*. Holos, São Paulo, 188 pp.
- Monteiro FA, Donnelly MJ, Beard CB, Costa J 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol* 32: 46-56.
- Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Cordon-Rosales C, Feliciangeli D, Beard, CB 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 12: 997-1006.
- Monteiro FA, Lazoski C, Noireau F, Solé-Cava AM 2002. Allozyme relationships among ten species of Rhodniini showing paraphyly of *Rhodnius* including *Psammolestes*. *Med Vet Entomol* 16: 83-90.
- Monteiro FA, Perez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha DS, Noireau F, Schofield C, Beard CB 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 :851-854.
- Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield J, Beard CB 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460-465.
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB. 2000. Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annu Rev Ecol Syst* 31: 533-563.

- Morrone JJ 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annu Rev Entomol* 51: 467-494.
- Mousseau TA 1997. Ectotherms follow the converse Bergmann's rule. *Evolution*. 51: 630-632.
- Naiff MF, Naiff RD, Barrett TV 1998. Vetores selváticos de doença de Chagas na área urbana de Manaus (AM): atividade do vôo nas estações secas e chuvosas. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 103-105.
- Neiva A 1911. Contribuição para o estudo dos hematofagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de *Triatoma*. *Bras. Méd.* 25: 461-462.
- Noireau F, Dujardin JP 2001. Flight and nutritional status os sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 385-389
- Noireau F, Flores R, Gutiérrez T, Dujardin JP 1997. Detection of wild dark morphs of *Triatoma infestans* in the Bolivian Chaco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 583-584.
- Oliveira AWS, Silva IG 2007. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 204-208.
- Patterson JS 2007. *Comparative morphometrics and molecular genetic analyses of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae)*. PhD thesis, London School of Hygiene and Tropical Medicine, University of London, UK.
- Patterson JS, Schofield CJ 2005. Preliminary study of wing morphometry in relation to tsetse population genetics. *S Afr J Sci* 1001: 132-134.
- Patterson JS, Schofield CJ, Dujardin JP, Miles MA 2001. Population morphometric analysis of the tropicopolitan bug *Triatoma rubrofasciata* and relationships with Old World species of *Triatoma*: evidence of New World ancestry. *Med Vet Entomol* 15: 443-451.

- Pavan MG, Monteiro FA 2007. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Trop Med Int Health* 12: 751-758.
- de Paula AS, Diotaiuti L, Galvão C 2006. Systematics and biogeography of Rhodniini (Heteroptera:Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. *J Biogeogr* 34: 699-712
- de Paula AS, Diotaiuti L, Schofield CJ 2005. Testing the sister-group relationships of the Rhodniini and Triatomini (Insecta: Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mol Phylogenet Evol* 35: 712-718.
- Peterson AT 2001. Predicting species' geographic distributions based on ecological niche modeling. *Condor* 103: 599-605.
- Peterson AT, Cohoon KP 1999. Sensitivity of distributional prediction algorithms to geographic data completeness. *Ecol Model* 117: 159-164.
- Peterson AT, Pereira RS, Neves VFC 2004. Using epidemiological survey data to infer geographic distributions of leishmaniasis vector species. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 10-14.
- Peterson AT, Sánchez-Cordero V, Beard, CB, Ramsey JM 2002. Ecologic niche modelling and potential reservoirs for Chagas disease, Mexico. *Emerg Infect Dis* 8: 662-667.
- Pfeiler E, Bitler BG, Ramsey JM, Palacios-Cardiel C, Markow TA 2006. Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran Desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Phylogenet Evol* 41: 209-221.
- Pinho AP, Gonçalves TCM, Mangia RH, Russel NSN, Cansen AM 1998. The occurrence of *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in the state of Rio de Janeiro, Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 141-143.

- Pizarro JC, Romaña CA 1998. Variación estacional de una población silvestre de *Rhodnius palleescens* Barber, 1932 (Heteroptera: Triatominae) en la costa caribe Colombiana. *Bull Inst Fran Étude Andi*, 27: 309-325.
- Poinar G Jr 2005. *Triatoma dominicana* sp.n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a triatomine-trypanosomatid vector association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5: 72-81
- Prado DE, Gibbs PE 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Ann Missouri Bot Gard* 80: 902-27.
- Prance GT 1982. A review of the phytogeographic evidences for Pleistocene climate changes in the Neotropics. *Ann Missouri Bot Gard* 69: 594-624.
- Quijada-Mascareñas JA, Ferguson JE, Pook CE, Salomão MDG, Thrope RS, Wüster W 2007. Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. *J Biogeogr* 34: 1296-1312.
- Ramírez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F 2002. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Tropica* 84: 189-198.
- Rasanen M, Linna AM, Santos JCR, Negri FR 1995. Late Miocene tidal deposits in the Amazonian foreland basin. *Science* 69: 386-390.
- Ribeiro JF, Walter BMT 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SM Sano, SP Almeida (eds.) *Cerrado Ambiente e Flora*. Embrapa, Planaltina. p. 89-166.
- Ridgely RS, Allnutt TF, Brooks T, McNicol DK, Mehlman DW, Young BE, Zook JR 2005. Digital distribution maps of the birds of the western hemisphere, version 21 NatureServe, Arlington, Virginia, USA.

- Rocha DS, Jurberg J, Carcavallo RU, Cunha V, Galvão C 2001. Influência da temperatura e umidade no desenvolvimento de *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em laboratório (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 357-363.
- Rodriguero MS, Gorla DE 2004. Latitudinal gradient in species richness of the New World Triatominae (Reduviidae). *Glob Ecol Biogeogr* 13: 75–84.
- Rodríguez Rodríguez J, Fuentes González O, Nodarse JF, Monzote Hidalgo L, Dujardin JP 2007. Morphometric changes of *Triatoma flavida*, Neiva 1911 (Hemiptera: Triatominae) in the transition from sylvatic to laboratory conditions. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 42: 127-130.
- Rogers AR, Harpending H 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.
- Rozas J, Sánchez-del Barrio JC, Messeguer X, Rozas R 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496 - 2497.
- Rohlf FJ 1996. Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. In: LF Marcus, M Corti, A Loy, GJP Naylor, and D Slice (eds.), *Advances in morphometrics* NATO ASI, series A, life sciences, Plenum Publication, New York, p. 117-129.
- Rohlf FJ 1999a. *TPSDIG*, version 1.18. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
- Rohlf FJ 1999b. *TPSRELW*, version 1.18. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
- Rohlf FJ, Marcus LF 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol Evol* 8: 129-132.
- Romaña CA, Pizarro JCN, Rodas E, Guilbert E 1999. Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 594-595.

- Rosemary JS, Hines A, Richmond S, Merrick M, Drew A, Fargo R 2000. Altitudinal variation in body size and population density of *Nicrophorus investigator* (Coleoptera: Silphidae). *Environ Entomol* 29: 290-298
- Rossetti DF, Toledo PM, Góes AM 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Res* 63: 78-89.
- Sainz AC, Mauro LV, Moriyama EN, García BA 2004. Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica* 121: 229-240.
- Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sandoval C, Pabón E, Jurberg J, Galvão C 2007. *Belminus ferroae* n.sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443: 55-64.
- Santos GP, Zanuncio TV, Zanuncio JC 2000. Development of *Thyriniteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) on leaves of *Eucalyptus urophylla* and *Psidium guajava*. *An Soc Entomol Bras* 29: 13-22.
- Sarquis O, Borges-Pereira J, Mac Cord JR, Gomes TF, Cabello PH, Lima MM 2004. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99: 263-270.
- Sarquis O, Sposina R, de Oliveira, TG, Mac Cord JR, Cabello PH, Borges-Pereira J, Lima MM 2006. Aspects of peridomiciliary ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 143-147.
- Scachetti-Pereira R 2002. DesktopGarp. The University of Kansas Biodiversity Research Center.

- Scataglini M, Lanteri AA, Confalonieri VA 2006. Diversity of boll weevil populations in South America: a phylogeographic approach. *Genetica* 126: 353.
- Schaefer CW 2003. Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Systematic questions and some others. *Neotrop Entomol* 32: 1-10.
- Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U, Gürtler RE 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J Med Entomol* 41: 643-349.
- Scheiner SM 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annu Rev Ecol* 24: 35-68.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L 2000. *Arlequin ver. 2000*: a software for population data analysis. Switzerland: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory.
- Schofield CJ 2000. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cad Saúde Públ* 16 (Suppl. 2): 89-92.
- Schofield CJ, Dujardin JP 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actual Biol* 21: 183-197.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588.
- Schofield CJ, Lehane MJ, McEwen PK, Catalá SS, Gorla DE 1992. Dispersive flight by *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. *Med Vet Entomol* 6: 51-56.
- Silva IG, Silva HHG 1988. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. II. *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Goiana Med* 34: 29-37.
- Silva IG, Silva JL, Silva HHG, Camargo MF, Moura AF, Elias M, Santos AH 1992. Distribuição dos vetores da Tripanossomíase Americana capturados no ambiente domiciliar no estado de Goiás, no período de 1984/88. *An Soc Ent Bras* 21: 139-154.
- Silva JX, Zaidan RT 2004. Geoprocessamento e análise ambiental: aplicações. Bertrand, Rio de Janeiro, 363 pp.

- Silva RA, Bonifácio PR, Wanderley DMV 1999. Doença de Chagas no estado de São Paulo: comparação entre pesquisa ativa de triatomíneos em domicílios e notificação de sua presença pela população em área sob vigilância entomológica. *Rev Soc Bras Med Trop* 3: 653-659.
- Silva RA, Sampaio SMP, Koyanagui PH, Poloni, M, Carvalho ME, Rodrigues VLCC 2007. Infestação por triatomíneos em assentamentos e reassentamentos rurais na região do Pontal do Paranapanema, estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 527-532.
- Silva RA, Scandar SAS, Sampaio SMP, Pauliquevis C Jr, Rodrigues VLCC. 2003. Programa de controle de doença de Chagas (PCDCH): *Rhodnius neglectus* (Lent, 1954) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 36 (supl. I): 395.
- Silveira AC, Diotaiuti L, Neiva E, Matos CAS, Elias M 1983. Domiciliação do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 no Estado de Goiás, Brasil. *X Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas*, Caxambu-MG.
- Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. 1984. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil. *Rev Bras Malariol D Trop* 39: 15-312.
- Slice DE 2007. Geometric morphometrics. *Annu Rev Anthropol* 36: 261-81.
- Soares RPP, Barbosa SE, Dujardin JP, Schofield CJ, Siqueira AM, Diotaiuti L 1999. Characterization of *Rhodnius neglectus* from two regions of Brazil using isoenzymes, genitalia morphology and morphometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 161-166.
- Soares RPP, Sant'Anna MRV, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH 2000. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *Am J Trop Med Hyg* 62: 157-161.
- Sombroek W 2001. Spatial and temporal patterns of Amazon rainfall. *Ambio* 30: 388-396.

- Sorensen JT, Foottit RG 1992. The evolutionary quantitative genetic rationales for the use of ordination analyses in systematics: phylogenetic implications. In: RG Foottit and JT Sorensen (eds.), *Ordination in the study of morphology, evolution and systematics of insects: applications and quantitative genetic rationales*. Elsevier, New York, pp. 29-53.
- Stål C 1859. Monographie der Gattung *Conorhinus* und Verwandten. *Berliner entomologische Zeitschrift* 3: 99-117.
- StatSoft Inc 1996. *Statistica for Windows*. Tulsa, USA, Computer program manual.
- Stillwell RC, Morse GE, Fox CW 2007. Geographic variation in body size and sexual size dimorphism of a seed-feeding beetle. *Am Nat* 170: 358-269.
- Stockwell DRB, Noble IR 1992. Induction of sets of rules from animal distribution data: a robust and informative method of analysis. *Math Comput Simul* 33: 385–390.
- Stockwell DRB, Peters AT 1999. The GARP modeling system: problems and solutions to automated spatial prediction. *Int J Geog Inf Sci* 13: 143-158.
- Stothard JR, Yamamoto Y, Cherchi A, García AL, Valente SAS, Schofield CJ, Miles MA 1998. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation within triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bull Entomol Res* 88: 553-560.
- Sweeney AW, Beebe NW, Cooper RD, Bauer JT, Peterson AT 2006. Environmental factors associated with the distribution and range limits of the malaria vector *Anopheles farauti sensu stricto* in Australia. *J Med Entomol* 43:1068-1075.
- Swofford DL 1998. *PAUP*. Phylogenetic Analyses Using Parsimony (*and other methods)*. Version 4. Sunderland, Sinauer Associates.
- Tajima F 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

- Teixeira ARL, Monteiro PS, Rebelo JM, Arganaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L, Nascimento R, Venexat CA, Silva AR, Ault SK, Costa JM 2001. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg Infect Dis* 7: 100-112.
- Tejera E 1920. Un nouveau flagellé de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Crithidia*) *rangeli* n.sp. *Bul Soc Path Exot* 13: 527-530.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Tsoar A, Allouche O, Steinitz O, Rotem D, Kadm R 2007. A comparative evaluation of presence only methods for modelling species distribution. *Divers Distrib* 13: 397-405.
- Vargas E, Espitia C, Patiño C, Pinto N, Aguilera G, Jaramillo C, Bargues MD, Guhl F 2006. Genetic structure of *Triatoma venosa* (Hemiptera: Reduviidae): molecular and morphometric evidence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 39-45
- Venkatesan M, Westbrook CJ, Hauer MC, Rasgon JL 2007. Evidence for a population expansion in the west Nile virus vector *Culex tarsalis*. *Mol Biol Evol* 24: 1208-1218.
- Villegas J, Feliciangeli MD, Dujardin JP 2002. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infect Genet Evol* 2: 121-128.
- Wallace AR 1853. A narrative of travels on the Amazon and Rio Negro. London: Reeve.
- Webb SD 1991. Ecogeography and the great American interchange. *Paleobiol* 17: 266-280.
- Webb SD 1995. Biologic implications of the middle Amazon seaway. *Science* 269: 361-362.
- WHO 1991. Control of Chagas disease. *WHO Technical Report Series 811*, 95 pp.
- Wright S 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.

- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, Rojas de Arias A, Miles MA 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol* 35: 225-233.
- Zeledón R, Ugalde JA, Paniagua LA 2001. Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the Collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 757-764.

10. Apêndice

10.1 Lista de publicações relacionadas ao trabalho de tese (2005-2008)

Artigos completos

Gurgel-Gonçalves R, Abad-Franch F, Ferreira JBC, Santana DB, Cuba CAC 2008. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil? *Acta Trop* (aceito para publicação).

Gurgel-Gonçalves R, Cuba CAC 2007. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* (Lent) e *Psammolestes tertius* (Lent & Jurberg) (Hemiptera, Reduviidae) em ninhos de pássaros (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. *Rev Bras Zool* 24: 157-163.

Cuba CAC, Vallejo GA, **Gurgel-Gonçalves R** 2007. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) prevalent in the northwest of Peru: current evaluation of species with epidemiological vectorial capacity. *Parasitol Latinoamer* 62: 154-164.

Gurgel-Gonçalves R, Palma ART, Motta PC, BAR ME, Cuba CAC. 2006. Arthropods associated with the crown of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) palm trees in three different environments from Brazilian cerrado. *Neotrop Entomol* 35: 302 - 312.

Urrea DA, Carranza JC, Cuba CAC, **Gurgel-Gonçalves R**, Guhl F, Schofield CJ, Triana O, Vallejo GA 2005. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infect Genet Evol* 5: 123 - 129.

Resumos apresentados em congressos

Gurgel-Gonçalves R, Ferreira JBC, Cuba CAC 2008. Análise morfométrica de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) de diferentes bacias hidrográficas do Brasil In: *XXVII Congresso Brasileiro de Zoologia*, 2008, Curitiba-PR.

Gurgel-Gonçalves R, Cuba CAC 2007. Wing geometric morphometry for identification of

Rhodnius spp. (prolixus group) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Central Brazil. In: *One hundred years of Tropical Medicine, Meeting the Millenium development goals, 2007*, London. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Centenary Conference Delegate Manual.

Gurgel-Gonçalves R, Gorla DE, Cuba, CAC 2007. Análise e atualização da distribuição geográfica de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) no Brasil através de duas técnicas de sensoriamento remoto. In: *XXIII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses, 2007*, Uberaba-MG.

Gurgel-Gonçalves R, Dias FBS, Ferreira JBC, Diotaiuti L, Cuba CAC 2007. Variação morfológica de populações de *Rhodnius neglectus* e *R. nasutus* (Hemiptera, Reduviidae) através da morfometria geométrica de asas e cápsulas cefálicas. In: *XXIII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses, 2007*, Uberaba-MG.

Gurgel-Gonçalves R, Ferreira JBC, Bar ME, Diotaiuti L, Cuba CAC 2007. Variação morfológica de populações de *Triatoma sordida* (Hemiptera, Reduviidae) através da morfometria geométrica de asas. In: *XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007*, Recife-PE.

Gurgel-Gonçalves R, Luzzy SG, Cuba CAC, Collevatti RG 2007. Filogeografia de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), baseada no polimorfismo de seqüências de citocromo b. In: *53º Congresso Brasileiro de Genética, 2007*, Águas de Lindóia-SP.


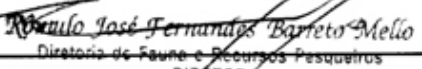
Gurgel-Gonçalves R, Bezerra W, Cuba CAC 2006. Índices de infestação domiciliar de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera Reduviidae) capturados nos municípios de Goiás no período de 2000 a 2005. In: *XXII Reunião de Pesquisa em Doença de Chagas, 2006*, Uberaba-MG.

Gurgel-Gonçalves R, Luzzy SG, Cuba, CAC 2006. Infestação de populações de triatomíneos (Hemiptera Reduviidae) em palmeiras (*Mauritia flexuosa*) de três bacias hidrográficas do Brasil Central. In: *XXII Reunião de Pesquisa em Doença de Chagas, 2006*, Uberaba-MG.

- Gurgel-Gonçalves R**, Santana DB, Starling J, Barbosa J, Cuba CAC 2006. Qual espécie de *Rhodnius* está invadindo as casas no Brasil Central? Uma abordagem da morfometria geométrica de asas. In: *XXII Reunião de Pesquisa em Doença de Chagas*, 2006, Uberaba-MG.
- Gurgel-Gonçalves R**, Cuba CAC 2005. Biogeografia de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Triatominae) e transmissão enzoótica de *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli* no Brasil Central. *Parasitol Latinoamer* 60: 214 - 215
- Gurgel-Gonçalves R**, Cuba CAC 2005. Caracterização de populações de *Rhodnius neglectus* (Hemiptera-Reduviidae) através da morfometria de asas. *Parasitol Latinoamer* 60: 143 - 144
- Gurgel-Gonçalves R**, Cuba CAC, Almeida WC 2005. Estrutura de populações de *Rhodnius neglectus* e *Psammolestes tertius* (Hemiptera-Reduviidae) em ninhos de aves (Furnariidae) presentes na palmeira *Mauritia flexuosa* no Brasil Central. *Parasitol Latinoamer* 60: 151-151.

11. Anexos

11.1 Autorização do IBAMA para coleta e transporte de triatomíneos

 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA COORDENAÇÃO DE GESTÃO DE USO DE ESPÉCIES DA FAUNA LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPOSIÇÃO / FILMAGEM			
NÚMERO DA LICENÇA 052/2005-CGFAU/LIC	Nº DE REGISTRO NO IBAMA xxxxxxxxxx	PERÍODO DE VALIDADE 18/03/2005 a 18/03/2006	PROCESSO IBAMA 02001.009652/2002-03
OBJETO: <input checked="" type="checkbox"/> CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO <input type="checkbox"/> COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) <input type="checkbox"/> TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA <input type="checkbox"/> EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES <input type="checkbox"/> MANUTENÇÃO TEMPORÁRIA DE ANIMAIS EM CATIVEIRO <input type="checkbox"/> OUTROS:		FAVORECIDO: <input type="checkbox"/> ZOOLOGICO <input checked="" type="checkbox"/> INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA <input checked="" type="checkbox"/> PESQUISADOR <input type="checkbox"/> EXPOSITOR/CONCURSO <input type="checkbox"/> CRIADOURO COMERCIAL <input type="checkbox"/> CRIADOURO CIENTÍFICO <input type="checkbox"/> OUTROS:	
FAVORECIDO (ESPECIFICAÇÃO): NOME: Rodrigo Gurgel Gonçalves INSTITUIÇÃO: Universidade de Brasília - UnB ENDEREÇO: Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Área de Patologia, Unidade de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Caixa Postal 4517, Brasília, DF - CEP 70910-900 RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO : Rodrigo Gurgel Gonçalves			
TRANSPORTADOR: O pesquisador favorecido. MEIO DE TRANSPORTE: TERRESTRE PROCEDÊNCIA / LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA: Distrito Federal e Estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Tocantins			
DESTINO: Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores da Faculdade de Medicina - UnB			
LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE / TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM	
Coleta de Triatomíneos	Triatominae	Barbeiros	
OBSERVAÇÕES/ CONDICIONANTES: 1. O Responsável pela Expedição deverá apresentar relatório final ao término da validade desta Licença, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto da presente licença. 3. Esta licença não exime o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória N° 2186-16/01, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso a amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante a autorização expressa do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), nos termos da medida provisória N° 2.186-16/2001 e Decreto N° 3.945/2001.			
LOCAL E DATA DE EMISSÃO Brasília (DF), 18/03/2005.	AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO)  Ronaldo José Fernandes Barreto Melio Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros DIRETOR		
<ul style="list-style-type: none"> • ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA: 1. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO FORA DAS ÁREAS ESPECIFICADAS. 2. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE N° 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO. 3. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL; 4. CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE FAUNA E FLORA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE; 5. EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS OU MATERIAL ZOOLOGICO. • SÃO ISENTAS DE COBRANÇA DE TAXA (RECOLHIMENTO DE DR) INSTITUIÇÕES CIENTÍFICAS, PESQUISADORES E ZOOLOGICOS PÚBLICOS. • VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS. 			

11.2 Autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético N° 032/2006



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO N° 032/2006

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN n.º 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, autoriza:

A UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, FACULDADE DE MEDICINA (UnB) CNPJ n.º 07.339.667/0001-13, representada pelo Reitor Timothy Martin Mulholland, RG n.º 1.907.491 SSP-DF, CPF n.º 150.829.971-49, a acessar amostras de componente do patrimônio genético no âmbito do projeto de pesquisa "Biogeografia de populações de *Rhodnius* spp. (Triatominae) vetores da doença de chagas, associados a palmeiras (Arecaceae) das bacias hidrográficas do Distrito Federal e Brasil Central: uma abordagem entomológico-molecular", sob a coordenação do Prof. Dr. César Augusto Cuba Cuba.

Descrição das amostras:

Espécie(s): *Rhodnius* spp. (Triatominae).

Tipo de material: Barbeiros.

Quantidade de cada amostra (unidade de medida): 01 (hum) microlitro de DNA de *Rhodnius* spp.

Uso pretendido: Sequenciamento de DNA mitocondrial.

Destino do material: Universidade de Brasília e Universidade Católica de Brasília.

Local de depósito de sub-amostra: Departamento de Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas - UnB, (Deliberação CGEN n.º 21/2003).

Validade da Autorização: 05 de julho de 2006 a 05 de julho de 2007. A UnB deverá enviar ao Ibama, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto n.º 4.946/2003. Endereço para envio do(s) relatório(s): IBAMA/ DIFAP/GTPG, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília, DF, 70.818-900.

Esta autorização está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do Processo n.º 02001.009652/2002. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, obriga a instituição beneficiada por esta licença se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao Conselho de Gestão de Patrimônio Genético.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético. Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Ibama, por meio de formulário específico e mediante a apresentação do Termo de Transferência de Material ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Marcus Luiz Barroso Barros
Presidente

Brasília, 04 de julho de 2006.