



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIA CAROLINA VIANA ALVES

Genética e genômica populacional de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) em uma área de alta pressão de infestação domiciliar no Nordeste do Brasil

Population genetics and genomics of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil

CAMPINAS
2024

MARIA CAROLINA VIANA ALVES

Genética e genômica populacional de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) em uma área de alta pressão de infestação domiciliar no Nordeste do Brasil

Population genetics and genomics of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução.

Thesis presented to the Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor, in Genetics and Molecular Biology the area of Animal Genetics and Evolution.

Orientador: Carlos Eduardo de Almeida

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA CAROLINA VIANA ALVES E ORIENTADA PELO DR. CARLOS EDUARDO DE ALMEIDA.

**CAMPINAS
2024**

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

AL87g Alves, Maria Carolina Viana, 1983-
Genética e genômica populacional de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) em uma área de alta pressão de infestação domiciliar no Nordeste do Brasil / Maria Carolina Viana Alves. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Carlos Eduardo de Almeida.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Doenças transmitidas por vetores. 2. Doença de Chagas. 3. Ecoepidemiologia. 4. Insetos vetores. 5. Genotipagem. I. Almeida, Carlos Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Population genetics and genomic of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil

Palavras-chave em inglês:

Vector borne diseases

Chagas disease

Ecoepidemiology

Insect vectors

Genotyping

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Carlos Eduardo de Almeida [Orientador]

Vera Nisaka Solferini

Danilo Ciccone Miguel

Jader de Oliveira

Kaio Cesar Chaboli Alevi

Data de defesa: 24-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5308-8606>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6706126190379283>

Campinas, 24 de junho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Almeida

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel

Prof. Dr. Jader de Oliveira

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa Programa de Genética e Bologia Molecular, do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que tiveram condições de me proporcionar uma educação de qualidade e por me ensinarem a encarar a vida de forma justa e honesta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Carlos Eduardo Almeida pela oportunidade de participar de um projeto de grande relevância, pelos ensinamentos todos esses anos, pela paciência, compreensão e por ter sido fundamental no meu crescimento profissional e pessoal. Mesmo a distância, com uma pandemia acontecendo, conseguimos desenvolver parcerias, trabalhos e artigos. Obrigada!

Agradeço ao meu orientador Dr. Alessandro Alves Pereira por ter dedicado seu tempo a me ensinar, por ter a maior paciência do mundo comigo, por proporcionar momentos de paz e tranquilidade. Agradeço muito pela ajuda imensurável na minha qualificação no começo de uma pandemia e no desenvolvimento do projeto e do artigo. Obrigada, querido Alê!

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas, ao Instituto de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular por me aceitarem como discente, por me proporcionarem oportunidades valiosíssimas de aprendizado, por poder compartilhar experiências com profissionais de excelência, por ter crescido profissionalmente e, principalmente como pessoa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo não somente pelo auxílio financeiro de doutorado direto que fui contemplada (DD FAPESP 2018/04594-6), como também por todo auxílio a pesquisa concedido ao meu orientador (JP FAPESP 2016/08176) e grupo.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ, Demanda Universal, 3128/2021), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ E-26/203.837/2022), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 434260/2018-5) pelo auxílio financeiro ao meu grupo científico.

Agradeço aos meus professores pelas incontáveis contribuições na minha vida acadêmica. E agradeço a quem pude ensinar um pouco do que aprendi, e por aprender um pouco mais com vocês também.

Agradeço ao meu querido amigo Pedro Cordeiro Estrela por ter me indicado para fazer parte do grupo de vetores, pelos conselhos profissionais, por ter me acompanhado a distância, pelas preocupações comigo. Pedro, você tem TOTAL participação nessa empreitada! Não foi fácil, mas nunca estive sozinha...

Agradeço à Dra. Elaine Folly por ter possibilitado que esse projeto existisse. Obrigada, pelas coletas, pelas amostras, pela dedicação ao projeto e por ter contribuído para minha formação.

Agradeço à Dra. Lúcia Maria Abrantes Aguiar da Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte por coordenar todo o trabalho de campo, bem como os monitores de campo de Currais Novos, que forneceram dados, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a minha banca por gentilmente aceitar participar da finalização de uma etapa essencial da minha jornada científica, que cuidadosamente avaliou meu trabalho, me fez críticas construtivas e se

disponibilizou a me corrigir, me ensinar, a discutir e contribuir para meu crescimento profissional. Queridos professores Dra. Vera, Dr. Danilo, Dr. Kaio e Dr. Jader, muito obrigada!

Agradeço a Dra. Vera Nisaka Solferini pela disponibilidade em me receber em seu laboratório para realizar parte fundamental dos meus experimentos, bem como pelas grandiosas contribuições nos eventos da Pós, nas conversas pelo laboratório e principalmente na banca de qualificação. Suas contribuições foram valiosíssimas para o entendimento e interpretação dos meus dados! Agradeço também aos colaboradores do Laboratório de Diversidade Genética, principalmente a querida Célia e a Dra. Milke.

Agradeço a Dra. Patrícia Thyssen pela recepção no Laboratório de Entomologia Integrativa, por facilitar muito nossos experimentos e vivências, por ter sido minha professora e supervisora. Agradeço a oportunidade que me ofereceu de realizar uma das experiências mais gratificantes da minha vida junto com a turma de graduação... Eu (agora) amo (todos) os insetos!

Agradeço a Dra. Anete pela disponibilidade e por ter me recebido no Laboratório de Análise Genética e Molecular para realizar parte fundamental dos meus experimentos. Agradeço também a querida Aline pela ajuda em tantos momentos.

Agradeço ao Dr. Daniello Ciccone por me receber tão gentilmente no Departamento e em seu laboratório, pela orientação nas etapas de cultura, por me ajudar a compreender um pouco mais do universo dos parasitos e por todos os momentos de conversas de corredor muito agradáveis e divertidas sempre.

Agradeço eternamente ao meu querido mentor e amigo Dr. Hector Seuanez Abreu (*in memoriam*) por fornecer instalações e suporte técnico na antiga Divisão de Genética do Instituto Nacional do Câncer para que eu pudesse realizar parte dos meus experimentos, prover gentilmente insumos, por toda minha jornada como bióloga, por me ensinar a ser organizada, a escrever, a ser crítica, por me trazer de volta quando eu precisei, por se uma enciclopédia viva que sinto muita falta.

Agradeço gentilmente ao Laboratório de Genética Tumoral e Oncovirologia do Instituto Nacional do Câncer, minha casa por tantos e tantos anos. Agradeço ao acesso irrestrito à Plataforma Genômica do Departamento pelo suporte de sequenciamento, em especial a Dra Renata Jardim. Agradeço a Dra. Cibele Bonvicino, ao Dr. Miguel Moreira e ao Dr. Marcelo Soares por todo suporte durante meu doutorado e no meu retorno pós pandemia. Não conseguiria desenvolver minha tese sem a compreensão e acolhimento de vocês.

Agradeço aos professores do Departamento de Biologia Animal que por dois anos me ensinaram, compartilharam comigo suas vivências, suas expertises, seus laboratórios, equipamentos, insumos, tempo, paciência e o café. Obrigada aos queridos Profa. Dra. Marlene, Profa. Dra. Silmara, Profa. Dra. Fernanda Cabral, Prof. Dr. Adriano – Profa. Dra. Fernanda Gadelha emprestada da Bioquímica. Agradeço também ao Camilo e o querido Nilson pela ajuda técnica valiosa desde sempre.

Agradeço a minha amiga Carolina Valença por tantas contribuições científicas, por revisar meus textos, por discutir projetos, resultados... Por ser minha companhia conterrânea, que entendia minhas questões, minhas vivências e esteve ao meu lado nas horas mais tensas.

Agradeço aos queridos Marcelo Assis e Daniela Takiya pelas contribuições valiosas nas análises, interpretações e confecção do artigo da minha tese.

Agradeço aos colegas do núcleo de vetores, principalmente Ana Luiza Araujo, Edgard Kamimura e Maurício Liliuso pelo suporte técnico e coleta.

Agradeço imensamente aos amigos da Pós-Graduação que conheci na organização dos I e II GBMeeting, a querida Elisa, Renna, Marina, Ludi, Rafa, João e Lídia. Obrigada pelos momentos de inspiração, por me apoiarem nas horas difíceis e pelos momentos de muitas alegrias e realizações.

Agradeço a minha querida amiga Dra Karen Minori pela amizade incondicional e por ter me amparado na pandemia. Eu não tenho palavras para agradecer a você pela companhia, pelo abrigo, pelo suporte num momento tão tenso de nossas vidas. Agradeço também a Rosana Minori por ser uma mãe incrível pra você e pra mim também.

Agradeço aos tantos amigos de departamento que foram minhas companhias, minha força e alegria. Agradeço aos queridos amigos do LEI Letícia, Ken, Aline, Gabriela, Barbara, Thamiris, Marcela, Maria Clara, Thais, Gisele; aos queridos amigos do LEBIL Karen, Amanda, Mariana, Letícia; aos meus queridos Tabatinha e Thales; aos amados Marina (e nosso José Paulo) e Guilherme do Laboratório de Doenças Tropicais.

Agradeço a minha querida amiga Silvia Justi que abriu o caminho da genotipagem de triatomíneos para que eu pude seguir, que mesmo a distância esteve por perto me aconselhando, me ensinando, fazendo chamadas de vídeo para saber da minha vida e me contar sobre ela e o Leleco. Desde os tempos de FIOCRUZ, eu te agradeço por tudo!

Agradeço a minha querida eterna orientadora e amiga Cibele Rodrigues Bonvicino por exatamente tudo! Não somente por ter me proporcionado entrar na vida científica, mas por ter acreditado em mim, me inserido em projetos, me indicado para vaga no INCA que mudou a minha vida, por ter me inserido em sua vida e sua casa! Agradeço também a sua (nossa) querida família, minhas parceiras Ierece e Ananda que me permitiram participar de suas vidas desde tão pequenininhas.

Agradeço ao meu amado amigo Salvatore Siciliano, amigo de longos anos na ciência... Obrigada pelas revisões e correções do idioma do meu artigo, por me inserir em tantos projetos, por nossos artigos, pelas indicações para revisão e pelo nosso tão especial tópico de pesquisa, fruto de um dos trabalhos que tenho mais orgulho de ter participado. Obrigada, Sal! E obrigada pelas longas conversas e tantas risadas, pelos presentinhos de baleia e peixe-boi...

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Genética Tumoral e Oncovirologia do Instituto Nacional do Câncer, queridos de longa data que foram meu suporte na pandemia, me abraçaram de volta, me ajudaram em diferentes aspectos da minha vida. Um abraço especial para Kariny, Carolina Furtado, Maria Clara, Thalita, Luiza, Renata, Val, Daniel Mattos, Cintia, Renan, Jéssica, Rayque, Rebeca, Carol Richau, Carol Nascimento, Sara e minha amada Andrea Maria.

Agradeço aos meus amigos que ganhei na ciência e levei para a vida... Em especial aos queridos Albert Rahul, Renata Fragelli, Benjamin, Aninha Lazar, Paula Loretta, Diogo Loretto, Leonardo

Loretto, Raquel da Hora, Alexandra Bezerra, Cecília Bueno, Jonathan Oliveira, Thalita Cardozo, Hanna Soares, Michel Barros, Nicole Scherer.

Agradeço às queridas amigas de longa data Hannah Cantanhede, Isis Braga, Priscilla Mangabeira e Suelen Maia. Obrigada pelas saídas, pelos jogos, pelas comidas, pelas festas, pelas vivências tão diferentes com cada uma.

Agradeço ao meu grande e querido amigo de absolutamente todas as horas, Bernardo Teixeira. Obrigada por ser parte da minha família, por me incluir na sua vida, por me abrigar nas horas que precisei.

Agradeço a minha amiga irmã de outra mãe Flavia Abbud por conseguir estar tão perto, mesmo morando tão longe. Agradeço por nunca esquecer e nem desistir de mim, pelos longos áudios e pela compreensão nas minhas ausências, por ter a alma mais bonita e pura que já conheci. Obrigada, baby.

Agradeço a minha nova casa Laboratório de Toxicologia Ocupacional, Ambiental e Vigilância do Câncer da Coordenação de Prevenção e Vigilância do Câncer do Instituto Nacional de Câncer, minhas chefes queridas Dra Marcia Sarpa e Dra Maria Theresa Accioly, que me acolheram e apoiaram muito na escrita e término deste trabalho. Agradeço a todos os profissionais, alunos e amigos queridos que têm acompanhado meu caminho até aqui. Obrigada minhas filhotas Carol, Thayná e Ingrid... Obrigada Ana Paula, Lohane, Jasmyn, Osvaldo, Katia, Leandro, Ubirani Otero, Flavia Carvalho (Fada Carvalho), Floriano e a querida Dona Marilene.

E por fim, agradeço aos meus pais, a quem dediquei esse trabalho. Obrigada por nunca deixarem me faltar nada, por me apoiarem nas minhas aventuras e curiosidades, por me incentivarem, por enlouquecerem e se divertirem com cada bicho que eu queria saber tudo e enfiar no bolso, por me permitirem ser livre para pensar, para ter coragem de não me conformar, de me mover, de não desistir e por terem me criado para ser uma pessoa de bom coração.

“Definitivamente não somos iguais, e é maravilhoso saber que cada um de nós que está aqui é diferente do outro, como constelações. O fato de podermos compartilhar esse espaço, de estarmos juntos viajando não significa que somos iguais; significa exatamente que somos capazes de atrair uns aos outros pelas nossas diferenças, que deveriam guiar o nosso roteiro de vida.”

Ailton Krenak, Ideias para adiar o fim do mundo

“...from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being, evolved...”

Charles Darwin, The Origin of Species

RESUMO

Compreender a dinâmica populacional dos vetores é crucial para o controle eficaz das doenças que transmitem. No semiárido nordestino brasileiro, o triatomíneo *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 persiste como o vetor mais significativo da doença de Chagas, apresentando frequentemente infestação domiciliar persistente. Recentes análises de microssatélites e do gene mitocondrial *Citocromo b* (MT-CYB) detectaram fluxo gênico entre populações de *T. brasiliensis* de ambientes silvestres e domiciliares no estado do Rio Grande do Norte (RN), levantando preocupações relevantes de saúde pública. No município de Currais Novos (RN), uma alta prevalência de reinfestações peridomiciliares por *T. brasiliensis* juntamente com taxas elevadas de infecção por *Trypanosoma cruzi* foram observados, tornando este cenário preocupante, pois populações silvestres representam foco de reinfestação de difícil acesso. Portanto, avaliamos a distribuição da variação genética via sequenciamento convencional do gene MT-CYB ($n = 109$) e via sequenciamento de alta performance de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, $n = 86$) para avaliar o fluxo gênico entre populações distintas distribuídas em pontos geográficos e ambientes variados, principalmente silvestres e peridomiciliares. As amostras disponíveis para análise foram previamente coletadas em comunidades rurais de Currais Novos, num raio de 16 km, e incluiu 14 pontos de amostragem: dois intradomiciliares, oito peridomiciliares e quatro silvestres. Além disso, também incluímos uma população externa localizada a 220 km de distância da área de estudo. Através da análise de variância molecular (AMOVA) do gene MT-CYB, identificamos quatro grupos populacionais distintos com significância estatística ($F_{CT} = 0.42$; $p < 0.05$). Com o método empregado para obter informações de SNP baseado na genotipagem via sequenciamento (GBS) ddRAD-seq, que permite uma análise genômica ampla para inferir a variação genética, identificamos um total de 3.013 SNPs, com 11 *loci* putativamente sob seleção. A variação baseada em 3.002 *loci* neutros evidenciou falta de estruturação genética baseada em baixos valores de F_{ST} ($p > 0.05$), indicando panmixia local. No entanto, três amostras da população externa foram atribuídas a um cluster contrastante com aquelas supostamente sob panmixia local (>98%), validando o marcador genômico recém aplicado para estudos sobre a genética populacional em níveis mais precisos de resolução para *T. brasiliensis*. A presença de estruturação populacional em alguns dos pontos amostrados, conforme sugerido pelo marcador mitocondrial, nos leva a supor que as infestações foram, provavelmente, iniciadas por pequenas populações de fêmeas, cujo evento demográfico representa risco de reinfestações rápidas. O padrão panmítico local revelado pelo marcador GBS representa um desafio para as medidas de controle de vetores, uma vez que os focos de reinfestação podem estar distribuídos por uma ampla área geográfica e ecológica. Em nosso conjunto de dados, os resultados demonstraram que os sinais genéticos de ambos os marcadores foram complementares. Portanto, é essencial considerar a natureza e o padrão de herança de cada marcador ao inferir o padrão de reinfestações.

Palavras-chave: doenças transmitidas por vetores; doença de Chagas; ecoepidemiologia; dispersão vetorial; genotipagem.

ABSTRACT

Understanding the population dynamics of vectors is crucial for the effective control of diseases transmitted by them. In the semi-arid northeastern region of Brazil, the triatomine insect *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 persists as the most significant vector of Chagas disease, often presenting with persistent household infestation. Recent analyses of microsatellites and the mitochondrial gene *Cytochrome b* (MT-CYB) detected gene flow between *T. brasiliensis* populations from sylvatic and domiciliary environments in the state of Rio Grande do Norte (RN), raising relevant public health concerns. In the municipality of Currais Novos (RN), a high prevalence of peridomiciliary reinfestations by *T. brasiliensis* together with high rates of infection by *Trypanosoma cruzi* were observed, making this a worrying scenario as sylvatic populations represent a focus of reinfestation difficult to access. Therefore, we assessed the distribution of genetic variation via Sanger sequencing of the MT-CYB gene ($n = 109$) and high-throughput sequencing of single-nucleotide polymorphisms (SNPs, $n = 86$) to assess gene flow between distinct populations distributed in geographic areas and varied environments, mainly sylvatic and peridomiciliary. The samples available for analysis were previously collected from the rural communities of Currais Novos, within a radius of 16 km, and included 14 sampling points: two domiciliary, eight peridomiciliary, and four sylvatic. Furthermore, we included an external population located 220 km from the study area. Through AMOVA analysis of MT-CYB gene variation, we identified four distinct population groups with statistical significance ($F_{CT} = 0.42$; $p < 0.05$). Using the method employed to obtain SNP information based on ddRAD-seq genotyping-by-sequencing (GBS), which allows genome-wide analysis to infer genetic variation, we identified a total of 3,013 SNPs, with 11 *loci* putatively under selection. The variation based on 3,002 neutral *loci* showed a lack of genetic structure based on low F_{ST} values ($p > 0.05$), indicating local panmixis. However, three samples from the external population were assigned to a cluster contrasting with those supposedly under local panmixia (>98%), validating the genomic marker recently applied for studies on population genetics at more precise levels of resolution for *T. brasiliensis*. The presence of population structure in some of the sampled points, as suggested by the mitochondrial marker, leads us to assume that the infestations were probably initiated by small populations of females, whose demographic event represents a risk of rapid reinfestations. The local panmictic pattern revealed by the GBS marker represents a challenge for vector control measures because reinfestation foci can be distributed over a wide geographic and ecological area. In our dataset, the results demonstrated that the genetic signals of both markers were complementary. Therefore, it is essential to consider the nature and pattern of inheritance of each marker when inferring the pattern of reinfestations.

Keywords: vector-borne disease; Chagas disease; ecoepidemiology; vector dispersal; genotyping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Principais doenças humanas transmitidas por vetores com ocorrência global em áreas ou populações específicas, identificando os vetores (somente artrópodes na tabela e no mapa), as doenças e os patógenos, bem como as estimativas anuais de casos e óbitos, baseado nas estimativas da Resposta Global de Controle Vetorial de 2017 – 2030 da Organização Mundial de Saúde (2017). Quadro adaptado da tabela “Carga global das principais doenças transmitidas por vetores, em março de 2017” (Organização Mundial de Saúde, 2017); figura adaptada de Rinker *et al.*, (2016); e distribuição da oncocercose retirada de página da Organização Mundial de Saúde (Organização Mundial de Saúde, 2022). Em negrito, dados suspeitos ou insuficientes; NA = não disponível. Destaque em Filariose linfática por seus vetores pertencerem a diferentes gêneros de mosquitos. Zonas Tropical e Subtropical aproximadas baseada na classificação climática Köppen-Geiger (Rubel e Kottek, 2010). **32**
- Figura 2.** Esquema das conexões da Gestão Integrada de Vetores ou *Integrated Vector Management* (IVM) proposta pela Resposta Global de Controle Vetorial da Organização Mundial de Saúde (2017), indicando o envolvimento ativo das comunidades locais, a modelagem da dinâmica populacional e transmissão de doenças, o monitoramento, a avaliação de riscos e código de aspectos éticos e, por fim, as abordagens integradas. Imagem modificada de Grilli *et al.* (2021). **33**
- Figura 3.** A) Dinâmica de antroponose da doença de Chagas, mostrando seus ciclos silvestre, domiciliar e peridomiciliar, de acordo com Miles (2003) e Zingales *et al.* (1998). B) Vias de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, indicando os mecanismos primários (transmissão clássica mediada pelo vetor e seu aspecto alimentar hematófago, a contaminação oral via ingestão acidental e contato direto com o parasito por transmissão vertical) e secundários (exemplificando transplante de órgãos, acidente de laboratório, manipulação de animais infectados e ingestão de carne crua de animais infectados. *Triatoma brasiliensis* retirado de Costa *et al.* (2013); *Trypanosoma cruzi* modificado de Chagas (1909). **38**

- Figura 4.** A) Árvore filogenética da classe Insecta, destacando a ordem Hemiptera, bem como a data de divergência do grupo modificada de Misof *et al.* (2014). B) Árvore filogenética do grupo Paraneoptera, incluindo as ordens Hemiptera, Thysanoptera e Psocodea, destacando a família Reduviidae que abriga a subfamília Triatominae modificada de Johnson *et al.* (2018). *Triatoma brasiliensis* de Costa *et al.* (2013). **42**
- Figura 5.** Espécies de insetos da subfamília Triatominae por estado / unidade federativa do Brasil e as seis espécies com maior distribuição geográfica (de Oliveira *et al.*, 2021; Galvão, 2014; Jurberg *et al.*, 2014; Mendes-Sousa *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019). *Panstrongylus geniculatus* de Jurberg *et al.* (2014); Imagens obtidas da Coleção de Triatominae FCFAR - Unesp Araraquara, sendo *P. megistus* (de Oliveira); *Triatoma pseudomaculata* (Pinotti e Ambrozini); *Psammolestes tertius* (de Oliveira); e *T. sordida* (de Paiva *et al.*). *n* = número de estados / unidades federativas. **47**
- Figura 6.** A) Adaptação da filogenia atual de Oliveira *et al.* (2017), destacando o complexo *brasiliensis*, sem as espécies *T. bahiensis* e *T. macromelasoma*. A árvore concatenada representa as análises de Máxima Verossilhança (bootstrap), Bayesiana (probabilidade posterior) e Máxima Parcimônia (bootstrap) dos genes mitocondriais *12S*, *16S*, *MT-CYB* e *MT-COI*. Os valores de suporte no nó indicam a linhagem monofilética do complexo. B) Adaptação da filogenia do complexo *brasiliensis* de Mendonça *et al.*, (2016), sem a espécie *T. petrocchiae*. A árvore representa a análise Bayesiana do gene mitocondrial *MT-CYB*. C) Características morfológicas para identificação de *Triatoma brasiliensis* adulto, seguindo Dale *et al.* (2018). Imagens dos triatomíneos retirados de Dale *et al.* (2018 e 2019). **50**
- Figura 7.** Características que tornam de *T. brasiliensis* o vetor mais significativo de *T. cruzi* e da DC na região nordeste, uma vez que apresenta uma combinação de capacidade de infestação e domiciliação; distribuição mais ampla em diversas escalas geográficas e ecóticas entre as espécies do complexo; variedade de fonte alimentar; altas taxas de prevalência de infecção natural por *T. cruzi* e fluxo gênico irrestrito entre populações de diferentes ecótopos (Gourbière *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2014; Bezerra *et al.*, 2020; Kamimura *et al.*, 2020; Valença-Barbosa *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2016, 2024). **54**

- Figura 8.** Possíveis fontes das infestações em ambiente peridomiciliar, considerando populações domésticas atenuadas, colonizadores selvagens e populações peridomiciliares adjacentes altamente adaptadas a ambientes antrópicos. **54**
- Figura 9.** Área de coleta: (A) Mapa do Brasil, destacando o estado do Rio Grande do Norte e o município de Currais Novos. (B) Imagem de satélite indicando os limites de Currais Novos (linha vermelha) e o transecto com os pontos de amostragem. (C) Imagem de satélite indicando os pontos com suas cores atribuídas na imagem (D). (D) Esquema mostrando as características dos diferentes ecótopos e as cores utilizadas para defini-los. **62**
- Figura 10.** Características dos ecótopos dos diferentes pontos de amostragem. (A) e (B) Ecótopo silvestre, indicando afloramentos rochosos com a vegetação típica de Savana Estépica; Imagens cedidas por Carlos Eduardo Almeida. (C) Ecótopo domiciliar, indicando a busca de insetos no interior de um domicílio, verificando prováveis esconderijos; Imagem de Elias Seixas Loroza, retirada de Jurberg *et al.* (2014). (D1) Exemplo de triatomíneo adulto e ninfas colonizando um ambiente domiciliar, (D2) ovos eclodidos de triatomíneos e (D3) ninfa cujo repasto foi recém realizado; Imagem retirado de Santos *et al.* (2017). (E) Ecótopo peridomiciliar indicando busca ativa em pilhas de tijolos e (F) região ao redor de um domicílio; Imagens de Elias Seixas Loroza e Silvia Andrade Justi, retiradas de Jurberg *et al.* (2014). **63**
- Figura 11.** Fluxograma da seleção das amostras para análises populacionais, onde o passo 01) indica a identificação morfológica de indivíduos adultos observando os caracteres diagnóstico da chave pictográfica atualizada de Dale *et al.* (2018); enquanto o passo 02) indica o isolamento de DNA a partir das pernas dos insetos, utilizando conjunto de reagentes DNeasy Qiagen® e posterior verificação da qualidade das amostras. Imagem do *Triatoma brasiliensis* retirada de Costa *et al.* (2013); Imagens do conjunto de reagentes e do fluorômetro retirados das páginas dos fabricantes. **67**
- Figura 12.** (A) Esquema do genoma mitocondrial, considerando os arranjos e utilizando a nomenclatura original baseado na anotação da sequência referência de *Triatoma dimidiata* (AF301594.1), seguindo Dotson e Beard (2001), indicando o *Citocromo b*. (B) Regiões de pareamento dos iniciadores senso CYTB7432F e antissenso **70**

CYTBR, bem como o tamanho aproximado do produto da PCR; nt = nucleotídeo sítio de anelamento, baseado na posição mais externa no *Citocromo b*. (C) Fluxograma da primeira etapa da identificação molecular através da PCR e sequenciamento da sequência alvo, indicando dois DATASETS que foram construídos. O esquema do mitogenoma é modificado de Li *et al.* (2016), considerando as abreviações dos genes recomendadas pelo Comitê de Nomenclatura Gênica Mundial, excluindo o prefixo “MT” (Eyre, 2006; HGNC Database, 2009); imagem do *Triatoma dimidiata* retirada de Justi e Dale (2021); imagens dos equipamentos retirados das páginas dos fabricantes; a imagem do gel de agarose com produtos de PCR é resultado deste projeto.

Figura 13. Fluxograma da metodologia de construção de bibliotecas para sequenciamento de alta performance (Poland *et al.*, 2012). O fluxograma indica as etapas de 01) digestão dupla utilizando a combinação de endonucleases; 02) ligação de adaptadores e barcode ao DNA fragmentado, purificação e enriquecimento das bibliotecas; 03) quantificação das bibliotecas através de PCR quantitativo; e 04) sequenciamento em plataforma NextSeq. As imagens do gráfico de quantificação e da flowcell com o sequenciamento em ponte, foram retirados das páginas dos fabricantes. 76

Figura 14. Fluxograma modificado de Catchen *et al.* (2013). A1) “*process_radtags*”, indicando fragmentos de DNA com adaptadores e barcodes; A2) “*demultiplexing*”, indicando as sequências por indivíduo; A3) componentes da *tag*, considerando as características das bibliotecas de Poland *et al.* (2012). B1) Pipeline USTACKS, cuja montagem dos catálogos é *de novo*; B2) módulos CSTACKS, realizado para construção de catálogos de *locus* para cada indivíduo e RSTACKS para correção e; B3) módulo STACKS, para comparações dos catálogos de *locus* de diferentes indivíduos. B4) Comandos “*genotypes*”, que atribui haplótipos e genótipos aos indivíduos e; B5) “*populations*”, organiza os *loci* dentro e entre populações, estimando índices de genética de população. 82

Figura 15. Rede de junção mediana (MJ) gerada a partir de 110 sequências MT-CYB de *Triatoma brasiliensis*. Os tamanhos dos círculos na rede correspondem ao número de amostras associadas a cada haplótipo (H). As cores do gráfico circulares e suas fatias representam diferentes locais de coleta, incluindo Currais Novos (CN), 89

Cajazeiras (CZ) e sequências do GenBank (GB), que estão detalhados na legenda localizada no canto inferior da figura. Os comprimentos dos ramos são relativos às distâncias dos haplótipos e os traços indicam etapas mutacionais maiores que um. A escala fornecida na figura denota a distância entre os dois pontos finais do transecto de coleta. O vetor mediano é representado pela sigla mv. Para obter detalhes sobre lista de haplótipos e número amostral, ver tabela 7.

- Figura 16.** Testes de Mantel considerando todos os locais de coleta de *Triatoma brasiliensis*. **91**
- Figura 17.** Distribuição dos dados resultantes da busca no programa Blas2Go para identificação dos *loci* putativamente sob seleção **95**
- Figura 18.** Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) de 86 amostras com base em 3.002 SNPs neutros. A) grupamento das amostras em cinco clusters, indicando os locais de coleta de origem com suas cores pré-definidas. B) Gráfico de barras dos coeficientes de pertencimento dos ecótopos, indicando as cores atribuídas aos clusters; em destaque a amostra CN75D do ecótopo domiciliar. **97**
- Figura 19.** A) Análise estrutural de 86 amostras baseadas em 3.002 SNPs neutros. As cores foram codificadas de acordo com cada local de coleta de Currais Novos (CN) e Cajazeiras (CZ) identificados na legenda das Figura 13. B) Mapa de calor indicando as estimativas de F_{ST} entre locais de coleta, com base nos marcadores SNP neutros. **98**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de espécies da subfamília Triatominae com registro em cada estado ou Unidade Federativa no Brasil, indicando o total de espécies em cada região. Siglas das regiões seguindo o padrão do Manual de Abreviaturas oficial (Ministério da Defesa, 2021). **46**
- Tabela 2.** Pontos de amostragem em Currais Novos (CN) e Cajazeiras (CZ), indicando cada deme/ponto de coleta, os ecótopos amostrados, as localidades e geocoordenadas, bem como o número amostral de indivíduos em estádios ninfais (EN) e adultos (AD) disponíveis para sequenciamento. BR = Brasil; RN = estado do Rio Grande do Norte; PB = estado da Paraíba. **66**
- Tabela 3.** Conjuntos de dados de sequências do MT-CYB de *Triatoma brasiliensis*, indicando a amostragem de cada conjunto de dados (MT-CYB DATASET1 e MT-CYB DATASET2), bem como as inferências realizadas. n = Número amostral; GB = Sequência do Genbank (AY336524); RN = Rio Grande do Norte; PB = Paraíba. **72**
- Tabela 4.** Grupos pré-definidos para realização de Análises de Variância Molecular (AMOVA) das amostras coletadas nos diferentes pontos de amostragem no Município de Currais Novos. **74**
- Tabela 5.** Combinações de enzimas de restrição para testes de digestão dupla, especificando os reagentes utilizados. **76**
- Tabela 6.** Composição da reação de ligação. **78**
- Tabela 7.** Lista de haplótipos de sequências de MT-CYB de *Triatoma brasiliensis* do município de Currais Novos (CN; RN), Cajazeiras (CZ; PB) e Garanhuns (PE; GB AY336524), indicando cada haplótipo (H), número de indivíduos que compartilham cada sequência (n), os indivíduos amostrados e o número de depósito do GenBank. (*) Sequência referência retirada de Monteiro *et al.* (2004). **88**
- Tabela 8.** Estimativas par-a-par de divergência genética (R_{ST}) baseadas em sequências MT-CYB de *Triatoma brasiliensis* de 11 locais de coleta do município de Currais Novos. As linhas superiores indicam valores p baseados em 10.000 permutações; as linhas inferiores indicam valores de F_{ST} . **90**

Tabela 9. Agrupamentos da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de <i>Triatoma brasiliensis</i> com base em sequências MT-CYB, indicando os locais de coleta e as variações percentuais (%) em diversos níveis hierárquicos: entre grupos (Φ_{ct}), entre populações dentro de grupos (Φ_{sc}) e dentro de populações (Φ_{st}), considerando os índices de maior valor com intervalo de confiança significativo ($p>0,05$) como indicador de agrupamentos geneticamente viáveis. A lista completa dos testes se encontra no APÊNDICE F.	92
Tabela 10. Testes de neutralidade das populações de <i>Triatoma brasiliensis</i> com base em sequências de MT-CYB definidas pela AMOVA. Valores significativos ($p>0,05$) estão em negrito.	93
Tabela 11. Resultado do sequenciamento de uma biblioteca de 95 amostras em plataforma NextSeq (Illumina).	93
Tabela 12. <i>Loci</i> putativamente sob seleção, identificando a sequência putativamente de referência (REF) e a variante (VAR), bem como a sequência de nucleotídeos de cada <i>locus</i> . Mais informações no APÊNDICE H.	94
Tabela 13. Resultados da busca no programa Blas2Go para identificação dos <i>loci</i> putativamente sob seleção, considerando a descrição dos resultados com maior score de similaridade.	95
Tabela 14. Estimativas de diversidade genética e endogamia de <i>Triatoma brasiliensis</i> de cada ponto de coleta. São indicados os valores dos coeficientes por ponto e médios de endogamia (F_{IS}), heterozigosidade observada (H_O) e heterozigosidade esperada (H_E). N.A. = não analisado.	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μM	Concentração molar Micromolar
A	Número total de alelos
AMOVA	Análise da distribuição hierárquica da variação genética
AR	Riqueza alélica
BIC	Critério de Informação Bayesiano
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool; Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local</i>
CD	Doença de Chagas
CN	Município de Currais Novos, Rio Grande do Norte, Brasil
CZ	Município de Cajazeiras, Paraíba, Brasil
D	Ecótopo domiciliar
d.p.	Desvio padrão
DAPC	<i>Discriminant Analysis of Principal Components; Análise discriminante de componentes principais</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid; Ácido desoxirribonucleico</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados; uma base (Adenina, Citosina, Guanina e Timina), um açúcar (desoxirribose) e três grupos fosfato
FCT	Variação entre grupos de populações
FIS	Coeficientes de endogamia
FST	Diferenciação genética
GB	GenBank
GBS	<i>Genotyping by sequencing; Genotipagem por Sequenciamento</i>
H	Haplótipos; Número de haplótipos
H	Número de haplótipos
Hd	Diversidade haplotípica
Hd	Diversidade haplotípica
HE	Heterozigosidade esperada

HO	Heterozigosidade observada
HW	Hardy-Weinberg
IBD	Iisolamento por distância
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K	Número de clusters genéticos
K	Diferenças nucleotídicas
km	Quilômetro, medida de distância
LD	Desequilíbrio de ligação
m	Metro, medida de distância
MAF	Frequência do alelo menor
mg	Unidade de medida de massa Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MJ	Reconstrução da mediana
mL	Unidade de medida de volume Microlitro
mM	Concentração molar Milimolar
MT-CYB	Gene mitocondrial <i>Citocromo b</i>
n	Tamanho amostral
ng	Nanograma; Unidade de medida de massa
NGS	<i>Next Generation Sequencing; Sequenciamento de nova geração</i>
P	Ecótopo peridomiciliar
PB	Estado da Paraíba
pb	Pares de bases
PB	Estado da Paraíba, Brasil
PCA	Principal Component Analysis; Análises de Componentes Principais
PCR	Polymerase Chain Reaction; Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Estado de Pernambuco, Brasil
PEG	Polietileno Glicol
pmol	Concentração molar Picomol, 10 ⁻¹² moles
PNCD	Plano Nacional de Combate à Desertificação
r	Correlação entre distâncias genéticas e geográficas
RADseq	Sequenciamento de DNA associado a sítios de restrição
RN	Estado do Rio Grande do Norte, Brasil

RNA	Ácido ribonucleico
RST	Derivado de FST
S	Ecótopo silvático
S	Sítios polimórficos / segregantes
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TE	Elementos Transponíveis, Elementos Móveis
UV	Luz Ultravioleta
π	Diversidade nucleotídica
Φ_{ct}	Varição genética entre indivíduos
Φ_{sc}	Varição entre indivíduos dentro de populações
Φ_{st}	Estimativas de divergência genética entre populações

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de ilustrações	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas e siglas	
I. INTRODUÇÃO	30
I.I. Doenças transmitidas por vetores e a manutenção de endemias	30
I.II. Aspectos da DC e cenário ecoepidemiológico	35
<i>Agente etiológico e dinâmica da transmissão</i>	36
I.III. Insetos vetores do <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
<i>Particularidades da ordem Hemiptera</i>	39
<i>Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae</i>	41
<i>Triatominae no Brasil</i>	45
I.V. <i>Triatoma brasiliensis</i>	48
<i>Complexo brasiliensis</i>	48
<i>Triatoma brasiliensis</i> Neiva, 1911	51
I.V. Marcadores moleculares	55
<i>Genoma mitocondrial e o Citocromo b (MT-CYB)</i>	55
<i>Genotipagem de Polimorfismos em Nucleotídeos Únicos por Sequenciamento (GBS)</i>	57
II. JUSTIFICATIVA	58
III. OBJETIVOS	59
III.I. Objetivo geral	59
III.II. Objetivos específicos	59
IV. MATERIAL E MÉTODOS	60
IV.I. Área de estudo e pontos de amostragem	60
<i>Definição de demes e populações</i>	64
IV.II. Seleção de amostras	64

IV.III. Isolamento de DNA	65
<i>Limitações da seleção de amostras e possível viés do estudo</i>	67
IV.IV. Amplificação do gene mitocondrial <i>Citocromo b</i> e purificação dos produtos	68
IV.V. Sequenciamento de Sanger, análises moleculares e populacionais	69
<i>Sequenciamento de Sanger</i>	69
<i>Análises moleculares e populacionais baseadas no <i>Citocromo b</i></i>	69
DATASET1	71
DATASET2	72
IV.VI. Genotipagem de Polimorfismos em Nucleotídeos Únicos (SNPs)	75
<i>Seleção de amostras</i>	77
<i>Digestão dupla e ligação de adaptadores</i>	77
<i>Purificação e enriquecimento das bibliotecas</i>	78
<i>Corrida NextSeq</i>	79
<i>Construção e comparações de catálogos de locus</i>	80
<i>Análises de seleção e diversidade baseado em SNPs</i>	82
A) <i>Loci putativamente sob seleção</i>	84
B) <i>Loci neutros</i>	84
IV.VII. Produção e edição de imagens	85
V. RESULTADOS	86
V.I. Análises do gene MT-CYB	86
V.I.I. MT-CB DATASET 1	87
<i>Estimativas haplotípicas</i>	87
V.I.II. MT-CB DATASET 2	89
V.II. Genotipagem de SNPs	93
V.II.I. Análises de <i>locus</i> sob seleção	94
V.II.II. Análises de diversidade	96
VI. DISCUSSÃO	100
VI.I. Análises mitocondriais	101
VI.II. Genotipagem de SNPs	102
VI.II.I. <i>Loci</i> putativamente sob seleção	102
VI.II.II. Análises de diversidade baseada em <i>loci</i> neutros	103

VI.III. Implicações para medidas de controle de vetores	104
VII. CONCLUSÕES	106
VIII. REFERÊNCIAS	107
IX. APÊNDICES	128
APÊNDICE A – TABELA 1. Sequências de barcodes e adaptadores utilizados no sequenciamento de alta performance, indicando a combinação utilizada por poço/amostra	129
APÊNDICE B – TABELA 2. Amostras selecionadas pra o estudo, indicando o município e estado, pontos de coleta, ecótopo e indivíduos cujo DNA foi isolado, tratado, quantificado, amplificado e sequenciado por sequenciamento convencional, e as bibliotecas para Sequenciamento de Nova Geração foram indexadas e sequenciadas. As células da coluna “Tratamento com RNase” que estão em branco significam que as amostras estavam degradadas e não foram tratadas, ou que o N amostral desejado já havia sido alcançado. Da mesma forma, a coluna “Quantificação com QUBIT (ng/μL)” e as etapas seguintes.	132
APÊNDICE C – Lista dos espécimes amostrados neste estudo, indicando local de coleta, locais de coleta, ecótopo, coordenadas e número sequencial da amostra individual. As siglas CN estão relacionadas ao município de Currais Novos, RN ao estado do Rio Grande do Norte, CZ ao município de Cajazeiras, PB ao estado da Paraíba e BR ao Brasil. Entre parênteses informamos quais análises foram realizadas; abordagens do gene mitocondrial <i>Citocromo b</i> (MT- <i>CYB</i>) e/ou polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Ao final de cada local de coleta informamos o número total de amostras por localidade (N) e amostras analisadas.	143
APÊNDICE D – TABELA 3. Amostras de <i>Triatoma brasiliensis</i> sequenciadas neste estudo (MT- <i>CYB</i>), indicando a quantidade de sequências geradas, a população (pontos de coleta), o registro da amostra, o iniciador (Citb F senso; Citb R anti-senso), a qualidade da sequência gerada segundo interpretação do eletroferograma e do programa CODON CODE, bem como o tamanho do contig gerado, e as informações de identificação realizadas através da ferramenta BLAST (cobertura e identidade). As cores na coluna “Qualidade” indicam se a	147

sequência pôde ou não ser utilizada, onde somente as sequências em verde foram aproveitadas. (*) indicam que a houve mais de um sequenciamento da amostra.

APÊNDICE E – TABELA 4. Sítios variáveis entre as sequências de MT-CYB de *Triatoma brasiliensis*, considerando a sequência H01 como referência. Para lista de haplótipos, ver Tabela 7. **157**

APÊNDICE F – TABELA 5. Agrupamentos da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de *Triatoma brasiliensis* com base em sequências MT-CYB, indicando os locais de coleta e as variações percentuais (%) em diversos níveis hierárquicos: entre grupos (Φ_{ct}), entre populações dentro de grupos (Φ_{sc}) e dentro de populações (Φ_{st}), considerando os índices de maior valor com intervalo de confiança significativo ($p > 0,05$) como indicador de agrupamentos geneticamente viáveis. Os grupos aninhados indicaram agrupamento intuitivo e testes cegos, mostrando o valor mais significativo para a variação entre grupos de populações em negrito. (*) Valores de p significativos. **158**

APÊNDICE G – TABELA 6. Lista das 95 amostras (e controle) incluídas no pool de bibliotecas de GBS, indicando os resultados da análise de qualidade quanto o total de leituras (*reads*) por amostra, as leituras de baixa qualidade (filtradas e descartadas) e as leituras retidas. Também são identificadas as amostras utilizadas nas análises de seleção e diversidade, e as amostras retiradas das análises de seleção e diversidade (CN71P_1, CN71P_6, CN76P_2, CN76P_12, CN77S_8, CN83S_6, CN84P_2, CN85D_1, CN86P_3). **161**

APÊNDICE H – TABELA 7. *Loci* putativamente sob seleção, identificando a sequência putativamente de referência e a variante, bem como a sequência de nucleotídeos de cada *locus*. **164**

APÊNDICE I – TABELA 8. Resultados da busca no programa Blas2Go para identificação dos *loci* putativamente sob seleção, considerando a descrição dos resultados com maior score de similaridade. **165**

APÊNDICE J – TABELA 9. Resultados da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), indicando os cinco agrupamentos (clusters), indicando cada amostra atribuída com o número 1. **168**

APÊNDICE K – PROPOSTA DE FOLHETO. Versão de folheto para vinculação local, em atendimento às políticas de controle vetorial, enfatizando o complexo *brasiliensis*. O material inclui informações visuais sobre o comportamento do babeyro, bem como características da doença de Chagas, suas manifestações agudas e crônicas, o agente etiológico, as formas de transmissão e os ciclos envolvendo vetores, homem, animais silvestres e domésticos. Ainda, é possível identificar nominalmente as imagens de cada membro do complexo *brasiliensis*, os estados e áreas de ocorrência. Na parte posterior do folheto, são fornecidas informações de ação caso algum inseto seja encontrado. O folheto foi confeccionado utilizando a ferramenta Canva, cujas figuras foram produzidas e editadas nos programas CorelDraw X7 versão 17.1.0.572 e Power Point Office Microsoft 365, utilizando imagens vetoriais gratuitas de bancos de dados online, imagens de paisagens geradas por ferramentas de inteligência artificial do Microsoft Designer (IA creator) e outras imagens de Chagas (1909); Costa *et al.* (2013); Pérez-Molina; Molina (2018), Dale *et al.* (2018), e da Coleção de Triatominae FCFAR - Unesp Araraquara, devidamente creditadas. As instituições de apoio e fomento também foram creditadas, sendo Ministério da Saúde, Sistema Único de Saúde (SUS), Governo do Rio Grande do Norte, Prefeitura de Currais Novos, Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo (FAPESP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ).

170

APÊNDICE L – ARTIGO DA TESE. MANUSCRITO: Population genetics and genomics of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil. Maria Carolina Viana^{a,b,c}, Alessandro Alves-Pereira^d, Marcelo A P Oliveira^e, Carolina Valença-Barbosa^{a,f}, Elaine Folly-Ramos^g, Anete P Souza^d, Daniela M Takiya^h, Carlos E Almeida^{a,b,h}

173

APÊNDICE M – ARTIGOS CORRELATOS: ARTIGO I – Drivers of molecular and morphometric variation in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Triatominae): the resolution of geometric morphometrics for populational structuring on a microgeographical scale. ARTIGO II – Genotypic *Trypanosoma cruzi* distribution and parasite load differ ecotypically and

205

according to parasite genotypes in *Triatoma brasiliensis* from endemic and outbreak areas in Northeastern Brazil. ARTIGO III – From molecules to ecosystems: Insights into a network of interactions for a Chagas disease outbreak using *Triatoma brasiliensis* as natural samplers.

X. ANEXOS	206
ANEXO A – QUADRO 1. Óbitos e coeficiente de mortalidade (CM) tendo como causa básica doença de Chagas, segundo UF de residência. Brasil, 2010 a 2019 (Ministério da Saúde, 2022).	207
ANEXO B – FIGURA 1. Transmissão clássica do <i>Trypanosoma cruzi</i> com participação do inseto vetor, do tipo ciclopropagativa, onde o agente infeccioso se multiplica e sofre alterações no seu estágio de vida no intestino do inseto antes de ser transmitido para um novo hospedeiro, identificando os estágios infectante e diagnóstico. (I) repasto e ingestão de sangue do hospedeiro primário contaminado com a forma evolutiva tripomastigota do <i>T. cruzi</i> ; (II) transformação do parasito em epimastigota; (III) multiplicação no intestino médio do inseto; (IV) diferenciação para a forma tripomastigota metacíclica no intestino posterior; (V) liberação de fezes de barbeiro contaminadas com a forma tripomastigota metacíclica através do local de inoculação; (VI) forma tripomastigota metacíclica invade diferentes células e se diferenciam em amastigota intracelular; (VII) multiplicação por fissão binária; (VIII) amastigota intracelular se transforma em tripomastigota metacíclica e pode ou se transformar em amastigota e se dividir novamente, ou (IX) cair na corrente sanguínea (IX). Imagem confeccionada com imagens de vetor utilizando os programas CorelDraw X7 e Microsoft PowerPoint; <i>T. brasiliensis</i> retirado de Costa <i>et al.</i> (2013); ciclo do parasito confeccionado com ferramenta BioRender; manifestações e características de Pérez-Molina; Molina (2018).	208
ANEXO C – Classificação da Subfamília Triatominae de acordo com GALVÃO e colaboradores (2003), com atualizações de distribuição do gênero <i>Triatoma Laporte, 1832 no Brasil</i> (Goncalves <i>et al.</i>, 2013; Galvão, 2014; Pita <i>et al.</i>, 2016; Silva <i>et al.</i>, 2016, 2019; Alevi <i>et al.</i>, 2017; De Oliveira; Da Rosa; Alevi, 2021; Jurberg <i>et al.</i>, 2008, 2014; Ramos <i>et al.</i>, 2018; Ribeiro <i>et al.</i>, 2019; Mendes-	210

Sousa *et al.*, 2020; Pinotti *et al.*, 2021; Vendrami *et al.*, 2021; Oliveira Correia *et al.*, 2022a, 2022b; 2024; Florêncio *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024).

ANEXO D – Licença permanente para coleta de material zoológico concedida a Dra. Elaine Folly Ramos – Sisbio/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio 32579-1. **213**

ANEXO E – Cadastro de acesso ao patrimônio genético (SISGEN) de número AF53F3B. **215**

ANEXO F – Relatório final da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, e resultados publicados por Vargas e colaboradores (2018). **216**

ANEXO G – Protocolo de precipitação com PEG 20% (Polietileno Glicol 6000, NaCl 5M, H₂O deionizada), de acordo com as especificações dispostas na apostila do Curso de Diagnóstico Molecular e Aconselhamento Genético no Câncer Hereditário do I Curso de Verão em Oncologia Experimental (2010) do Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde. **217**

ANEXO H – Recomendações para o preparo das amostras para sequenciamento na Plataforma Genômica ABI 3130xl – Programa de Genética e Virologia Tumoral do Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde. **219**

ANEXO I – Biblioteca genômica GBS (Poland *et al.* 2012) adaptada segundo protocolo do Laboratório de Análise Genética e Molecular (LAGM) da Universidade Estadual de Campinas. **221**

ANEXO J – Declaração de Bioética e Biossegurança **226**

ANEXO K – Declaração de Direitos Autorais. **227**

I. INTRODUÇÃO

I.I. Doenças transmitidas por vetores e a manutenção de endemias

Vetores são definidos como qualquer organismo capaz de transportar um agente etiológico de um hospedeiro a outro, sendo dispersores de possíveis infecções – e não os causadores (Gubler, 2009). Esses organismos possuem um papel determinante na manutenção de endemias e emergência de doenças infecciosas (Magori e Drake, 2013; Cator *et al.*, 2020), uma vez que, essa dinâmica é modulada pela abundância tanto dos vetores, quanto de hospedeiros e patógenos ao longo do tempo, cuja investigação depende da capacidade de aprimorar nossa compreensão da fonte da infestação através de abordagens como a genética populacional (Magori e Drake, 2013; Cator *et al.*, 2020; Viana *et al.*, 2024).

Embora a modernidade tenha contribuído com estratégias de vigilância de insetos e da transmissão de infecções para humanos, por meio de avanços no combate ou controle dos vetores (Rocha *et al.*, 2020; Sereno, 2022), ao passo que contínuos processos demográficos desordenados e processos ecológicos naturais avançaram no decorrer da história, doenças antes restritas às zonas tropicais e subtropicais são crescentemente reportadas globalmente (McCallum e Dobson, 2002; Confalonieri, 2010; Organização Mundial de Saúde, 2017; Rocha *et al.*, 2020). Visto que a fragmentação de ambientes naturais desencadeia processos de criação de ecótopos de transição, a ocorrência de invasão de vetores aos domicílios, a procura de recursos alimentares e novos abrigos, aproxima o homem de espécies silvestres, possíveis reservatórios ou hospedeiros de enzootias mantidas naturalmente como infecção persistente em espécies do ciclo silvestre (Forattini *et al.*, 1979; Dias-Lima e Sherlock, 2000; Ashford, 2001).

O relatório do Fórum sobre Ameaças Microbianas da Academia Nacional de Ciências (National Academy of Sciences, 2008) aponta que doenças transmitidas por vetores são as principais causas de morbidade e mortalidade – i.e. desvio do estado de bem-estar e frequência de ocorrência de óbitos em uma população definida (Soares *et al.*, 2001) – ao longo da história, acarretando na vulnerabilidade socioeconômica de populações de países majoritariamente localizados nos trópicos e

subtrópicos. Dados da Organização Mundial de Saúde – OMS (2017) indicam que as principais doenças transmitidas por vetores representam cerca de 17% da carga global estimada de doenças transmissíveis, com mais de 80% da população vivendo em regiões de risco e acumulando mais de 700.000 óbitos ao ano. Ainda, de acordo com a Resposta Global de Controle Vetorial (Organização Mundial de Saúde, 2017), as principais doenças humanas transmitidas por vetores com ocorrência global incluem chikungunya, dengue, doença de Chagas, encefalite japonesa, febre amarela, filariose linfática, leishmaniose, malária, oncocercose, Zika e esquistossomose (Figura 1). Entre as doenças relevantes de ocorrência em áreas ou populações específicas, são destacadas doença de Lyme, encefalite transmitida por carrapatos, febre do Nilo e tripanossomíase humana africana. Com exceção da esquistossomose, todas os agentes etiológicos das patologias citadas são transmitidos por vetores artrópodes.

Agentes etiológicos causadores de doenças com potencial dramaticamente devastador são transmitidos por poucas espécies de vetores artrópodes pertencentes a diversas famílias, muitas das quais possuem sua dispersão modulada pela capacidade de vôo (ex. mosquitos) ou hábitos alimentares (ex. triatomíneos). Para identificação dos componentes do ciclo natural de patógenos, hospedeiros silvestres, vetores e do entendimento de sua ecologia básica, os programas de controles de vetores dependem de estudos epidemiológicos, ecológicos, microbiológicos e parasitológicos combinados com estudos médicos e médicos veterinários, e, em grande parte, com compromisso político e aporte financeiro (Ashford, 2001; Belay *et al.*, 2017; Organização Mundial de Saúde, 2017; Akhoundi *et al.*, 2020; Grilli *et al.*, 2021; Sereno, 2022). Quando implementados com sucesso, a efetividade na redução da transmissão e incidência de casos de algumas doenças pode ser observada.

Em um caso de sucesso, a Organização Pan-Americana da Saúde concedeu ao Brasil, no ano de 2006, a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pela espécie exótica introduzida *Triatoma infestans*, após adesão a um programa de controle dos vetores utilizando borrifação de domicílios infestados em extensas áreas do território nacional (Aragão, 1971; Ferreira e Silva, 2006). Importante ressaltar que não houve relato de eliminação da infestação e que a interrupção momentânea da transmissão exige a continuidade dos programas de controle para manutenção do *status* (Ferreira e Silva, 2006).

FIGURA 1. Principais doenças humanas transmitidas por vetores com ocorrência global em áreas ou populações específicas, identificando os vetores (somente artrópodes na tabela e no mapa), as doenças e os patógenos, bem como as estimativas anuais de casos e óbitos, baseado nas estimativas da Resposta Global de Controle Vetorial de 2017 – 2030 da Organização Mundial de Saúde (2017). Quadro adaptado da tabela “Carga global das principais doenças transmitidas por vetores, em março de 2017” (Organização Mundial de Saúde, 2017); figura adaptada de Rinker *et al.*, (2016); e distribuição da oncocercose retirada de página da Organização Mundial de Saúde (Organização Mundial de Saúde, 2022). Em negrito, dados suspeitos ou insuficientes; NA = não disponível. Destaque em Filariose linfática por seus vetores pertencerem a diferentes gêneros de mosquitos. Zonas Tropical e Subtropical aproximadas baseada na classificação climática Köppen-Geiger (Rubel e Kottke, 2010).

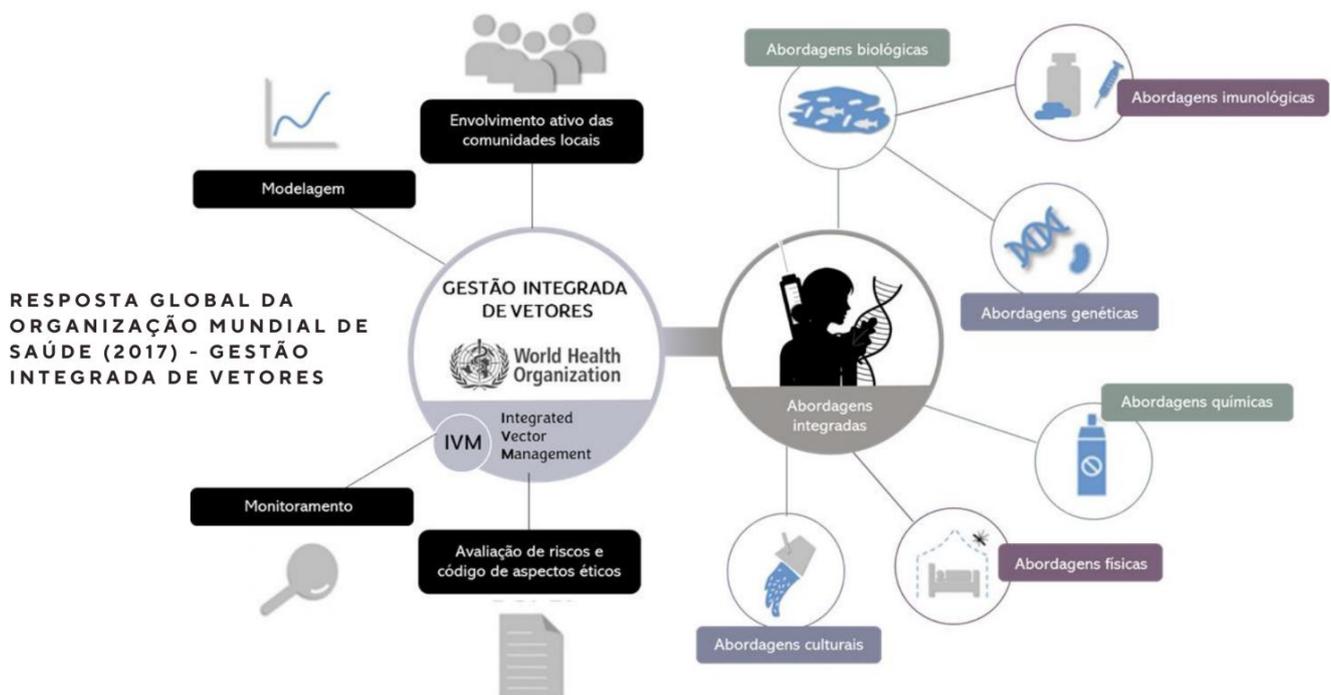
CARGA GLOBAL DAS PRINCIPAIS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR VETORES (OMS, 2017)

Vetores	Doenças causadas	Patógenos	Número anual estimado ou relatado de casos	Número anual estimado de óbitos
Mosquito	Chikungunya (Americas)	Vírus	693.000	NA
	Dengue	Vírus	96 mi	9.110
	Febre Amarela (Africa)	Vírus	130.000	500
	Zika (Americas)	Vírus	500.000	NA
	Malaria	Parasita	212 mi	429.000
	Encefalite Japonesa	Vírus	42.500	9.250
Culex	Febre do Nilo Ocidental	Vírus	2.588	111
	Filariose linfática	Parasita	38 mi	NA
Caramujo aquático	Esquistossomose	Parasita	207 mi	200.000
Mosca preta	Oncocercose	Parasita	15 mi	NA
Flebotomíneo	Leishmaniose cutânea	Parasita	3,9 mi	NA
	Leishmaniose visceral	Parasita	60.800	62.500
Carrapato	Febre hemorrágica da Crimeia-Congo	Vírus	NA	NA
	Doença de Lyme	Bactéria	532.125	NA
	Encefalite transmitida por carrapatos	Vírus	11.000	NA
Triatomíneos	Doença de Chagas (tripanossomiase americana)	Parasita	6,6 mi	10.600
Moscas tsé-tsé	Doença do sono (tripanossomiase africana)	Parasita	10.700	6.900

ZONAS TROPICAL E SUBTROPICAL

Nos dias atuais, além do conhecimento dos componentes de cada cenário epidemiológico, a Resposta Global de Controle Vetorial (Organização Mundial de Saúde, 2017) recomenda estratégias atualizadas de Gestão Integrada de Vetores [*Integrated Vector Management (IVM)*] (Figura 2)] incorporando o envolvimento sinérgico das comunidades locais, a modelagem da dinâmica populacional e da transmissão de doenças, a avaliação de risco e o monitoramento, utilizando ferramentas de vieses culturais, físicos, químicos, biológicos, imunológicos e genéticos (Organização Mundial de Saúde, 2017; Grilli *et al.*, 2021). Considerando aspectos de biocontrole genético para a eliminação da malária no continente africano, James e Santos (2023) recentemente discutiram abordagens em atendimento a IVM, destacando a aplicação bem-sucedida de tecnologias de focadas em mosquitos modificados por gene drive, que se entende pela promoção da herança de certos genes, aumentando a frequência dentro de uma população. A busca por abordagens cada vez mais sensíveis demanda um conhecimento genético básico do indivíduo a ser combatido, e se dá, principalmente, por conta do aumento da resistência dos mosquitos aos inseticidas atuais.

FIGURA 2. Esquema das conexões da Gestão Integrada de Vetores ou *Integrated Vector Management (IVM)* proposta pela Resposta Global de Controle Vetorial da Organização Mundial de Saúde (2017), indicando o envolvimento ativo das comunidades locais, a modelagem da dinâmica populacional e transmissão de doenças, o monitoramento, a avaliação de riscos e código de aspectos éticos e, por fim, as abordagens integradas. Imagem modificada de Grilli *et al.* (2021).



A doença de Chagas (DC) faz parte das zoonoses monitoradas por programas nacionais de vigilância e controle do Ministério da Saúde, cujas ações visam buscar estratégias de vigilância, prevenção e controle (Ministério da Saúde, 2016). A patologia se encontra no grupo das doenças tropicais negligenciadas (NTDs), o que se entende por doenças dos trópicos ou subtropicais, cujos gastos e intervenções efetivas em atenção à saúde pública, pesquisa e desenvolvimento são negligenciados, afetando, exclusivamente, populações vulneráveis e carentes de recursos (Horstick *et al.*, 2015). Atualmente, podemos considerar a DC como problema de saúde pública mundial, uma vez que novos cenários se desenharam a partir de ações migratórias, que desencadearam a detecção de casos da doença em localidades não endêmicas; ou seja, sem transmissão vetorial autóctone (Lidani *et al.*, 2019).

A realização de estudos comportamentais sobre a capacidade de locomoção e populacionais dos insetos vetores voadores visam entender a dispersão, infestação e colonização, estando intimamente ligados as medidas de controle (Robinet *et al.*, 2019). Quer seja em cenários de mudanças ambientais antrópicas que, muitas vezes, resultam em invasão e infestação de vetores no peridomicílio (Romana *et al.*, 2003; Coura *et al.*, 2014; Galvão e Justi, 2015), quer seja na integração de fatores diversos que poderiam contribuir para a adaptação dos triatomíneos (Schofield *et al.*, 1999; Leite *et al.*, 2011; Waleckx *et al.*, 2015), uma vez que a proximidade entre insetos vetores infectados com o agente etiológico e humanos representa uma ameaça significativa (Lilioso *et al.*, 2017).

Carbajal-de-la Fuente *et al.* (2007) já abordaram o padrão de distribuição e densidades populacionais do relevante vetor da DC no nordeste brasileiro, *Triatoma brasiliensis*, a fim de compreender a possível fonte da infestação. A utilização de marcadores moleculares para compreensão da fonte da infestação, levanta questões essenciais para melhorar as medidas de controle de vetores (Almeida *et al.*, 2024). Especificamente, procura-se determinar se os insetos invasores se originam de populações domiciliares pequenas e altamente adaptadas em ambientes criados pelo homem, ou se as populações silvestres também possuem a capacidade de infestar ambientes artificiais. Esta distinção é crucial, uma vez que o segundo cenário representa uma ameaça significativa ao controle dos vetores. As populações silvestres são inacessíveis aos programas de controle tradicionais que dependem da pulverização doméstica com inseticida, representando desafios para as estratégias de intervenção estabelecidas (Viana *et al.*, 2024).

I.II. Aspectos da DC e cenário ecoepidemiológico

Também conhecida como Tripanossomíase Americana, a DC é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, cujos vetores são insetos hematófagos pertencentes à subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) (Lent e Wygodzinsky, 1979). Embora historicamente a ocorrência majoritária de casos da DC seja reconhecida em zonas rurais do México, das Américas Central e do Sul, dados da Organização Mundial de Saúde sugerem que existam entre seis e sete milhões de pessoas afetadas no mundo, com um número estimado de mortes de cerca de 14.000 por ano (Groom *et al.*, 2017; Organização Mundial de Saúde, 2018, 2023); dados recentes estimam DC congênita entre 22 e 108 recém nascidos anualmente e cerca de 10.000 pessoas podem ter sido infectadas por insetos triatomíneos locais no território norte americano (Manne-Goehler *et al.*, 2016; Irish, *et al.*, 2022; Agudelo Higuíta *et al.*, 2024). Segundo revisão de Lidani *et al.* (2019), o número de óbitos por ano pode chegar a drásticos 50.000, avaliando que 65 – 100 milhões pessoas vivam em áreas de risco.

Estimativas atuais do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2022), apontam que o Brasil possui de 1,9 milhão a 4,6 milhões de pessoas afetadas pela DC, representando cerca de 1 a 2,4% da população. Apesar de dados recentes indicarem uma diminuição significativa nas taxas de mortalidade em nível nacional entre os anos de 2009 e 2019, estimativas preliminares indicam o total de 45.409 óbitos (média de 4.541 por ano; ANEXO A), sendo a DC ainda incluída no grupo das quatro maiores causas de óbitos por doenças infecciosas e parasitárias (Ministério da Saúde, 2022; Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2022). Por conta do amplo espectro de órgãos afetados e manifestações, a DC é considerada uma doença multissistêmica, cuja evolução apresenta uma fase aguda, geralmente, assintomática ou com sintomas inespecíficos, e uma fase crônica que pode ocorrer anos após a fase aguda e que pode manifestar as formas cardíaca, digestiva ou cardiodigestiva. Os tecidos infectados manifestam sinais e sintomas que fazem parte do curso clínico na fase crônica, resultado da invasão de formas amastigotas no músculo liso que pode levar a megaesôfago, megacólon e cardiomiopatia (Dias *et al.*, 2016; CDC - Centers for Disease Control and Prevention, 2021).

Agente etiológico e dinâmica da transmissão

Historicamente descrito por Carlos Chagas como *Schizotrypanum cruzi*, o protozoário *T. cruzi*, causador da doença homônima, é um parasito intracelular obrigatório (Chagas, 1909; Kropf e Sá, 2009; Hamilton e Stevens, 2017), cuja transmissão é, principalmente, mediada pelo vetor conhecido como “barbeiro”, taxonomicamente pertencentes a ordem Hemiptera, sendo aqui referenciados como triatomíneos (Chagas, 1909; Neiva, 1910; Jurberg *et al.*, 2015). O vetor e o protozoário possuem origem selvagem, sendo naturalmente e conceitualmente causadores do cenário ecoepidemiológico de enzootia, cuja infecção persistente é transmitida entre animais silvestres (Forattini *et al.*, 1979; Dias-Lima e Sherlock, 2000; Ashford, 2001; Coura, 2015). Entre os tripanossomatídeos restritos ao Novo Mundo, *T. cruzi* e *T. rangeli* Tejera, 1920 parasitam humanos, dentre uma ampla variedade de mamíferos, adicionando complexidade à dinâmica de transmissão e seus diversos ciclos e sobreposições (Hamilton e Stevens, 2017).

Outro aspecto relacionado a complexidade dos ciclos de transmissão é a heterogeneidade genética do *T. cruzi*; entre os genótipos conhecidos – unidades discretas de tipagem (DTUs) –, as unidades TcI a TcVII (TcVII = Tcbat) são atualmente aceitas (Zingales, 2012, 2018). A prevalência dos genótipos responsáveis pela DC em regiões endêmicas, é a linhagem TcI cuja distribuição geográfica ocorre do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e Chile, e em todo território brasileiro (Jansen *et al.*, 2020). Embora descrito em 1908, a infecção humana por *T. cruzi* na América do Sul foi demonstrada por estudos paleoparasitológicos em diferentes situações. Rothhammer *et al.* (1985) observaram sinais da DC em múmias pré-colombianas e Ferreira *et al.* (2000) recuperaram DNA de *T. cruzi* em múmias chilenas e peruanas de até 9.000 anos. No Brasil, Lima *et al.* (2008) detectaram à linhagem relativa ao tipo I em restos humanos oriundas de população de caçadores-coletores datados de 4.500 a 7.000 anos, obtidos do sítio arqueológico brasileiro Abrigo do Malhador, Vale do Peruaçu, estado de Minas Gerais.

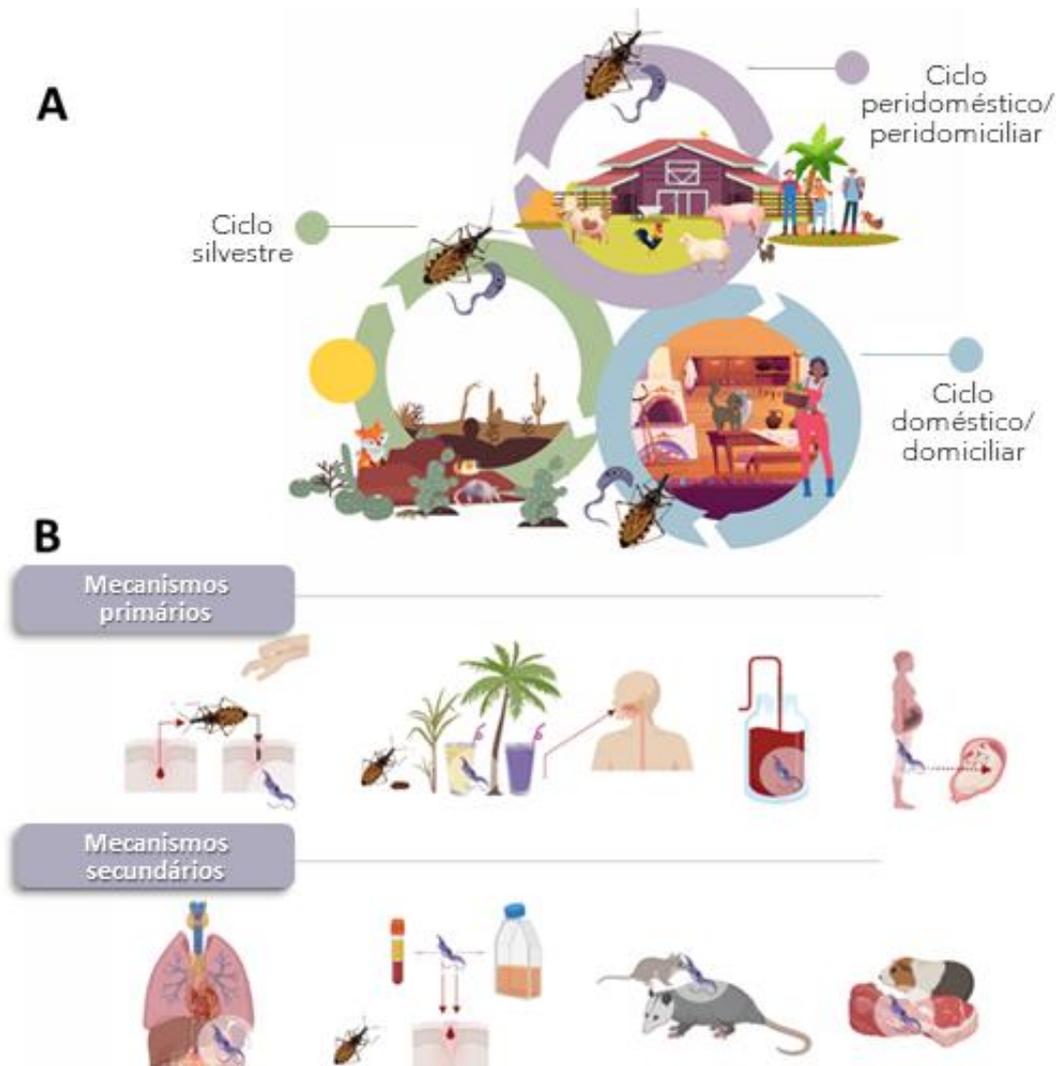
Considerando a dinâmicas ecoepidemiológicas de antropozoonose, cuja infecção pelo *T. cruzi* é transmitida de animais para humanos, tanto quando humanos invadem ambientes naturais, quanto quando vetores ou animais silvestres invadem áreas modificadas (Coura, 2015), existem, ainda, três ciclos tomando como base o ambiente e a disponibilidade de recurso para o inseto vetor (Figura 3A), a saber, ciclo domiciliar, que envolve o homem, os animais domésticos e os vetores domiciliados; ciclo silvestre, que envolve os insetos e animais silvestres; e ciclo peridomiciliar, que envolve os animais sinantrópicos, vetores e o homem (Zingales *et al.*, 1998; Miles, 2003). A circulação de

animais em ambiente modificado e de transição propiciam condições para que ocorra sobreposição dos três ciclos (Fernandes *et al.*, 1994; Groom *et al.*, 2017).

As vias de transmissão do agente etiológico da DC se dividem em dois grupos majoritários: mecanismos primários e secundários (Figura 3B). Os mecanismos primários incluem (i) a transmissão clássica, originalmente, descrita e arduamente demonstrada na literatura (ANEXO B), mediada pelo vetor e compreende seu aspecto alimentar hematófago através do repasto e inoculação, onde o agente infeccioso se multiplica e sofre alterações do seu estágio de vida no intestino do inseto antes de ser transmitido para um novo hospedeiro por meio das fezes (Chagas, 1909; Gubler, 2009); (ii) a contaminação oral via ingestão acidental do inseto e/ou fezes contaminados; e (iii) a contaminação direta pelo contato com o parasito por transmissão vertical (placentária ou congênita e pelo canal de parto). Já os mecanismos secundários, com baixa relevância epidemiológica, incluem a contaminação pelo transplante de órgãos, acidente de laboratório, manipulação de animais infectados (incluindo o contato com o *T. cruzi* eliminado por meio de glândulas odoríferas anais de marsupiais), ingestão de carne crua de animais infectados, transmissão sexual e por infecção induzida (Coura, 2007, 2015; Gorla *et al.*, 2022).

Dados atuais indicam que a transmissão vetorial clássica vem sendo substituída por infecções orais em termos de relevância epidemiológica. Através de ingestão do inseto, suas estruturas e/ou fezes contaminados processados junto com alimentos, essa via de transmissão tem modificado o cenário epidemiológico da DC, juntamente com a dispersão da doença para países não endêmicos devido à migração de pacientes infectados (Coura e Viñas, 2010; Shikanai-Yasuda e Carvalho, 2012; Dias *et al.*, 2016; Lidani *et al.*, 2019; Gorla *et al.*, 2022; Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2022). Os primeiros relatos de transmissão da DC por via oral em território brasileiro são datados dos anos 1960: no Municípios de Estrela em 1965, no estado do Rio Grande do Sul (Coura, 1966; da Silva *et al.*, 1968; Valente *et al.*, 2009); e no município de Belém, no estado do Pará (Lainson *et al.*, 1980; Shaw *et al.*, 1969). Em todos os casos, os grupos de pessoas afetadas pertenciam ao mesmo ciclo social (família ou escola), compartilharam a mesma alimentação e foram reportados casos de óbitos por doença aguda.

FIGURA 3. A) Dinâmica de antroponose da doença de Chagas, mostrando seus ciclos silvestre, domiciliar e peridomiciliar, de acordo com Miles (2003) e Zingales *et al.* (1998). B) Vias de transmissão do *Trypanosoma cruzi*, indicando os mecanismos primários (transmissão clássica mediada pelo vetor e seu aspecto alimentar hematofago, a contaminação oral via ingestão acidental e contato direto com o parasito por transmissão vertical) e secundários (exemplificando transplante de órgãos, acidente de laboratório, manipulação de animais infectados e ingestão de carne crua de animais infectados). *Triatoma brasiliensis* retirado de Costa *et al.* (2013); *Trypanosoma cruzi* modificado de Chagas (1909).



Em uma revisão sobre a transmissão oral, Shikanai-Yasuda e Carvalho (2012) relatam o envolvimento de alimentos contaminados com triatomíneos infectados ou suas fezes (bebidas e/ou alimentos líquidos), ou contaminados com secreções infectadas das glândulas odoríferas anais de marsupiais (bebidas), em estados das regiões Norte (Pará), Nordeste (Bahia, Ceará, Paraíba) e Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) do Brasil. Na Colômbia e na Venezuela, os autores observam

o envolvimento de alimentos contaminados provavelmente com triatomíneos infectados (bebidas). Ainda sobre o nordeste do Brasil, no ano de 2015, dados da Secretaria de Vigilância em Saúde no estado do Rio Grande do Norte, detectaram possível surto de DC por contaminação oral. Baseado em registros de atendimentos médicos e entrevistas com residentes dos municípios de Tenente Ananias, Marcelino Vieira, Alexandria e Pilões, foi confirmada a contaminação via ingestão de caldo de cana contaminado (Vargas *et al.*, 2018).

Considerando o experimento de Nattan-Larrier de 1921, que demonstrou que animais inoculados por via oral pelo *T. cruzi* desenvolveram a doença, Shikanai-Yasuda e Carvalho (2012) hipotetizam que via oral pode ser a principal via de contaminação e de transmissão de doenças humanas agudas na Amazônia, bem como poderia ter sido o principal mecanismo de dispersão de parasitas entre mamíferos. Da mesma forma, Coura (2015) destaca em sua revisão, o endemismo de transmissão oral de DC na Amazônia, considerando a probabilidade de esta ser a via mais frequente entre os animais do ciclo silvestre, uma vez que diversas espécies de mamíferos silvestres possuem dieta onívora ou insetívora, podendo ingerir insetos contaminados.

I.III. Insetos vetores do *Trypanosoma cruzi*

Particularidades da ordem Hemiptera

Os insetos triatomíneos transmissores naturais do *T. cruzi* pertencem à ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae (assassin bugs) (Organização Mundial de Saúde, 2012, 2018; Jurberg *et al.*, 2015). Embora as categorias taxonômicas sejam constantemente revisadas quanto seus *status* hierárquicos, seus agrupamentos, suas nomenclaturas, delimitação de grupos e a definição da entidade como unidade taxonômica operacional (OTU), aceitaremos as definições conhecidas da literatura para fins de uma maior compreensão da vastidão de referências sobre o tema.

Altamente adaptados morfológicamente e comportamentalmente para sobrevivência em diversos ambientes, a ordem Hemiptera é composta por insetos hemimetábolos, terrestres, aquáticos ou semiaquáticos. O tamanho pode variar de 0,5 a 130 mm de comprimento, apresentando antenas com um a dez artículos e tarsos com um a três artículos. A coloração geralmente é uniforme, inconspícua, porém há espécies com coloração contrastante ou brilhante, vermelha, amarela, azul ou verde (Grazia *et al.*, 2024). Classicamente, apresentam dois caracteres certamente mais marcantes e

diferenciais; a composição das asas de indivíduos adultos e o aparelho bucal modificado. A composição das asas que deram o nome a esta ordem (*hemi* = metade; *pteron* = asa), majoritariamente inclui asas anteriores – também conhecidas como hemiélitros – cuja parte basal se apresenta de forma rígida e a parte apical é membranosa, enquanto o par de asas posteriores é completamente membranoso (Forero, 2008; Jurberg *et al.*, 2014; Panizzi e Grazia, 2015; Gonçalves e Costa, 2017). Importante ressaltar que as asas apresentam características e complexidades relativas ao tamanho, forma e estruturas venais muito particulares em basicamente todos os grupos de insetos, sendo caráter diagnóstico para identificação em diferentes níveis taxonômicos (Salcedo *et al.*, 2019). Para além dessa abordagem, técnicas de morfometria geométrica que avaliam marcos anatômicos são alternativas promissoras e econômicas para compreender a variação e as pressões de seleção na morfologia das asas e compreender estruturações intrapopulacionais (Almeida *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2017; Salcedo *et al.*, 2019; de Souza *et al.*, 2020; Kamimura *et al.*, 2020; Sauer *et al.*, 2020; Paschoaletto *et al.*, 2022).

O outro caráter diferencial de extrema importância é o aparelho bucal modificado conhecido como picador-sugador tetraqueta, que se caracteriza pela presença de uma probóscide contendo um canal de sucção labial formado pela justaposição de dois estiletos maxilares e dois estiletos mandibulares, configurando o rostro (Jurberg *et al.*, 2014; Gonçalves e Costa, 2017; Panfilio e Angelini, 2018). As diferenças na estrutura básica do aparelho bucal modificado estão associadas aos diferentes hábitos alimentares que permite que estes insetos se alimentem com sucesso de plantas, fungos, pequenos artrópodes e sangue de vertebrados (Li *et al.*, 2017). Nesse aspecto, as atenções devem ser voltadas para subfamília Triatominae cujos triatomíneos hematófagos obrigatórios se destacam no cenário ecoepidemiológico da DC.

A origem da estrutura bucal altamente modificada desperta grande interesse quanto a história evolutiva dos insetos. Entender as relações de parentesco permite compreender as adaptações morfológicas dos insetos com aparelho bucal mandibular (mastigador), e quando foi adquirido um modo de alimentação perfurante e sugador, em todos os estágios de vida. Observando esse grupo de insetos com características bucais peculiares (ordem Hemiptera em adição das ordens Thysanoptera e Psocodea; anteriormente chamados “hemipteróides”), Johnson *et al.* (2018), tentaram responder as lacunas quanto a diversificação. Os autores observaram a abrangente abordagem filogenômica de análises de máxima verossimilhança de genes codificadores de proteínas provenientes de transcriptomas de diversos grupos de insetos realizada por Misof *et al.* (2014), e compararam com

abordagens semelhantes com foco mais restrito. Misof *et al.* (2014) avaliaram sequências de 1.478 genes de 103 espécies do grupo majoritário dos insetos e suas linhagens, cujas características são notavelmente variadas, e não somente inferiram a provável origem dos insetos (cerca de 479 milhões de anos atrás; Ma), como também a origem da capacidade de vôo (~406 Ma), de diferentes linhagens dentro do grupo majoritário, observaram parafilia de hemipteróides, e monofilia da ordem Hemiptera com tempo estimado de divergência entre 250 e 300 Ma (Figura 4). Já as análises de Johnson *et al.* (2018), focaram apenas nos hemipteróides e utilizaram abordagens mais robustas, envolvendo 193 conjuntos de dados contendo sequências de 2.395 genes. A filogenia datada com base na análise de máxima verossimilhança estimou o tempo de divergência de ordem Hemiptera entre 350 e 400 Ma e heteroptera entre 300 e 350 Ma. Apesar da discordância no tempo de divergência dos grupos e da estruturação da linhagem dos insetos hemipteróides, ambos confirmam a monofilia de heteropteros fortemente suportada.

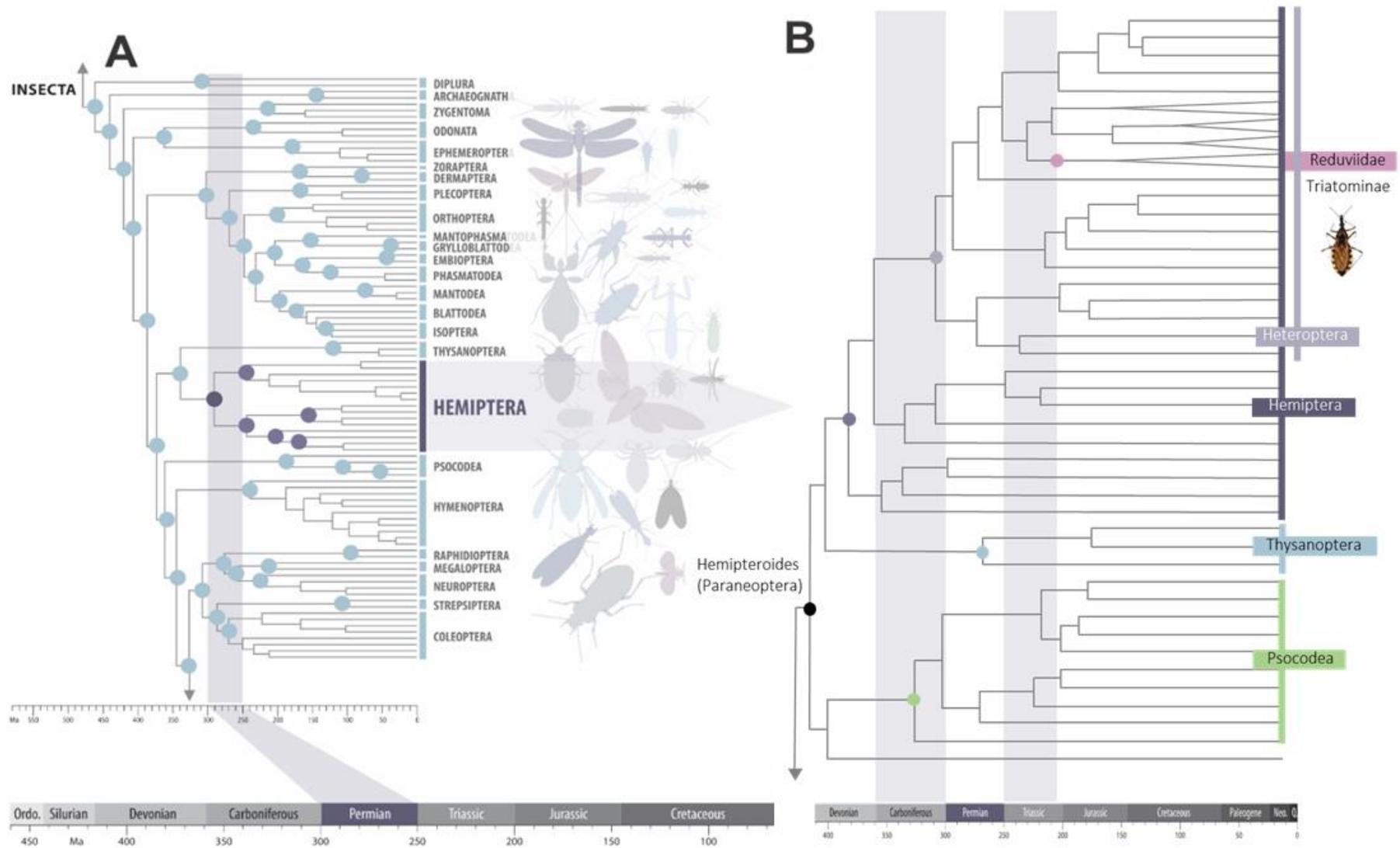
Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae

“Entre os naturais é crença geral que o hematofago é inseto silvestre, vindo á noite, para o interior das cazas, onde se domicilia e se reproduz. Si assim é, não o sabemos, porquanto, nunca nos foi dado verificar aquelle fato e tambem porque nunca encontrámos o inseto fóra de habitações humanas.

*E’ o hematofago referido um hemíptero heteroptero, da familia Reduviidae, gênero **Conorhinus**. A especie é, provavelmente, **megistus BURM.** (Est. 9). O estudo do inseto, especialmente a biolojia delle, vai sendo feito na seção de zoolojia do Instituto, pelo Dr. ARTHUR NEIVA, que do assunto, quando oportuno, dará conhecimento exato.”*

(Carlos Chagas, 1909)

FIGURA 4. A) Árvore filogenética da classe Insecta, destacando a ordem Hemiptera, bem como a data de divergência do grupo modificada de Misof *et al.* (2014). B) Árvore filogenética do grupo Paraneoptera, incluindo as ordens Hemiptera, Thysanoptera e Psocodea, destacando a família Reduviidae que abriga a subfamília Triatominae modificada de Johnson *et al.* (2018). *Triatoma brasiliensis* de Costa *et al.* (2013).



Embora os insetos triatomíneos tenham sido apresentados no século XVIII nas Memórias para a História dos Insetos, ou *Mémoires pour servir à l'histoire des Insectes* (Geer, 1773) descrevendo *Cimex rubrofasciatus* – atualmente *Triatoma rubrofasciata* – de fato Arthur Neiva (1910) foi o pioneiro na observação detalhada do ciclo de vida e o comportamento de um inseto hematófago triatomíneo, *Conorhinus megistus*, atualmente chamado *Panstrongylus megistus* (Garcia, 2009; Galvão e Jurberg, 2014). Investigando os chamados “barbeiro, chupança, chupão, fincão ou bicho de parede” pelo Brasil, Neiva verificou a localidade de Itapura (estado de São Paulo) infestada – hipoteticamente – por duas espécies de *Conorhinus*, as quais foram reveladas como duas espécies pertencentes a outro gênero.

De forma geral, os triatomíneos possuem morfologia básica muito similar, apresentando aparelho bucal modificado, escutelo evidente e tamanho grande de 20 a 28 mm. No entanto além do padrão da coloração bastante variado podendo ser principalmente marrom escuro, com diferentes motivos em outros tons (de marrom, amarelo, laranja, vermelho e preto), uma importante característica morfológica é a posição de inserção do tubérculo antenífero, considerada como característica diagnóstica entre os três principais gêneros (Galvão e Paula, 2014; Jurberg *et al.*, 2014, 2015). Desde as primeiras observações, os triatomíneos receberam uma variedade de nomes populares em diferentes regiões do Brasil, com referência à alguma característica fenotípica ou algum aspecto de sua história natural, que permitem que sejam identificados através do senso comum (Jurberg *et al.*, 2015).

Entre as características dos hábitos de vida compartilhadas por espécies dessa subfamília, estão as adaptações e habilidades desenvolvidas como a associação de adultos e ninfas aos habitats de seus hospedeiros. Os triatomíneos são hematófagos obrigatórios para ambos os sexos e estágios do desenvolvimento, e a baixa disponibilidade e acesso natural desse recurso implica diretamente em estratégias no mecanismo de alimentação que lhes permitam completar seu ciclo de vida (Lazzari, 2014). Dessa forma, essa associação parece ser vantajosa, uma vez que os insetos não precisam de muito esforço para procurar fontes alimentares, especialmente no caso de ninfas que se movem apenas caminhando, já que não possuem asas para realizar atividades de voo. Partindo desses pressupostos, os triatomíneos são encontrados ocupando diferentes nichos e explorando seus recursos, habitando ninhos e outros agregados de hospedeiros, estruturas naturais como afloramentos rochosos, troncos, palmeiras e cactos, bem como estruturas modificadas como construções, pilhas de telhas, lenha,

currais e galinheiros (Schofield *et al.*, 1999; Sarquis *et al.*, 2004, 2010; Valença-Barbosa *et al.*, 2014; Jurberg *et al.*, 2014, 2015; Galvão e Justi, 2015; Gorla e Noireau, 2017; Lima-Neiva *et al.*, 2021).

Com distribuição majoritariamente neotropical, os triatomíneos ocorrem em diversas ecorregiões do sul dos Estados Unidos até a Patagônia, havendo relatos de sua presença na África, Ásia e costa da Austrália; atualmente não existem relatos em ambientes de baixa temperatura extrema (Jurberg *et al.*, 2015; Gorla e Noireau, 2017; Organização Mundial de Saúde, 2023). Uma vez que insetos são seres ectotérmicos, suas respostas fisiológicas e populacionais podem ser aceleradas em temperaturas altas e baixa umidade, acarretando aumento de taxas metabólicas, expansão populacional, maior frequência de alimentação, o que define diretamente o tempo do ciclo de vida quando as ninfas mudam seus instares (N1 a N5) até se tornarem adultos (Neiva, 1910; Jurberg *et al.*, 1986, 2014, 2015; Costa *et al.*, 2013; Gorla e Noireau, 2017; Souza *et al.*, 2022).

Em sua revisão de estudos de genética e evolução de triatomíneos com objetivo de traçar estratégias para o controle da transmissão da DC, Gourbière *et al.* (2012) destacam que o fato de que boa parte das pesquisas são motivadas pela relevância epidemiológica, do que de fato para fins de distinções taxonômicas clássicas. O significado epidemiológico dos triatomíneos varia e depende de seus papéis nos ciclos de transmissão silvestre e peridomiciliar (Fernandes *et al.*, 1994; Zingales *et al.*, 1998; Miles, 2003; Lima *et al.*, 2008; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2021). Considerando a importância do hábito alimentar e características como grande habilidade de infestação, capacidade vetorial e capacidade de domiciliação, e considerando a abundância e variedade dos grupos, um número pequeno de espécies apresenta relevância epidemiológica. No entanto, considerando que algumas espécies tenham capacidade de infestar domicílios em comunidades rurais, as modificações no cenário epidemiológico acarretaram o registro de espécies de triatomíneos em ambientes urbanos no Brasil (Costa *et al.*, 2021; Carbajal-de-la-Fuente *et al.*, 2022; Gorla *et al.*, 2022; Souza *et al.* 2022).

Atualmente, são reconhecidas cerca de 158 espécies válidas (sendo três espécies fósseis) de 18 gêneros da subfamília Triatominae no mundo, entre vetores e possíveis vetores de *T. cruzi*, com base e diversas características e conceitos morfológicos, filogenéticos e ecológicos integrados (Oliveira *et al.*, 2018; Dorn *et al.*, 2018; Lima-Cordón *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2019; Poinar, 2019; Costa, Lima-Neiva, Almeida, 2020; Ceccarelli *et al.*, 2022; Campos *et al.*, 2024). Considerando as características das espécies descritas principalmente endêmicas do Novo Mundo, a subfamília Triatominae abrange cinco categorias taxonômicas de tribo; Alberproseniini, Bolboderini,

Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini, sendo estas duas últimas as tribos mais diversas e epidemiologicamente relevantes (Galvão *et al.*, 2003; Justi e Galvão, 2017).

Um banco de dados de distribuição de triatomíneos pelas Américas chamado DataTri compreendeu os limites norte e sul oriundos de pesquisas publicadas, informações de colaboradores e de trabalhos de campo. No ano de 2018, foram compilados dados de 21.815 geocoordenadas entre os anos de 1904 e 2017, que apontaram a presença de 135 espécies em 24 países, cujos números relativos demonstram a prevalência de 97% dos registros dos gêneros *Rhodnius* (9,01%) da tribo Rhodniini, e *Triatoma* (67%) e *Panstrongylus* (20,81%) da tribo Triatomini (Ceccarelli *et al.*, 2018). No ano de 2020, foram incorporados mais 5.893 registros (total de 27.708 registros) ao conjunto de dados, que atualmente (2022) se subdivide em dois conjuntos complementares; dados americanos contendo 11.791 registros dos anos 1926 a 2022, e dados argentino contendo 15.917 registros dos anos 1912 a 2019 (Ceccarelli *et al.*, 2022). Além dessa subdivisão do conjunto de dados original, a versão atualizada do DataTri ainda inclui a incorporação de novas espécies de triatomíneos descritas entre 2018 e 2021; sinônimas e transferências formais de espécies, e novos registros de distribuição geográfica. Considerando o número de potenciais vetores que contribuem para manter a transmissão do *T. cruzi*, a distribuição de triatomíneos em diferentes ecorregiões e as modificações nos cenários ecoepidemiológicos, devemos considerar que a DC nunca será erradicada (Monteiro *et al.*, 2018), a não ser por programas de controle e vigilância massiva e a longo prazo.

Triatominae no Brasil

Atualmente são reconhecidas cerca de 63 espécies de 10 gêneros da subfamília Triatominae no Brasil (ANEXO C); *Alberprosenia* Martínez & Carcavallo, 1977, *Belminus* Stål, 1859, *Microtriatoma* Prosen & Martínez, 1952, *Parabelminus* Lent, 1943, *Cavernicola* Barber, 1937, *Psammolestes* Bergroth, 1911, *Eratyrus* Stål, 1859, *Rhodnius* Stål, 1859, *Panstrongylus* Berg, 1879 e *Triatoma* Laporte, 1832, com a prevalência esperada dos três últimos gêneros (Galvão, 2014; Jurberg *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019; de Oliveira *et al.*, 2021; Mendes-Sousa *et al.*, 2020).

As espécies com ocorrência no Brasil possuem área de distribuição por todos os estados / unidades federativas (Tabela 1), apresentando maior riqueza de espécies em regiões secas do Centro

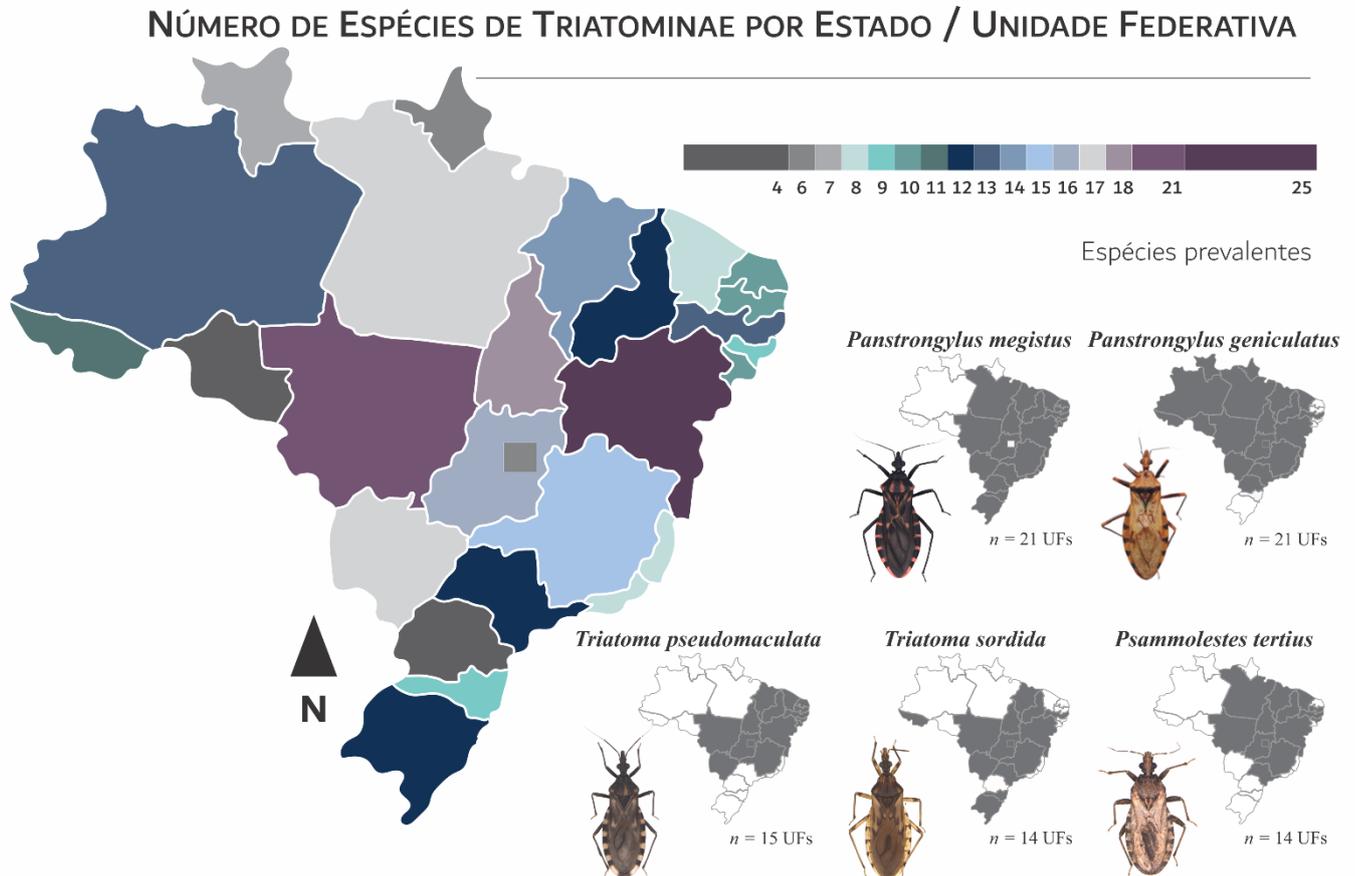
e Nordeste do Brasil, como as ecorregiões do Chaco, Cerrado e Caatinga (Ceccarelli *et al.*, 2020). Os dados mais recentes apontam para o estado da Bahia com o maior número de espécies identificadas (25 espécies) e a região Nordeste apresentando registro de 31 das 63 espécies com distribuição em território brasileiro (Galvão, 2003, 2014; Jurberg *et al.*, 2008, 2014; Costa *et al.*, 2013; Pita *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Alevi *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019; Mendes-Sousa *et al.*, 2020; de Oliveira *et al.*, 2021; Pinotti *et al.*, 2021; Vendrami *et al.*, 2021; Oliveira-Correia *et al.*, 2022; Florêncio *et al.*, 2023). Considerando o número de unidades federativas (UFs) para uma estimativa de distribuição geográfica (não considerando extensão territorial), atualmente *Panstrongylus megistus* e *P. geniculatus* são as espécies com maior distribuição, sendo relatadas em 21 UFs (Figura 5).

Tabela 1. Número de espécies da subfamília Triatominae com registro em cada estado ou Unidade Federativa no Brasil, indicando o total de espécies em cada região. Siglas das regiões seguindo o padrão do Manual de Abreviaturas oficial (Ministério da Defesa, 2021).

REGIÕES	Número de espécies da Subfamília Triatominae por Estado / Unidade Federativa (UF) no Brasil								TOTAL
NORTE									
UF	AC	AM	AP	PA	RO	RR	TO		
<i>n</i> espécies	11	13	6	17	9	7	18		25
NORDESTE									
UF	AL	BA	CE	MA	PB	PE	PI	RN	SE
<i>n</i> espécies	9	25	8	14	10	13	12	10	10
CENTROESTE									
UF	DF	GO	MS	MT					
<i>n</i> espécies	6	16	17	21					27
SUDESTE									
UF	ES	MG	RJ	SP					
<i>n</i> espécies	8	15	8	12					21
SUL									
UF	PR	RS	SC						
<i>n</i> espécies	9	12	4						18

Região Norte: (AC) Acre, (AM) Amazonas, (AP) Amapá, (PA) Pará, (RO) Rondônia, (RR) Roraima, (TO) Tocantins. Região Nordeste: (AL) Alagoas, (BA) Bahia, (CE) Ceará, (MA) Maranhão, (PB) Paraíba, (PE) Pernambuco, (PI) PiauÍ, (RN) Rio Grande do Norte, (SE) Sergipe. Região Centroeste: (DF) Distrito Federal, (GO) Goiás, (MS) Mato Grosso do Sul, (MT) Mato Grosso. Região Sudeste: (ES) Espírito Santo, (MG) Minas Gerais, (RJ) Rio de Janeiro, (SP) São Paulo. Região Sul: (PR) Paraná, (RS) Rio Grande do Sul, (SC) Santa Catarina.

FIGURA 5. Espécies de insetos da subfamília Triatominae por estado / unidade federativa do Brasil e as seis espécies com maior distribuição geográfica (de Oliveira *et al.*, 2021; Galvão, 2014; Jurberg *et al.*, 2014; Mendes-Sousa *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019). *Panstrongylus geniculatus* de Jurberg *et al.* (2014); Imagens obtidas da Coleção de Triatominae FCFAR - Unesp Araraquara, sendo *P. megistus* (de Oliveira); *Triatoma pseudomaculata* (Pinotti e Ambrozini); *Psammolestes tertius* (de Oliveira); e *T. sordida* (de Paiva *et al.*). *n* = número de estados / unidades federativas.



Diante da quase completa eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans*, Ferreira e Silva (2006) reportaram a preocupação com o cenário epidemiológico peculiar brasileiro, destacando a grande diversidade de espécies de triatomíneos vetores autóctones, sobretudo na região Nordeste, e o risco de domiciliação de espécies antes chamadas secundárias, como *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*, que habitam preferencialmente o peridomicílio. Em recente Boletim Epidemiológico, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2022) salientou que a vigilância entomológica atual deve considerar características biológicas dos vetores e mudanças comportamentais resultantes de influências ambientais, para elaboração de diferentes estratégias de controle. Dois dos pontos de atenção que foram destacados no Boletim são a influência ambiental na distribuição geográfica de algumas espécies e a ocorrência de espécies encontradas colonizando ambientes domiciliares e peridomiciliares. Entre as espécies encontradas em ambientes domiciliares

e peridomiciliares, são sugeridas 13 espécies de maior importância epidemiológica no Brasil, incluindo as espécies de distribuição geográfica mais ampla ou difusa *Panstrongylus megistus*, *P. geniculatus*, *Triatoma pseudomaculata*, *T. infestans*, *T. sordida*, *Rhodnius neglectus* e *R. robustus*; e as espécies com distribuição mais restritas *P. lutzii*, *R. nasutus*, *T. brasiliensis* (região nordeste), *T. vitticeps* (região sudeste), *T. rubrovaria* (região sul) e *T. maculata* (estado de Roraima) (Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2022).

Considerando as características ambientais e climáticas, as ações antropogênicas, a vulnerabilidade socioeconômica histórica de populações majoritariamente localizados nos trópicos e subtropicais, o cenário de prevalência em número de espécies, a dinâmica de domiciliação, o endemismo de transmissão oral de DC na Amazônia, os recentes casos de surtos de DC aguda na região nordeste, deve-se dar a atenção devida às espécies nativas principalmente oriundas dessas regiões. Na região Nordeste do Brasil em especial, um grupo de espécies pertencentes ao complexo de espécies *Triatoma brasiliensis* (complexo *brasiliensis*, ou *Triatoma brasiliensis sensu lato*) servem como vetores primários da DC, cuja espécie *T. brasiliensis* se destaca como principal vetor no semiárido nordestino (Costa *et al.*, 2003, 2013, 2014; Coura e Junqueira, 2012; Gourbière *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2016; Lilio *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2018, 2020; Lima-Neiva *et al.*, 2021).

I.IV. *Triatoma brasiliensis*

Complexo brasiliensis

Triatoma brasiliensis sensu lato (s.l.) compreende um conjunto de espécies cujo empenho em descrevê-lo contou com um grande número de expedições entomológicas devido a sua importância epidemiológica, sendo proposto pela primeira vez na década de 1970 (Lucena, 1970). Considerando as primeiras características diagnósticas do grupo (características morfológicas, de seus padrões cromáticos e da distribuição geográfica), estimou-se que cerca de 2.060 espécimes foram comparados no período entre os anos de 1994 e 2002 (Costa *et al.*, 2013), e toda cronologia de descrições e revalidações de novas espécies, bem como a caracterização atualizada das espécies do complexo, foi minuciosamente abordada por Costa *et al.* (2020). Para tanto, com base em estudos prévios, foram realizadas abordagens multidisciplinares envolvendo análises morfológicas, enzimáticas, moleculares, cariotípicas, ecológicas e de dispersão – inclusive integradas – e um complexo de

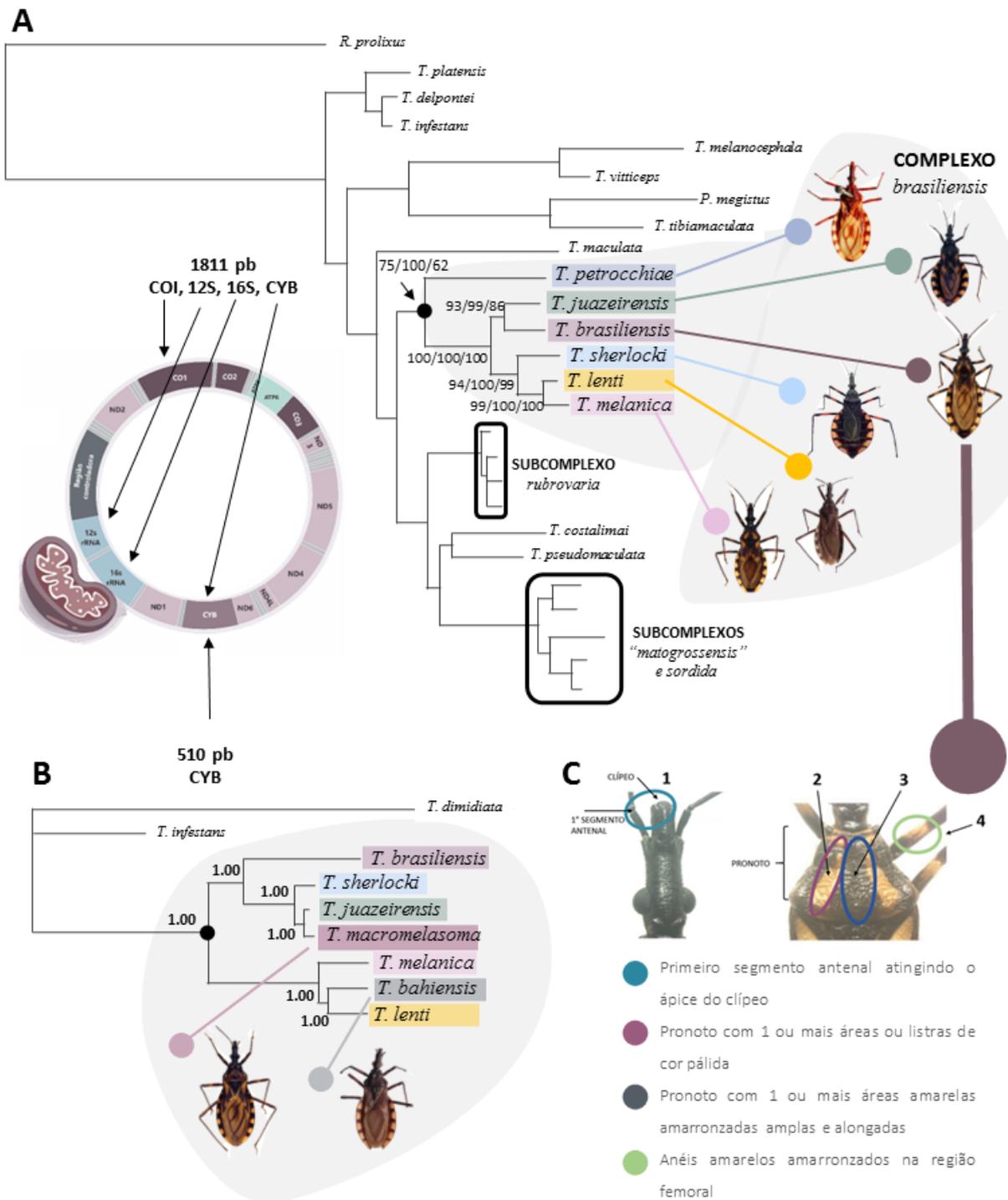
espécies foi de fato estabelecido (Costa *et al.*, 1997a, 1997b, 1998, 2002, 2003, 2009, Costa; Marchon-Silva, 1998; Monteiro *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2009, 2012; Mendonça *et al.*, 2009, 2014, 2016; Alevi *et al.*, 2013, 2015, 2018; Alevi; Rosa; Azeredo-Oliveira, 2014; Oliveira *et al.*, 2017).

Entre diferentes observações taxonômicas, a atual abordagem filogenética do agrupamento das espécies realizado por Oliveira *et al.* (2017) avaliou a estruturação do complexo *brasiliensis* através de análises moleculares de genes mitocondriais (*12S*, *16S*, *MT-COI* e *MT-CYB*), bem como análises de morfometria geométrica (Oliveira *et al.*, 2017). Utilizando análises de Máxima Verossilhança, Bayesiana e Máxima Parcimônia baseadas nos genes mitocondriais, os autores recuperaram consistentemente o grupo incluindo espécies encontradas no bioma Caatinga, *T. petrocchia* Pinto & Barreto, 1925 + *T. juazeirensis* Costa & Felix, 2007 + *T. brasiliensis* Neiva, 1911 + *T. sherlocki* Papa *et al.*, 2002 + *T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967 + *T. melanica* Neiva & Lent, 1941 (Figura 6). As inferências de morfometria de asas e cabeça também corroboraram a estruturação da filogenia.

Desta forma, considerando o volume de dados de distribuição geográfica e ecologia, adicionando as análises integradas de evidências morfológicas, morfométricas, citogenéticas e filogenéticas, os limites do complexo e as espécies que o compõem foram delimitados, geneticamente formando um clado monofilético agrupando as espécies *T. bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. melanica*, *T. petrocchia*, *T. sherlocki*, e as subespécies *T. brasiliensis brasiliensis* e *T. b. macromelasoma* Galvão, 1956. Considerando características morfológicas de indivíduos adultos, Dale *et al.* (2018) elaboraram uma ferramenta de identificação dicotômica ilustrada e atualizada do complexo *brasiliensis* que auxilia a identificação de todos os membros do complexo, baseado na espessura e coloração das listras do pronoto e na coloração das células do hemiélitro.

Considerando dados de distribuição autóctone, o complexo *brasiliensis* inclui indivíduos que se definem por fazer parte de um grupo natural que habita florações rochosas em ambientes silvestres da caatinga e se distribuem toda a região semiárida do Nordeste do Brasil, pelos estados da Bahia (BA), Ceará (CE), Maranhão (MA), Minas Gerais (MG), Paraíba (PB), Pernambuco (PE), Piauí (PI) e Rio Grande do Norte (RN), tendo *T. melanica*, com distribuição também no cerrado de Minas Gerais (Costa *et al.*, 2006, 2013; 2014; 2020; Costa e Félix, 2007; Alevi *et al.*, 2013, 2014, 2018; Mendonça *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017; Dale *et al.*, 2018; Ribeiro-Jr *et al.*, 2021).

Figura 6. A) Adaptação da filogenia atual de Oliveira *et al.* (2017), destacando o complexo *brasiliensis*, sem as espécies *T. bahiensis* e *T. macromelasoma*. A árvore concatenada representa as análises de Máxima Verossilhança (bootstrap), Bayesiana (probabilidade posterior) e Máxima Parcimônia (bootstrap) dos genes mitocondriais *12S*, *16S*, *MT-CYB* e *MT-COI*. Os valores de suporte no nó indicam a linhagem monofilética do complexo. B) Adaptação da filogenia do complexo *brasiliensis* de Mendonça *et al.*, (2016), sem a espécie *T. petrocchiae*. A árvore representa a análise Bayesiana do gene mitocondrial *MT-CYB*. C) Características morfológicas para identificação de *Triatoma brasiliensis* adulto, seguindo Dale *et al.* (2018). Imagens dos triatomíneos retirados de Dale *et al.* (2018 e 2019).



***Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911**

Entre os membros deste complexo de espécies, a subespécie *T. brasiliensis brasiliensis* referida aqui como *T. brasiliensis* para simplificação, é conhecida por apresentar a maior distribuição, ocorrendo nos estados do Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Paraíba e Rio Grande do Norte, todos situados ao norte do rio São Francisco, sendo os dados de ocorrência conhecidos em uma área de aproximadamente $1,6 \times 10^6$ km² dentro da ecorregião denominada “Depressão Sertaneja Setentrional” no bioma Caatinga (Costa *et al.*, 2003, 2014). Essa espécie se destaca como o vetor mais significativo, uma vez que apresenta uma combinação das mais altas taxas de prevalência de *T. cruzi* e distribuição mais ampla em diversas escalas geográficas e ecóticas (Barbosa-Silva *et al.*, 2016; Lilio *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2020; Lima-Neiva *et al.*, 2021; Ribeiro-Jr *et al.*, 2021).

Triatoma brasiliensis é considerada uma espécie ativa que se desloca nos esconderijos naturais, tendo sido largamente observado em ecótopos silvestres, bem como em ecótopos domiciliares e peridomiciliares. Uma vez que ocupa diferentes ecótopos independente das modificações sofridas, *T. brasiliensis* possui hábitos alimentares amplamente variado podendo buscar diferentes recursos em ecótopos naturais e modificados pelo homem (Alencar, 1987; Costa *et al.*, 2014, 2020; Bezerra *et al.*, 2018, 2020; Almeida *et al.*, 2016; Lilio *et al.*, 2017; Lima-Neiva *et al.*, 2021), o que reforça sua alta distribuição, adaptação e capacidade de dispersão, participando do processo de domiciliação já destacado por Ferreira e Silva (2006).

Via de regra, a dispersão dos triatomíneos ocorre majoritariamente de forma ambulante na maior parte seu ciclo de vida, dado que os insetos não possuem asas nos estádios ninfais (Lazzari, 2014), e pode ser modulada pela busca de alimento e reprodução, desencadeadas por status reprodutivo, densidade populacional e condições ambientais. A escassez de alimentação retarda o desenvolvimento das ninfas em adultos, reduz a fecundidade das fêmeas e aumenta a probabilidade de dispersão (Forattini *et al.*, 1979; Dias-Lima e Sherlock, 2000; Guarneri *et al.*, 2000; Carbajal De La Fuente *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2013; Bezerra *et al.*, 2018).

Além dessa modalidade de locomoção, a colonização de novos ambientes pode ocorrer de outras maneiras. Carbajal de la Fuente *et al.* (2007) demonstraram em estudo sobre capacidade de voo de *T. brasiliensis* (e *T. pseudomaculata*), que indivíduos de ambos os sexos advindas de ambientes selvagens podem ser capturadas com armadilhas luminosas e que a colonização de ambientes domiciliares e peridomiciliares pode ocorrer pela atração dos insetos por fontes de luz

artificial, o que facilitaria o estabelecimento de novas colônias domésticas. Guardadas as devidas diferenças comportamentais entre diferentes espécies e contrariando estudos realizados com *T. infestans* que sugeriam que apenas as fêmeas em busca de alimentação possuíam capacidade de voo (Lehane *et al.*, 1992; McEwen e Lehane, 1994).

Já a dispersão passiva pode ser a chave para a manutenção do ciclo de *T. cruzi* em ambientes modificados, considerando a circulação de mamíferos potenciais reservatórios, uma vez que os hábitos de vida fazem com que *T. brasiliensis* possua estreita associação com seus hospedeiros já que existem relatos de colônias associadas a várias espécies de morcegos, marsupiais, roedores e aves em ambiente silvestre (Alencar, 1987; Groom *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2018; Oca-Aguilar *et al.*, 2022). Outros estudos sobre a dispersão do *T. brasiliensis* consideraram taxas de infestação e colonização, sem descrever os mecanismos de dispersão (Sarquis *et al.*, 2010, 2011; Costa *et al.*, 2014; Bezerra *et al.*, 2018). Também é considerada a hipótese de ocorrer casos de transporte em uma interação interespecífico através da aderência de ovos e ninfas a estruturas do corpo dos hospedeiros ou outras estruturas, como o relato de transporte passivo marítimo da mundialmente relatada espécie *T. rubrofasciata* (Forattini *et al.*, 1979; Guarneri *et al.*, 2000; Gurgel-Gonçalves e Cuba, 2009; Galvão e Gurgel-Gonçalves, 2014; Roque e Jansen, 2014; Bezerra *et al.*, 2018).

Independente da modalidade de locomoção, se faz necessário compreender a dispersão e colonização de novos ambientes pelo *T. brasiliensis*, pois a infestação doméstica e a consequente sobreposição dos ciclos de transmissão de *T. cruzi* são os principais fatores de risco para infecções humanas. Populações densas de *T. brasiliensis* foram relatadas em ambiente de peridomicílio com alta prevalência de infecção por *T. cruzi*, incluindo exemplares coletados no intradomicílio em Caicó e Currais Novos (RN) e Cajazeiras e Patos (PB) (Lilioso *et al.*, 2017).

A capacidade de domiciliação de *T. brasiliensis* pôde ser inferida na prática quando observado fluxo gênico entre indivíduos coletados em ambiente silvestre e ambiente domiciliar através de sequenciamento de DNA. Utilizando microssatélites combinados com o gene mitocondrial *Citocromo b* (MT-CYB), Almeida *et al.*, (2008, 2016) documentaram fluxo gênico entre populações selvagens e domiciliares de *T. brasiliensis* nos municípios de Lagoa Tapada (PB) e Caicó (RN), este último justamente na localidade de descrição original da espécie. Os resultados sugeriram que *T. brasiliensis* apresenta estrutura genética em uma pequena escala geográfica, indicando um certo nível de diferenciação entre populações ecotípicas de habitats antrópicos, e apontaram um cenário preocupante sob o ponto de vista epidemiológico, uma vez que tais populações silvestres representam

focos perenes de reinfestação e apresentaram altos índices (acima de 52%) de infecção natural por *T. cruzi*. Considerando que os focos silvestres representam focos perenes de reinfestação de difícil acesso, a observação dessa condição genética pode indicar possíveis altos índices de infecção natural por *T. cruzi*. Esses pesquisadores utilizaram análises de microssatélites (cinco *loci*) e revelaram uma estrutura genética fraca ao longo do tempo e em diferentes ecótopos entre todas as populações analisadas na área do estudo. Bezerra *et al.* (2020), recentemente, avaliaram a dinâmica de infestação e reinfestação por *T. brasiliensis* ao longo do tempo em um estudo realizado no município de Tauá (CE), focando em uma escala microgeográfica. Utilizando microssatélites, os autores apontaram para panmixia com base em baixos valores de diferenciação genética (F_{ST}) par-a-par, indicando fluxo gênico irrestrito. Ainda, Monsalve-Lara *et al.* (2021) propuseram que *T. brasiliensis* desempenhou um papel crucial no surto de DC ocorrido no município de Marcelino Vieira (RN), cuja via de transmissão se confirmou como ingestão de alimento contaminado (Vargas *et al.*, 2018).

No nordeste brasileiro, espécies do complexo *T. brasiliensis* já se apresentaram como politípicas (Costa *et al.* 2016) e para tanto as análises do padrão de distribuição genética das espécies visam entender a dinâmica da dispersão populacional em escala microgeográfica em locais e ambientes variados. A correta identificação dos vetores, conhecimento da sua biologia e dos perfis genéticos, suas relações populacionais e da intensidade da migração populacional de *T. brasiliensis* são essenciais para estudos epidemiológicos e para elaboração de políticas de prevenção (Figura 7; Magori e Drake, 2013; Cator *et al.*, 2020). Compreender a dinâmica de expansão e dispersão populacional, como os processos de infestação e reinfestação de espécies de triatomíneos de difícil controle, é crucial para projetar e desenvolver estratégias racionais e eficientes de vigilância e controle vetorial. Existem questões-chave a serem respondidas com marcadores moleculares que são importantes para melhorar as medidas de controle de vetores (Figura 8). Então, os insetos que infestam ambientes peridomiciliares representam populações domésticas recrudescentes ou são compostos por colonizadores selvagens? Esses invasores vêm de populações peridomiciliares adjacentes altamente adaptadas a ambientes antrópicos ou as populações silvestres também são capazes de infestar ambientes artificiais?

Figura 7. Características que tornam de *T. brasiliensis* o vetor mais significativo de *T. cruzi* e da DC na região nordeste, uma vez que apresenta uma combinação de capacidade de infestação e domiciliação; distribuição mais ampla em diversas escalas geográficas e ecotípicas entre as espécies do complexo; variedade de fonte alimentar; altas taxas de prevalência de infecção natural por *T. cruzi* e fluxo gênico irrestrito entre populações de diferentes ecótopos (Gourbière *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2014; Bezerra *et al.*, 2020; Kamimura *et al.*, 2020; Valença-Barbosa *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2016, 2024).

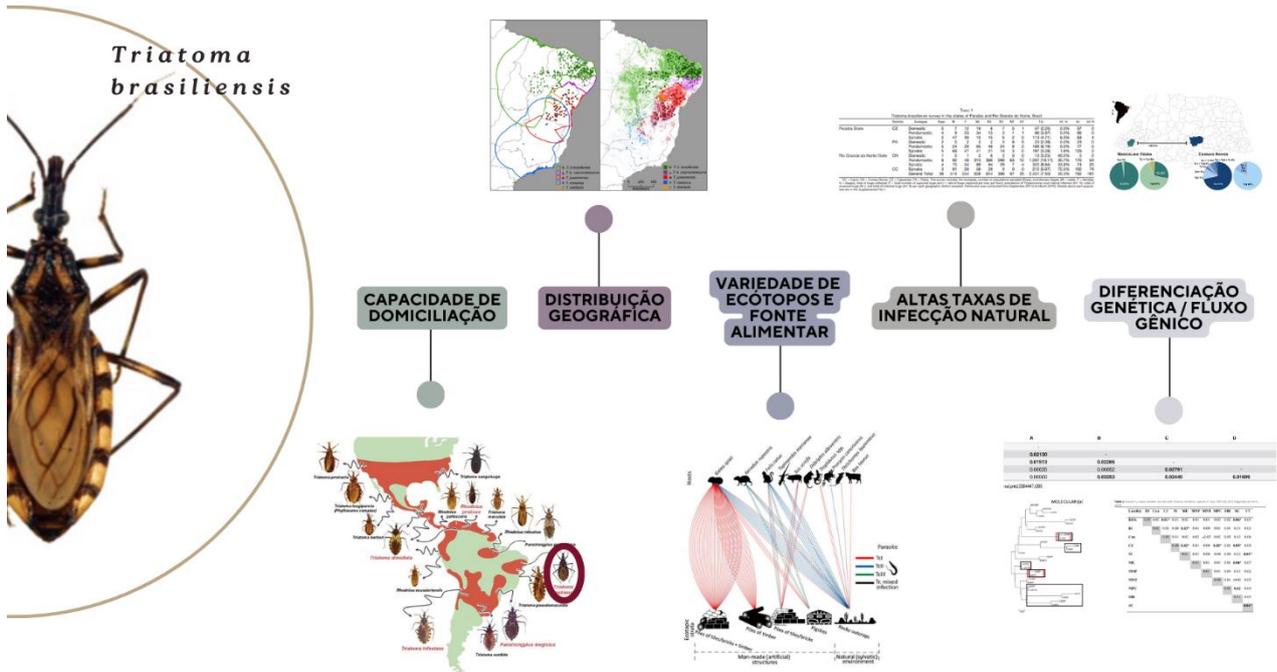
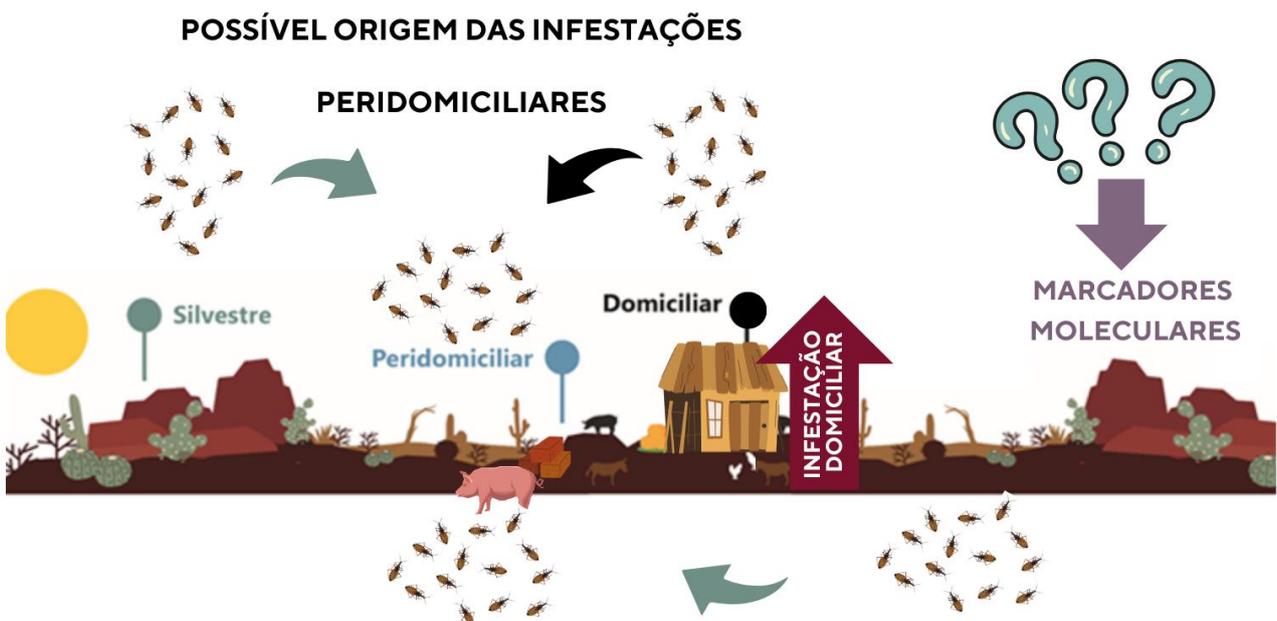


Figura 8. Possíveis fontes das infestações em ambiente peridomiciliar, considerando populações domésticas atenuadas, colonizadores selvagens e populações peridomiciliares adjacentes altamente adaptadas a ambientes antrópicos.



I.VI. Marcadores moleculares

As respostas a essas questões podem ser dadas avaliando marcadores moleculares, que são regiões do DNA que contêm polimorfismos herdáveis e nos permitem responder perguntas nos campos de taxonomia molecular, forenses, de estudos evolutivos, avaliar a variabilidade genética, rastrear movimentos individuais e populacionais, traçar padrões de dispersão histórica, estimar índices de endogamia, de fluxo gênico, distinguir espécies em amostras mistas, caracterizar novas espécies, delimitar grupos, entre outros (Kirk e Freeland, 2011). Para determinar os correlatos ecológicos de aptidão dentro das populações e para determinar a extensão da divergência entre as populações, muitas vezes é necessário ter acesso a marcadores genéticos segregados de forma independente que não influenciam o fenótipo do organismo (Davey *et al.*, 2011).

Assim, análises de genes mitocondriais (de linhagem matrilinear), com taxa de evolução relativamente alta, permitem a realização de inferências acerca da dinâmica de processos de dispersão, sendo indicadores de fluxo gênico e efeitos fundadores (Moritz *et al.*, 1987; Davey *et al.*, 2011). Enquanto o sequenciamento em larga escala nos permite desvendar grande parte do genoma através da análise de centenas ou milhares de nucleotídeos de polimorfismo único (SNPs) que fornecem informações sobre milhares de *loci* simultaneamente, atingindo uma ampla variação do genoma (Allendorf, 2017). Utilizando técnicas atuais, é possível realizar o sequenciamento de organismos modelo que possuem sequências de genoma de referência de alta qualidade e espécies não modelo, sem dados de referência (Davey *et al.*, 2011).

Genoma mitocondrial e o Citocromo b (MT-CYB)

Amplamente conhecida por seu papel na fosforilação oxidativa e produção de ATP (trifosfato de adenosina), a mitocôndria desempenha um papel fundamental no metabolismo celular dos eucariotos. A organela possui seu próprio DNA disposto em um conjunto de genes em formato circular, conhecido como mitogenoma, que é herdado da linhagem materna (Anderson *et al.*, 1981; Avise, 1986; Brand, 1997; Boore, 1999). Nos animais em geral, o mitogenoma possui tamanho médio de 18 kilobases (kb), apresentando 37 genes dispostos em diferente ordem para diferentes táxons, dos quais 13 são codificantes de proteínas, 22 tRNA e dois rRNA (Anderson *et al.*, 1981; Boore, 1999; Ladoukakis e Zouros, 2017). Há ainda uma região controladora não codificante, cuja variação de

tamanho dos mitogenomas animais pode ser atribuída principalmente às suas repetições in tandem com tamanhos notavelmente maiores e maior número de cópias (Anderson *et al.*, 1981; Moritz *et al.*, 1987; Zhang e Hewitt, 1997). O mitogenoma de triatomíneo anotado mais correlato, é o de *Triatoma dimidiata* (AF301594.1; Dotson e Beard, 2001) apresentando 17.019 pares de base (pb).

Análises de genes mitocondriais codificadores de proteínas são historicamente e constantemente utilizadas para diversos fins e em diferentes grupos taxonômicos, desde a identificação molecular em análises forenses considerando a viabilidade das múltiplas cópias do genoma mitocondrial por célula, quando comparado ao DNA nuclear (Wiesner *et al.*, 1992; Wai *et al.*, 2010; Ladoukakis e Zouros, 2017; Castellani *et al.*, 2020; Syndercombe Court, 2021); até inferências biogeográficas, filogenéticas, de estruturação populacional baseadas em fluxo gênico (Wilson *et al.*, 1985; Avise, 1986; Moritz *et al.*, 1987; Boore, 1999). Algumas das vantagens dessa abordagem são características como tamanho relativamente pequeno, herança matrilinear, ausência de recombinação, arranjos intraespecíficos conservados e alta taxa de divergência entre espécies, sendo rotineiramente analisados separadamente ou em conjunto (Ladoukakis e Zouros, 2017). Apesar da rápida taxa de evolução mitocondrial, os arranjos permanecem estáveis dentro dos grupos principais, porém distintos quando comparados a outros grupos, o que permite identificar indivíduos, seus diferentes graus de parentesco e relações evolutivas (Boore, 1999).

O gene *MT-CYB* é constantemente utilizado em análises de relações entre grupos de vertebrados em diversos níveis hierárquicos; já nos insetos, as abordagens moleculares usualmente envolvem os genes *Citocromo c oxidase* subunidades 1 e 2 (*MT-COI* e *MT-CO2*) (Simmons e Weller, 2001). A fim de aferir a resolução filogenética do *MT-CYB* em comparação ao *MT-COI* e a uma região do gene *28S* nuclear (ribossomal), Simmons e Weller (2001) avaliaram as taxas de divergências das sequências de nucleotídeos e aminoácidos da classe Insecta e concluíram que as três regiões fornecem resoluções filogenéticas, com o *MT-CYB* suportando as linhagens em geral porém com maior número de substituições nos táxons terminais. Dessa forma, a informação de variabilidade limitada espécie-específica fornecida pelo *MT-CYB* é de grande valor em abordagens intraespecíficas e populacionais (Parson *et al.*, 2000; Simmons e Weller, 2001; De Pancorbo *et al.*, 2004). Para fins de entendimento, a nomenclatura (*Citocromo b; mitochondrially encoded cytochrome b*) e a abreviação do gene aqui utilizadas (*MT-CYB*) são recomendadas pelo Comitê de Nomenclatura Gênica Mundial (Eyre, 2006; HGNC Database, 2009).

Genotipagem de Polimorfismos em Nucleotídeos Únicos por Sequenciamento (GBS)

A genotipagem de SNPs através do sequenciamento de nova geração, produz uma representação reduzida do genoma, gerando uma grande quantidade de informação em um número maior de *loci* de forma simultânea e precisa, além de seu baixo custo considerando o volume de dados produzido (Baird *et al.*, 2008; Poland *et al.*, 2012; Illumina, 2021, 2022). Ao contrário do marcador mitocondrial, os SNPs são de natureza codominante (dois alelos herdados dos pais para cada *locus*) e com o advento do sequenciamento de nova geração, os SNPs tornaram-se o marcador de escolha em genética populacional.

Utilizando o sequenciamento de SNPs, Justi *et al.* (2018) conduziram a primeira filogenia baseada em dados de todo o genoma (Genotipagem por sequenciamento; GBS) do complexo dimidiata, o principal grupo de triatomíneos envolvido na transmissão da DC na América Central e vetor secundário no México e no norte da América do Sul. O GBS tem como alvo os sítios de restrição flanqueadores da sequência genômica, onde as extremidades coesivas geradas pelas enzimas de restrição selecionadas correspondem a regiões de adaptadores. Para compreender os limites genéticos de populações e espécies, indicando taxas de migração e cruzamentos em subpopulações geneticamente diferentes, os autores avaliaram SNPs e recuperaram resultados robustos e de forma mais precisa do que as abordagens utilizando genes mitocondriais e o gene nuclear ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*), tendo como resultado o conhecimento dos limites do complexo dimidiata.

Apesar dos avanços na compreensão da estrutura genética de *T. brasiliensis* utilizando marcadores combinados como MT-CYB e microssatélites, vale ressaltar a resolução é limitada (Allendorf, 2017) quando empregados em áreas geográficas de tamanho reduzido devido à sua dependência de menos de oito *loci*, como demonstrado por Almeida *et al.* (2016) e Bezerra *et al.* (2020). Portanto, o sequenciamento de genótipos é o método preferido para estudar o fluxo gênico em vetores e aprimorar nossa compreensão da fonte da infestação através de abordagens com capacidade de analisar simultaneamente um volume massivo dados, com aplicações valiosas na avaliação do fluxo gênico, como já realizado para mosquitos (Neafsey *et al.*, 2010; Campos *et al.*, 2017), carrapatos (Van Zee *et al.*, 2015), flebotomíneos (Pathirage *et al.*, 2021), triatomíneos (Hernandez-Castro *et al.*, 2017), entre outros (Magori e Drake, 2013; Cator *et al.*, 2020).

II. JUSTIFICATIVA

A pesquisa em estudos populacionais de triatomíneos vetores da doença de Chagas se faz necessária para entender a dispersão e colonização, já que a infestação domiciliar e a consequente sobreposição dos ciclos de transmissão são os principais fatores de risco para a infecção humana por *T. cruzi*. A correta identificação dos principais vetores, seus perfis genéticos e a medida da intensidade de migrações populacionais em regiões susceptíveis como o semiárido nordestino, são essenciais para estudos epidemiológicos e para elaboração de políticas de prevenção e controle, pois podem trazer luz aos processos de dispersão e isolamento de grupos em diferentes ambientes baseado em informações de evento microevolutivos ou de fluxo gênico.

III. OBJETIVOS

III.I. Objetivo geral

Avaliar os padrões de distribuição da variação genética com dois marcadores moleculares (polimorfismos de nucleotídeo único-SNPs e um fragmento do MT-*CYB*) em populações de *Triatoma brasiliensis* provenientes de diferentes ecótopos e sítios geográficos do município de Currais Novos (RN), visando a obtenção de informações sobre os processos de infestação domiciliar.

III.II. Objetivos específicos

- Avaliar as relações evolutivas entre os haplótipos do MT-*CYB* de *T. brasiliensis*, buscando a compreensão da variação populacional-ecotípica;
- Analisar a dinâmica das populações biológicas de *T. brasiliensis* através de inferências de fluxo gênico;
- Identificar os diferentes perfis genéticos baseado em análises de diversidade de SNPs neutros;
- Confrontar o papel das forças geográficas e ecotípicas na distribuição da variação genética;
- Obter informações para aprimorar as estratégias da borrifação (peri)intradomiciliar com inseticidas baseado na identificação dos focos de infestação domiciliar por *T. brasiliensis*.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas neste estudo foram previamente coletadas em regiões do município de Currais Novos (RN, nordeste do Brasil; Figura 9), sendo provenientes da colaboração de uma rede de pesquisadores e monitores de campo, estabelecida com integrantes da Universidade Federal da Paraíba (Licença permanente para coleta de material zoológico concedida a Dra. Elaine Folly Ramos – Sisbio/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio 32579-1; ANEXO D). A manipulação e utilização das amostras foi realizada sob cadastro de acesso ao patrimônio genético (SISGEN) de número AF53F3B (ANEXO E).

Após suspeitas de ocorrência de surtos de DC aguda em municípios do RN no ano de 2015, os registros de atendimentos médicos e entrevistas com residentes apontaram para transmissão por via oral, de acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (ANEXO F; Vargas *et al.*, 2018). Considerando a potencial infestação e o subsequente surto da doença da região, foram realizadas expedições de coleta para fins de levantamento entomológico através de busca ativa e posteriores exames parasitológicos nas fezes de triatomíneos no município de Currais Novos entre os anos de 2014 e 2015. Os relatos indicaram altas taxas de infestação de triatomíneos em ambiente de domicílio e peridomicílio, bem como alta prevalência de infecção natural por *T. cruzi* (Lilioso *et al.*, 2017). Todos os insetos aqui utilizados foram devidamente fixados em etanol absoluto, armazenados na coleção entomológica do pesquisador responsável pelo projeto e se encontravam disponíveis para futuras análises moleculares. Embora a metodologia detalhada da coleta esteja descrita em Lilioso *et al.* (2017), abordaremos ligeiramente a área de coleta e a amostragem para fins de contextualização do estudo.

IV.I. Área de estudo e pontos de amostragem

Localizado a 06°15'39,6" de latitude sul e 36°30'54,0" de longitude oeste, com 864,349 km² de extensão territorial, Currais Novos está inserido no bioma Caatinga, no semiárido nordestino, mesorregião Central Potiguar, microrregião Seridó Oriental (DNPM - Departamento Nacional da

Produção Mineral, 1981; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2021; Nascimento e Ferreira, 2012). A cobertura vegetal típica é de Savana Estépica, com abundância de cactáceas, plantas de porte reduzido difusas, arbustos e árvores baixas. Com temperaturas superiores a 18°C em todos os meses do ano, oito meses secos e curta estação chuvosa de fevereiro a maio, Currais Novos se encontra susceptível à desertificação na categoria “muito grave”, baseado na degradação da vegetação causada por variações climáticas e ações antrópicas, de acordo com o Plano Nacional de Combate à Desertificação (PNCD) (Diniz e Pereira, 2015; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2021; Serviço Geológico do Brasil - CPRM, 2005).

A amostragem foi realizada em escala microgeográfica (~15 km) na zona rural do município, cujos pontos de coleta ativa dos triatomíneos foram definidos com base em registros das Secretarias de Saúde do estado, incluindo áreas recém tratadas com inseticidas. Os ecótopos foram identificados intuitivamente como ambientes distintos de acordo com suas características (Figura 8), considerando ambientes naturais (silvestre), ambientes artificiais (domiciliar) e ambiente de transição (peridomiciliar) (Costa *et al.*, 2003; Sarquis *et al.*, 2006). O ecótopo silvestre foi definido de acordo com os afloramentos rochosos e com a vegetação típica de Savana Estépica (Figura 10A e 10B). O ecótopo domiciliar foi definido de acordo com os vilarejos e habitações, sendo considerada a infestação domiciliar ao observar a presença de ovos e ninfas, além de insetos adultos (Figura 8C e 10D1-D3). Para cada ponto de amostragem domiciliar foi procurado o ponto silvestre mais próximo, partindo do pressuposto de possivelmente se tratar do foco de reinfestação após o tratamento domiciliar com inseticidas (Costa e Lorenzo, 2009). Já o ambiente de peridomicílio, alvo de estudos específicos em epidemiologia da doença de Chagas na região nordeste do Brasil por conta da capacidade de domiciliação dos vetores (Sarquis *et al.*, 2006), foi considerado a área situada em até 100 metros de distância das habitações, com circulação de animais domesticados (Figura 10E e 10F). Galinheiros, currais, poleiros, pilhas de telhas, tijolos e madeira foram considerados pontos situados no peridomicílio.

Foram selecionados 14 pontos de amostragem em Currais Novos, sendo dois pontos domiciliares, oito pontos peridomiciliares e quatro pontos silvestres (Tabela 2; Figuras 9 e 10). Além da amostragem de Currais Novos, incluímos em nossas análises insetos disponíveis na coleção oriundos do município de Cajazeiras (PB), localizado a cerca de 220 km de distância, para fins de comparações no desenvolvimento do projeto como grupo externo das análises moleculares. A rastreabilidade das amostras foi garantida através do registro dos indivíduos por um sistema

alfanumérico contendo em seu prefixo duas consoantes referentes à sigla do município (CN = Currais Novos; CZ = Cajazeiras), seguidos dos números do ponto de amostragem, e o sufixo referindo-se ao ecótopo (D = domiciliar, P = peridomiciliar, S = silvestre), além de uma numeração sequencial para identificação individual.

Figura 9. Área de coleta: (A) Mapa do Brasil, destacando o estado do Rio Grande do Norte e o município de Currais Novos. (B) Imagem de satélite indicando os limites de Currais Novos (linha vermelha) e o transecto com os pontos de amostragem. (C) Imagem de satélite indicando os pontos com suas cores atribuídas na imagem (D). (D) Esquema mostrando as características dos diferentes ecótipos e as cores utilizadas para defini-los.



Figura 10. Características dos ecótopos dos diferentes pontos de amostragem. (A) e (B) Ecótopo silvestre, indicando afloramentos rochosos com a vegetação típica de Savana Estépica; Imagens cedidas por Carlos Eduardo Almeida. (C) Ecótopo domiciliar, indicando a busca de insetos no interior de um domicílio, verificando prováveis esconderijos; Imagem de Elias Seixas Loroza, retirada de Jurberg *et al.* (2014). (D1) Exemplo de triatomíneo adulto e ninfas colonizando um ambiente domiciliar, (D2) ovos eclodidos de triatomíneos e (D3) ninfa cujo repasto foi recém realizado; Imagem retirado de Santos *et al.* (2017). (E) Ecótopo peridomiciliar indicando busca ativa em pilhas de tijolos e (F) região ao redor de um domicílio; Imagens de Elias Seixas Loroza e Silvia Andrade Justi, retiradas de Jurberg *et al.* (2014).



Definição de demes e populações

Baseado em recentes análises mitocondriais e de microssatélites (Almeida *et al.*, 2016; Bezerra *et al.*, 2020) que detectaram fluxo gênico irrestrito entre espécimes de ecótopos silvestres e peridomiciliares/domiciliares realizadas nos estados do RN e CE, os agrupamentos de amostras coletadas na mesma geocoordenada e ecótopo (pontos de amostragem identificados por suas siglas descrito no item anterior) foram definidos biologicamente como demes, considerando o modelo de ilhas (Wright, 1931). Simplificadamente, esse modelo pressupõe fluxo gênico de maneira randômica e com iguais probabilidades de acasalamento e migração entre os indivíduos de ambos os sexos, com número constante de fêmeas e machos destes grupos distintos. Por sua vez, as populações biológicas serão definidas como o conjunto de demes – ou demes exclusivos – posteriormente verificados por índices de variância genética.

IV.II. Seleção de amostras

Entre os cerca 1600 insetos capturados na expedição de Currais Novos, selecionamos para este estudo indivíduos previamente identificados como da subespécie *T. brasiliensis*, observando características morfológicas externas dos insetos machos e fêmeas adultos seguindo as chaves dicotômicas do Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Jurberg *et al.*, 2014). Também foram observadas ninfas de diferentes estádios de desenvolvimento (N1 a N5), que não foram consideradas para o estudo uma vez que identificação morfológica contempla indivíduos adultos com desenvolvimento completo e presença das asas, cujo tamanho e a coloração das células do hemiélitro fazem parte dos conjunto de caracteres diagnóstico.

Uma vez que os limites do complexo *brasiliensis* foram recentemente estabelecidos (Oliveira *et al.*, 2017; Dale *et al.*, 2018), confirmamos a identificação morfológica utilizando a chave pictográfica atualizada de Dale *et al.* (2018) para assim prosseguir com as análises moleculares de indivíduos que apresentavam o morfotipo *T. b. brasiliensis* (Figura 11). Após o isolamento de DNA, selecionamos as amostras que apresentaram melhores concentração e integridade para identificação através de taxonomia alfa, baseada em informações comparativas do marcador mitocondrial selecionado em bancos de dados e genotipagem de nucleotídeos de polimorfismo único para abordagens populacionais, com pareamento das amostras quando possível.

IV.III. Isolamento de DNA

Para realização de abordagens moleculares, isolamos o DNA dos triatomíneos adultos a partir das pernas dos insetos preservados em etanol absoluto. Para tanto, dispusemos o tecido em tubos de microcentrifuga e utilizamos nitrogênio líquido para uma maceração com maior sucesso. Em seguida, adicionamos a cada microtubotubo o volume determinado do tampão de lise de tecidos e proteinase K do conjunto de reagentes DNeasy Qiagen®. Todo conteúdo dos microtubos foi disposto em colunas contendo membranas filtradoras acopladas a tubos coletores, intercalando etapas de ligação, lavagem e eluição, utilizando os tampões indicados e a centrifugação adequada, seguindo as especificações do fabricante. Ainda, realizamos tratamento com RNase New England Biolabs para garantir a pureza do DNA isolado.

A qualidade do DNA foi testada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão NaOH 1x (a partir de solução estoque NaOH 20x; NaOH 8 g, ácido bórico 55 g, H₂O deionizada q.s.p 1000 ml). A preparação do gel foi realizada após pesagem da agarose, diluição em tampão utilizando um Erlenmeyer sob aquecimento, e disposição em formas fixadas em suportes, para solidificação. Para aplicação das amostras nos poços do gel, cada uma foi individualmente misturada ao corante (azul de bromofenol e glicerol) e ao reagente intercalante de base (GelRed) para reagir à luz ultravioleta. Em seguida, as amostras foram submetidas a um campo elétrico em uma cuba contendo a mesma solução tampão, a fim de observar o padrão de migração, sendo a polaridade do DNA negativo, migrando para o lado positivo. Ao final da corrida, o gel foi observado em transiluminador de luz Ultravioleta (UV) e fotodocumentado. Após a confirmação da integridade do DNA, as amostras foram quantificadas no fluorômetro Qubit® Fluorometer ThermoFisher Scientific, utilizando o conjunto de reagentes de fluorescência 1X dsDNA HS (HighSensitivity) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 2. Pontos de amostragem em Currais Novos (CN) e Cajazeiras (CZ), indicando cada deme/ponto de coleta, os ecótopos amostrados, as localidades e geocoordenadas, bem como o número amostral de indivíduos em estádios ninfais (EN) e adultos (AD) disponíveis para sequenciamento. BR = Brasil; RN = estado do Rio Grande do Norte; PB = estado da Paraíba.

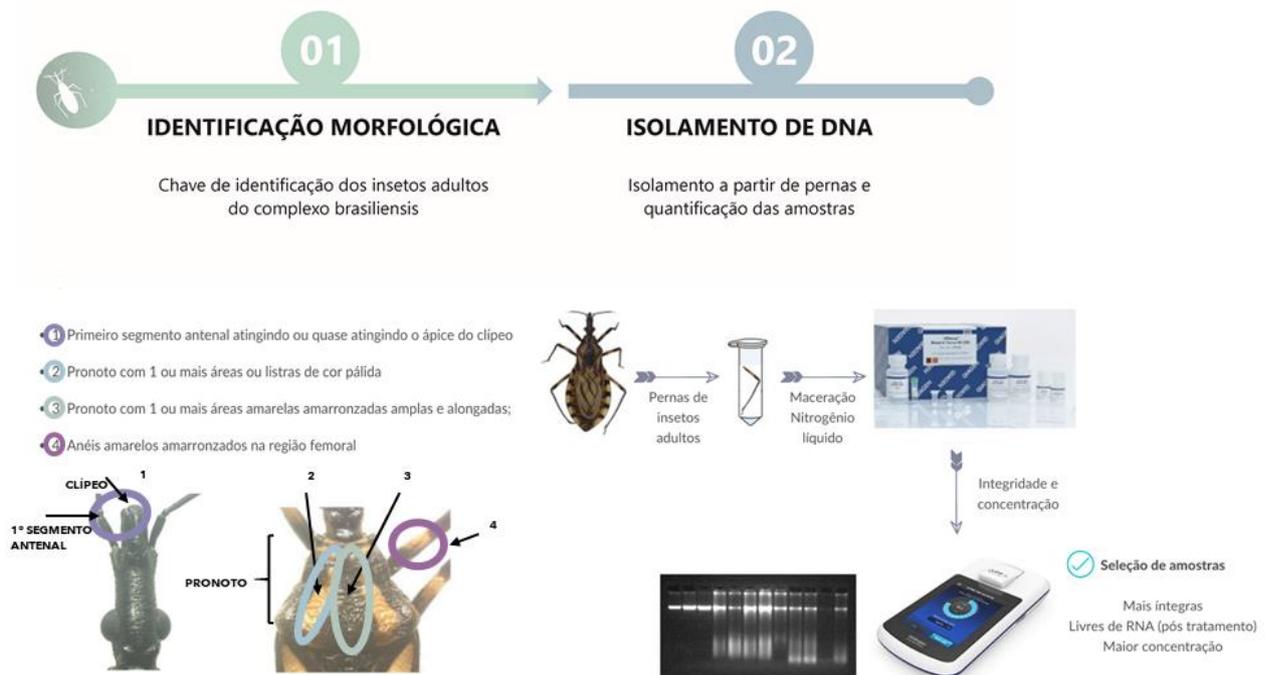
ECÓTOPO	DEME	LOCALIDADES	GEOCOORDENADAS	EN	AD
Domiciliar	CN75D	Fazenda Cacimba da Pedra, Currais Novos, RN, BR	6°14' 13.9", 36° 30' 44.8"	13	1
	CN85D	Sítio Areias de Baixo, Currais Novos, RN, BR	6°16' 46.7", 36° 29' 03.5"		1
Total de ninfas e adultos no ecótopo domiciliar				13	2
Total global de amostras no ecótopo domiciliar				15	
Peridomiciliar	CN69P	Fazenda Barra da Areia, Currais Novos, RN, BR	6°13' 58.6", 36° 30' 37.1"	458	61
	CN71P	Sítio Malhada, Currais Novos, RN, BR	6°09' 05.7", 36° 31' 14.2"	47	5
	CN73P	Furna da Onça, Currais Novos, RN, BR	6°10' 36.9", 36° 31' 15.4"	2	2
	CN74P	Sítio Cacimba da Pedra, Currais Novos, RN, BR	6°13' 27.0", 36° 31' 09.8"	1	15
	CN76P	Sítio Morada do Mocó, Currais Novos, RN, BR	6°14' 47.4", 36° 30' 52.4"	77	17
	CN81P	Sítio Malhada, Currais Novos, RN, BR	6°08' 49.3", 36° 30' 39.6"	91	5
	CN84P	Fazenda Barra da Areia, Currais Novos, RN, BR	6°14' 13.6", 36° 30' 31.3"	7	4
	CN86P	Sítio Areias de Baixo, Currais Novos, RN, BR	6°17' 01.9", 36° 29' 11.9"	418	45
Total de ninfas e adultos no ecótopo peridomiciliar				1101	154
Total global de amostras no ecótopo peridomiciliar				1255	
Silvestre	CN72S	Furna da Onça, Currais Novos, RN, BR	6°10' 33.0", 36° 31' 16.9"	40	5
	CN77S	Sítio Morada do Mocó, Currais Novos, RN, BR	6°14' 47.1", 36° 30' 48.6"	16	7
	CN83S	Sítio Barra da Areia, Currais Novos, RN, BR	6°14' 14.9", 36° 30' 27.9"	147	73
	CN87S	Bairro Paizinho Maria, Currais Novos, RN, BR	6°15' 17.2", 36° 29' 40.4"	44	14
Total de ninfas e adultos no ecótopo silvestre				247	99
Total global de amostras no ecótopo silvestre				346	
Peridomiciliar	CZ19P	Lagoa do Bé, Cajazeiras, PB, BR	6°49' 25.3", 38° 25' 18.0"	4	5
Total de ninfas e adultos no ecótopo peridomiciliar				4	5
Total global de amostras no ecótopo peridomiciliar				9	
Total global de ninfas e adultos				1365	260
NÚMERO AMOSTRAL TOTAL				1625	

(*) Grupo externo de amostragem.

Limitações da seleção de amostras e possível viés do estudo

O maior obstáculo encontrado para execução da parte técnica foi em relação à seleção de amostras. Os pontos de coleta não foram amostrados uniformemente pelas seguintes razões: i) Sucesso na coleta ativa de indivíduos adultos; ii) Baixa integridade e/ou concentração devida à degradação do material, possivelmente por dificuldades do armazenamento devido durante o trabalho de campo. Por essas razões, alguns pontos de coleta apresentaram diferenças amostrais, chegando a apresentar apenas um indivíduo no ponto, o que levou a exclusão de algumas análises por não se caracterizarem como uma população biologicamente viável.

Figura 11. Fluxograma da seleção das amostras para análises populacionais, onde o passo 01) indica a identificação morfológica de indivíduos adultos observando os caracteres diagnóstico da chave pictográfica atualizada de Dale *et al.* (2018); enquanto o passo 02) indica o isolamento de DNA a partir das pernas dos insetos, utilizando conjunto de reagentes DNeasy Qiagen® e posterior verificação da qualidade das amostras. Imagem do *Triatoma brasiliensis* retirada de Costa *et al.* (2013); Imagens do conjunto de reagentes e do fluorômetro retirados das páginas dos fabricantes.



IV.IV. Amplificação do gene mitocondrial *Citocromo b* e purificação dos produtos

O gene mitocondrial MT-CYB foi escolhido como um dos marcadores moleculares para realização de inferências de taxonomia alfa e abordagens populacionais, levando em consideração as informações disponíveis em bancos de dados online. A amplificação da região alvo através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando os iniciadores descritos na literatura; iniciador senso CYTB7432F 5'-GGACGWGGWATTTATTATGGATC-3' (Monteiro *et al.*, 2003) e iniciador antissenso CYTBR 5'-ATTACTCCTCCTAGCTTATTAGGAATTG-3' (Lyman *et al.*, 1999), gerando um fragmento de cerca de 580 pb (Figura 12). As reações foram realizadas para um volume final de 25 µL, utilizando uma mistura de reagentes contendo Tampão 10x, MgCl₂ 50 mM, 1 U enzima Taq polimerase, dNTP 25 mM, o par de iniciadores 10pmol, DNA ~30 ng e H₂O estéril com volume variando de acordo com o volume/massa de DNA. O perfil da reação foi de desnaturação inicial da dupla fita a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 7 minutos; e incubação a 8°C, modificando o protocolo de Lyman *et al.* (1999). Para cada etapa de PCR realizada, utilizamos um controle negativo (sem DNA), a fim de descartar a contaminação do processo.

O sucesso da PCR foi verificado através de eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão NaOH 1x, seguindo o mesmo protocolo utilizando no isolamento do DNA, adicionando o padrão de peso molecular para confirmação do tamanho dos fragmentos, através da comparação. Após observar o funcionamento da PCR e o padrão de migração das amostras, os produtos foram purificados utilizando o conjunto de reagentes GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Brazil) de acordo com o fabricante ou seguindo o protocolo de precipitação com PEG 20% (Polietileno Glicol 6000, NaCl 5M, H₂O deionizada), de acordo com as especificações dispostas na apostila do Curso de Diagnóstico Molecular e Aconselhamento Genético no Câncer Hereditário do I Curso de Verão em Oncologia Experimental (2010) do Instituto Nacional de Câncer (ANEXO G), onde as etapas pós PCR foram realizadas. A purificação foi observada em eletroforese de gel de agarose 1% em tampão NaOH 1x, o gel foi observado em transiluminador de luz UV e fotodocumentado.

IV.V. Sequenciamento de Sanger, análises moleculares e populacionais

Sequenciamento de Sanger

As etapas de sequenciamento convencional foram realizadas nas dependências do Programa de Genética e Virologia Tumoral do Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde, seguindo as condições da Plataforma Genômica do departamento (ANEXO H), tendo como referência o sequenciamento tradicional através do método enzimático de Sanger (Heather e Chain, 2016). Este tradicional método de sequenciamento de uma região específica do DNA molde, envolve etapas de inserção de nucleotídeos sintéticos sem o grupo hidroxila 3' necessário para a extensão de uma cadeia de DNA (didesoxinucleotídeos; ddNTP), marcados com fluoróforos através de técnicas de PCR e eletroforese capilar em gel de poliacrilamida que separa os fragmentos de DNA. As fitas senso e antissenso são sequenciadas separadamente utilizando os iniciadores que anelam em regiões adjacentes à região alvo.

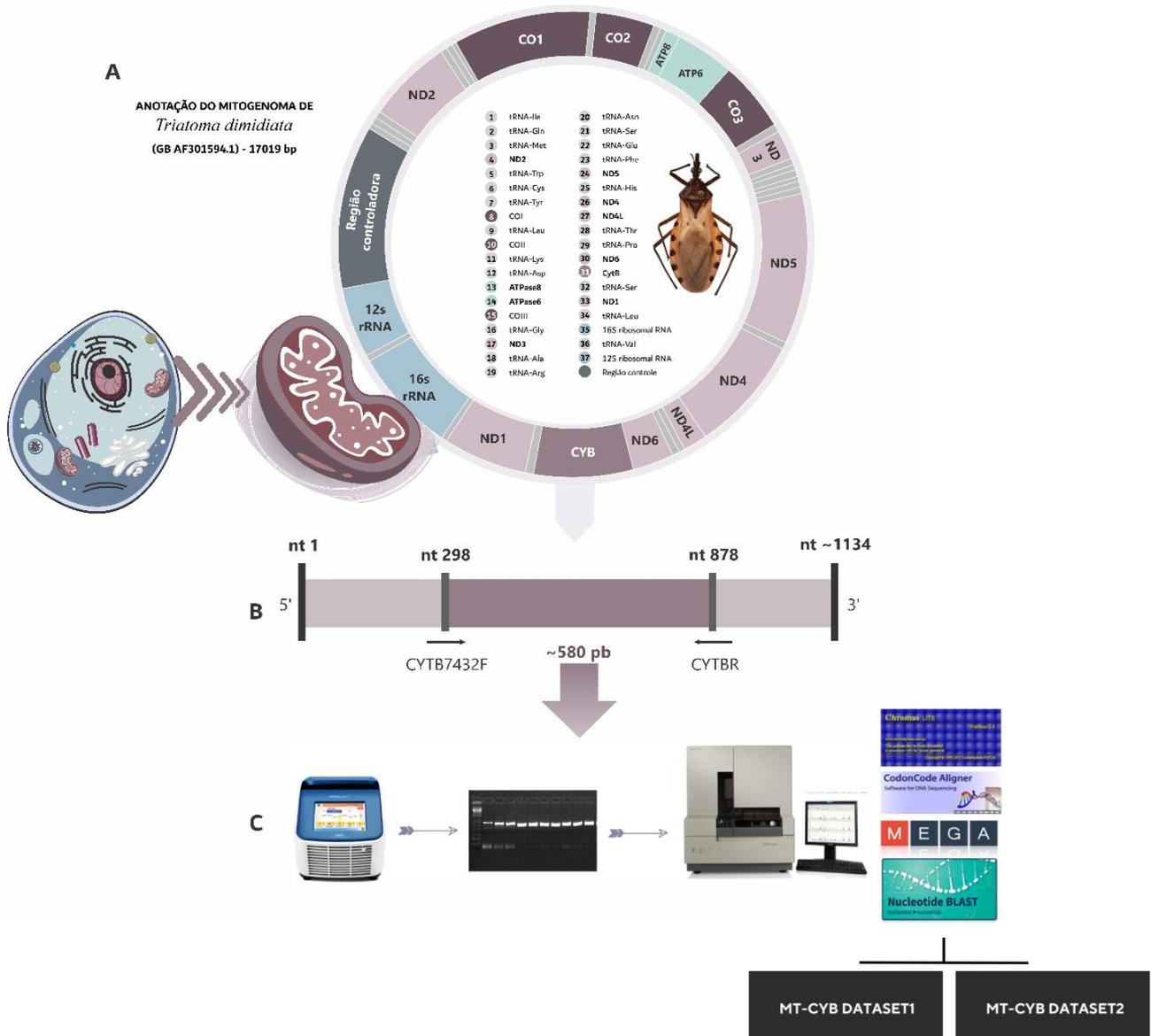
Para realização da reação de sequenciamento dos produtos purificados, utilizamos os mesmos iniciadores da PCR individualizados (3,2pmol) e o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) dispostos em uma placa de 96 poços, com volume final de 10 µL cada. A placa foi selada e submetida ao termociclador seguindo o perfil da reação de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão final a 60°C por 4 minutos; e incubação a 8°C. A placa foi armazenada sob refrigeração e a precipitação foi realizada pelos técnicos da Plataforma Genômica, seguindo o protocolo Etanol/Isopropanol utilizado na Plataforma de Sequenciamento e Análise de Fragmentos PDTIS/Fiocruz, sendo posteriormente sequenciada em um aparelho automático ABI3130xl Applied Biosystems™.

Análises moleculares e populacionais baseadas no Citocromo b

Após o sequenciamento das fitas senso e antissenso das amostras, os arquivos extraídos foram manualmente analisados e editados utilizando o programa ChromasPro (MacCarthy, 1998), excluindo as regiões flangeadoras com interferências ou ruído; regiões com leituras duvidosas ou ambiguidades, foram confrontadas com a sequência complemento. A montagem das sequências

completas (“assemble”), considerando as regiões de sobreposição das fitas, foi realizada utilizando a versão demo do programa CodonCode (CodonCode Corporation, 2019).

Figura 12. (A) Esquema do genoma mitocondrial, considerando os arranjos e utilizando a nomenclatura original baseado na anotação da sequência referência de *Triatoma dimidiata* (AF301594.1), seguindo Dotson e Beard (2001), indicando o *Citocromo b*. (B) Regiões de pareamento dos iniciadores senso CYTB7432F e antissenso CYTBR, bem como o tamanho aproximado do produto da PCR; nt = nucleotídeo sítio de anelamento, baseado na posição mais externa no *Citocromo b*. (C) Fluxograma da primeira etapa da identificação molecular através da PCR e sequenciamento da sequência alvo, indicando dois DATASETS que foram construídos. O esquema do mitogenoma é modificado de Li *et al.* (2016), considerando as abreviações dos genes recomendadas pelo Comitê de Nomenclatura Gênica Mundial, excluindo o prefixo “MT” (Eyre, 2006; HGNC Database, 2009); imagem do *Triatoma dimidiata* retirada de Justi e Dale (2021); imagens dos equipamentos retirados das páginas dos fabricantes; a imagem do gel de agarose com produtos de PCR é resultado deste projeto



Construímos um alinhamento de 510 pb utilizando o programa o MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016), considerando o código genético mitocondrial para invertebrados. O conjunto de dados incluiu 109 sequências montadas e comparadas à sequência considerada referência de *Triatoma brasiliensis* (AY336524; Monteiro *et al.*, 2004), posicionadas no quadro de leitura, e traduzidas para correta verificação de possíveis códons de início e parada. O alinhamento foi convertido ao formato “fasta” e submetido à ferramenta online BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para comparação com dados depositados no GenBank (GB) (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) e subsequente confirmação da identificação dos indivíduos. As identificações foram aceitas de acordo com o grau de correspondência que considera cobertura e identidade das amostras comparadas.

Considerando o viés amostral que levou a exclusão de pontos amostragem por não se caracterizarem como um agrupamento/deme/população biologicamente viável, construímos dois conjunto de dados contendo os alinhamentos das sequências nucleotídicas do MT-CYB (Tabela 3): DATASET1, contendo todas as sequências produzidas neste estudo (amostras coletadas em Currais Novos e Cajazeiras) e a sequência referência, para comparações de todos os indivíduos de forma independente; e DATASET2, contendo apenas as sequências das amostras de Currais Novos, excluindo os pontos com apenas um indivíduo coletado ou processado (CN73P, CN75D, CN85D), para análises de agrupamentos pré-definidos de indivíduos de um mesmo ponto geográfico e ecótopo.

DATASET1

As estimativas dos sítios polimórficos de 110 sequências oriundas de 13 pontos de amostragem foram calculadas, independente de distância geográfica e características ecotípicas, adicionando uma sequência de referência, como citado anteriormente. Para avaliação detalhada dos níveis e padrões de variação da sequência de DNA, utilizamos sítios polimórficos (S) para calcular a diferença nucleotídica (K) baseada no valor médio do número de mutações par-a-par, e determinamos a diversidade (π) como o número médio de diferenças por sítio entre duas sequências ao acaso, utilizando o programa DNAsp v. 6.12.3 (Rozas *et al.*, 2017). Para avaliação de estruturação intrapopulacional e padrões de distribuição geográfica, convertimos o conjunto de dados haplotípicos para o formato “*roehl*” (rdf) considerando apenas os sítios variáveis, a fim de avaliar reconstruções de rede de junção mediana de haplótipos (“*Median Joining*”; MJ) utilizando programa NETWORK

(Bandelt *et al.*, 1999). Este método recupera dados intrapopulacionais em forma de redes a partir de dados populacionais, através de conexões curtas e do algoritmo heurístico de máxima parcimônia (MP). Desta forma, o NETWORK calcula e desenha a rede haplotípica, cujo cada H é separado por no mínimo um passo mutacional, podendo adicionar novos vértices ao ramo – vetores medianos – quando houver deficiência amostral. O cumprimento dos ramos é relativo ao número de passos mutacionais separando Hs, bem como o tamanho das circunferências representando os Hs também é relativo ao número de compartilhamentos.

Tabela 3. Conjuntos de dados de sequências do MT-CYB de *Triatoma brasiliensis*, indicando a amostragem de cada conjunto de dados (MT-CYB DATASET1 e MT-CYB DATASET2), bem como as inferências realizadas. *n* = Número amostral; GB = Sequência do Genbank (AY336524); RN = Rio Grande do Norte; PB = Paraíba.

CONJUNTO DE DADOS MT-CYB	AMOSTRAS OBTIDAS NO ESTUDO		GB	<i>n</i>	INFERÊNCIAS
	Currais Novos / RN	Cajazeiras / PB			
DATASET1	102	7	1	110	Diversidade nucleotídica Diversidade haplotípica Reconstrução de junção mediana – Median Joining (MJ)
DATASET2	100	-	-	100	Diferenciação genética par-a-par (Φ_{st}) Testes de Mantel – Isolamento por distância (IBD) Análise de Variância Molecular (AMOVA) Testes de neutralidade (<i>D</i> de Tajima e <i>FS</i> de Fu)

DATASET2

Para calcular as estimativas populacionais das 100 sequências de 11 pontos de amostragem biologicamente viáveis, cada deme foi previamente definido como “população”, utilizando o

programa DNAsp v. 6.12.3 (Rozas *et al.*, 2017). Estimativas genéticas populacionais e índices de diferenciação genética par-a-par (F_{st} ou Φ_{st}) considerando 10 mil permutações (diferentes combinações de dados), foram calculados utilizando o programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) a fim de detectar fluxo gênico entre os pontos de amostragem. Para melhor entendimento, a diferenciação genética par-a-par se define como a medida padronizada de frequência gênica em uma população (Nei, 1986).

Para avaliar o isolamento por distância (IBD), realizamos testes de Mantel com base na correlação entre a diferenciação genética par-a-par (Φ_{st}) linearizada ($\Phi_{st} / (1 - \Phi_{st})$) e distâncias geográficas por meio da correlação entre matrizes utilizando o programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). A matriz de distância geográfica entre os locais de coleta foi estimada baseada nas geocoordenadas de cada ponto de amostragem, utilizando o programa Geographic Distance Matrix Generator versão 1.2.3 (Ersts, 2019), sendo corrigidas quanto as elevações do solo com a ferramenta 3D do Google Earth Pro 7.3.3.7786.

Para avaliar a distribuição hierárquica da variação genética, realizamos Análises de Variância Molecular (AMOVA), inicialmente com base na distribuição geográfica e ecotípica, e posteriormente de forma randômica sistematizada utilizando o programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). O primeiro teste realizado, considerou (i) a hipótese de completa panmixia, sendo o número de populações (k) igual a 1. Em seguida os agrupamentos pré-definidos foram (ii) por ecótopo (k=2; peridomiciliar e silvestre); (iii) por distribuição geográfica norte-sul (k=3; norte, central e sul); e (iv) por localidade de coleta (k=7) (Tabela 4). Por fim, foram realizados testes cegos com diferentes agrupamentos (Tabela 4). Para definir grupos populacionais consistentes, estimamos a variação entre grupos (Φ_{ct}), entre populações dentro de grupos (Φ_{sc}) e dentro de populações (Φ_{st}), considerando os índices de maior valor com intervalo de confiança significativo ($p > 0,05$) como indicador de agrupamentos geneticamente viáveis.

Após a determinação dos agrupamentos de populações, realizamos testes de neutralidade evolutiva para avaliar eventos demográficos e potencial seleção, utilizando o programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). O teste de D de Tajima (Tajima, 1989), avaliou a hipótese de que todas as mutações são seletivamente neutras, baseado nas diferenças nas comparações par-a-par entre o número de sítios polimórficos e o número médio de diferenças de nucleotídeos. Considerando apenas os valores significativos deste teste, os índices negativos podem indicar sinais de seleção purificadora ou expansão demográfica, enquanto os valores positivos podem indicar sinais de seleção

estabilizadora ou contração populacional. O teste *FS* de Fu (Fu, 1997) avaliou a estrutura dos haplótipos com base na sua distribuição de frequência, e considerando os valores significativos, podemos observar os mesmos padrões de seleção e expansão/contração.

Tabela 4. Grupos pré-definidos para realização de Análises de Variância Molecular (AMOVA) das amostras coletadas nos diferentes pontos de amostragem no Município de Currais Novos.

Teste	Agrupamentos definidos		Populações (k)	Pontos de amostragem
i	Panmixia		1	(CN69P + CN71P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN81P + CN83S + CN84P + CN86P + CN87S)
ii	Por ecótopo	Peridomiciliar	2	(CN69P + CN71P + CN74P + CN76P + CN81P + CN84P + CN86P)
		Silvestre		(CN72S + CN77S + CN83S + CN87S)
iii	Distribuição geográfica norte-sul	Norte	3	(CN71P + CN72S + CN81P)
		Central		(CN69P + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)
		Sul		(CN86P)
iv	Localidades de coleta	S. Malhada	7	(CN71P + CN81P)
		Furna da Onça		(CN72S)
		F. Cacimba da Pedra		(CN74P)
		F. Barra da Areia		(CN69P + CN83S + CN84P)
		S. Morada do Mocó		(CN76P + CN77S)
		B. Paizinho Maria		(CN87S)
		S. Areias de Baixo		(CN86P)

* Os testes com agrupamentos randômicos estão dispostos nos resultados e no APÊNDICE F.

IV.VI. Genotipagem de Polimorfismos em Nucleotídeos Únicos (SNPs)

Diferente dos protocolos originais de genotipagem de SNPs cuja metodologia parte da utilização de uma endonuclease para fragmentar o DNA associado ao local de restrição para posterior sequenciamento de alta performance (*restriction-site associated DNA sequencing*; RAD seq) (Baird *et al.*, 2008), Poland *et al.* (2012) desenvolveram um protocolo de digestão dupla utilizando uma combinação de enzimas de corte raro e corte frequente, cujas regiões de coesão correspondem aos adaptadores desenvolvidos (*double digest restriction-site associated DNA*; ddRAD-seq). Desta forma, para a elaboração das bibliotecas deste estudo, utilizamos a metodologia sugerida por Poland *et al.* (2012) adaptada segundo protocolo do Laboratório de Análise Genética e Molecular (LAGM) da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil (ANEXO I).

O protocolo utilizado foi realizado seguindo as etapas integradas de 1) digestão dupla utilizando as endonucleases; 2) ligação de adaptadores e enriquecimento; 3) quantificação das bibliotecas; e 4) sequenciamento (Figura 13). Vale ressaltar que anterior a todo procedimento, os adaptadores contendo sequências exclusivas de índices foram sintetizados e armazenados sob refrigeração nas dependências do LAGM, como descrito no ANEXO I. As misturas contendo os adaptadores com as combinações pré-estabelecidas exclusivas de índices para identificação pós sequenciamento estavam dispostas nos poços definidos de uma placa de 96 poços e armazenados sob refrigeração. A identificação das combinações já estava atribuída a cada poço e essas sequências já se encontravam planilhadas, faltado apenas indicar qual amostra receberia qual combinação (*sample sheet*).

Seguindo o protocolo, a etapa de digestão dupla sugerida utilizava a enzima de corte raro *Pst* I (CTGCAG), correspondente ao Adaptador1 contendo os códigos de barras (barcodes), enquanto a enzima de corte frequente *Msp* I (CCGG), corresponde ao adaptador comum Adaptador 2 (Adaptador-Y). Para fins de otimização, realizamos um teste com quatro combinações de endonucleases disponíveis para maior especificidade do local de clivagem (Tabela 5). Para tanto, as amostras teste foram submetidas à reação de digestão com volume final de 20µL, no termociclador seguindo o perfil de 37°C por 12 horas, 65°C por 20 minutos e incubação por 10°C por tempo indefinido. O sucesso do teste foi verificado em eletroforese em gel de agarose 1% NaOH 1X, onde optamos por utilizar a combinação original das enzimas *Pst* I x *Msp* I de acordo com o padrão das bandas no gel.

Figura 13. Fluxograma da metodologia de construção de bibliotecas para sequenciamento de alta performance (Poland *et al.*, 2012). O fluxograma indica as etapas de 01) digestão dupla utilizando a combinação de endonucleases; 02) ligação de adaptadores e barcode ao DNA fragmentado, purificação e enriquecimento das bibliotecas; 03) quantificação das bibliotecas através de PCR quantitativo; e 04) sequenciamento em plataforma NextSeq. As imagens do gráfico de quantificação e da flowcell com o sequenciamento em ponte, foram retirados das páginas dos fabricantes.

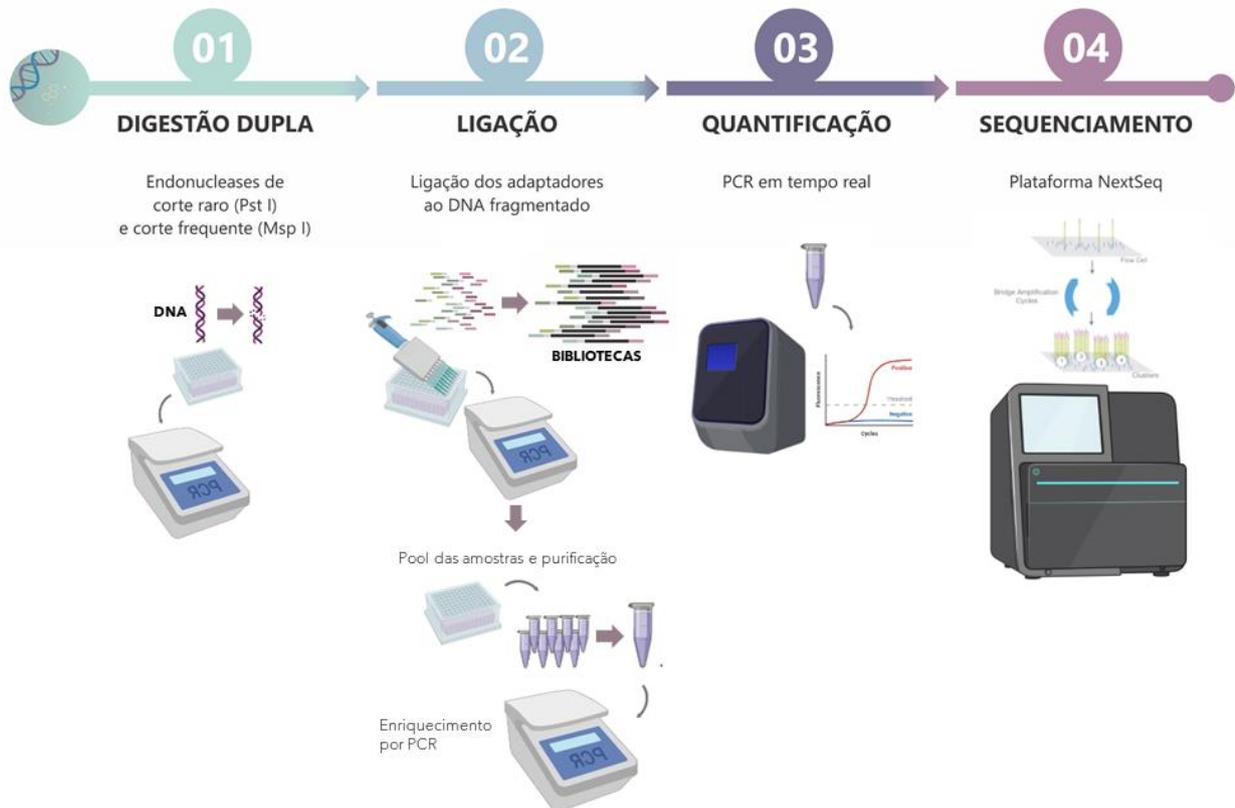


Tabela 5. Combinações de enzimas de restrição para testes de digestão dupla, especificando os reagentes utilizados.

Combinação	Tampão (2,0 µL)	Enzimas de restrição de corte raro	Enzima de restrição de corte frequente	H ₂ O estéril	DNA 30ng/µL
<i>Pst</i> I x <i>Msp</i> I	NEB Cut Smart Buffer 4 (10X)	0,4 µL <i>Pst</i> I (20 U/µL)	0,4 µL <i>Msp</i> I (20 U/µL)	10,2 µL	7 µL
<i>Nsi</i> I x <i>Msp</i> I	NEB Buffer 3.1 (10X)	0,8 µL <i>Nsi</i> I (10 U/µL)	0,4 µL <i>Msp</i> I (20 U/µL)	9,8 µL	7 µL
<i>Pst</i> I x <i>Mse</i> I	NEB Cut Smart Buffer 4 (10X)	0,4 µL <i>Pst</i> I (20 U/µL)	0,8 µL <i>Mse</i> I (10 U/µL)	9,8 µL	7 µL
<i>Nsi</i> I x <i>Mse</i> I	NEB Buffer 3.1 (10X)	0,8 µL <i>Nsi</i> I (10 U/µL)	0,8 µL <i>Mse</i> I (10 U/µL)	9,4 µL	7 µL

Seleção de amostras

Selecionamos as amostras de DNA de acordo com a concentração e a integridade, verificadas após o isolamento. Assim, foram selecionadas 95 amostras de indivíduos identificados como *T. brasiliensis* pela morfologia e taxonomia molecular, com pareamento das amostras quando possível. O número amostral foi definido considerando: (i) o número máximo de combinações de índices em uma única corrida, para evitar vieses técnicos uma vez que os procedimentos foram realizados em sequência; e (ii) número amostral disponível para cada ponto de coleta. Dessa forma, incluímos amostras dos 15 locais de coleta (CN = 14; CZ = 1), dos três ecótopos amostrados; domiciliar ($n = 2$), peridomiciliar ($n = 9$) e silvestre ($n = 4$).

Após desenhar a disposição das amostras na placa de 96 poços, considerando suas concentrações, a mistura dos reagentes foi disposta normalizando a concentração indicada para as etapas a seguir. Cada amostra foi atribuída as sequências únicas de oligonucleotídeos de cada adaptador e dos barcodes para futura identificação e consolidação em um único arquivo de saída para cada amostra, e para tanto a *sample sheet* foi construída antes da corrida no NextSeq (APÊNDICE A).

Digestão dupla e ligação de adaptadores

As etapas a seguir foram realizadas na mesma placa de 96 poços. Para realização da digestão, a mistura dos reagentes contendo a combinação de enzimas e o tampão NEB Buffer 4 (10X) foi disposta em cada poço da placa de 96 poços e em seguida foram adicionadas as amostras (95 amostras de DNA de genômico total e um poço destinado ao controle), seguindo uma ordem preestabelecida conforme a demanda de concentração. Em seguida, a placa foi selada e submetida à reação de digestão descrita no item anterior. Imediatamente após o fim da reação de digestão da etapa de incubação, o protocolo de ligação dos adaptadores (indexação) foi realizado.

Após a digestão, adicionamos a combinação de adaptadores e a mistura da reação de ligação (Tabela 6) em cada poço contendo 20 μ L da reação de digestão utilizando uma pipeta multicanal. A placa foi selada e submetida ao termociclador, seguindo o perfil de 22°C por 2 horas, 65°C por 20 minutos e incubação por 10°C. Via de regra, foram produzidos fragmentos com um sítio de restrição *Pst* I e outro sítio de restrição *Msp* I, que passaram por amplificação para enriquecimento. Mesmo

sendo sítios de corte raro, podem ocorrer a ampliações de fragmentos *Pst* I-*Pst* I; enquanto isso, apesar da serem sítios de corte frequente, não serão amplificados fragmentos *Msp* I-*Msp* I devido as características dos Adaptadores Y sintetizados especificamente para impedir a amplificação a partir deste corte. Sendo assim, os fragmentos gerados serão compostos majoritariamente de uma biblioteca uniforme composta por Adaptador 1 senso – barcode – DNA genômico – Adaptador 2 Reverso. Após a reação de ligação, a enzima ligase foi inativada submetendo a placa à temperatura de 65°C por 20 minutos, para posterior realização da PCR de enriquecimento das bibliotecas.

Tabela 6. Composição da reação de ligação.

Componentes / Reagentes		Volume
Reação de restrição		20 µL
Combinação de adaptadores previamente preparados e disponíveis no LAGM	Adaptador1 + Adaptador2	5 µL
Mix da reação de ligação		
	Tampão NEB 4 10X	2,0 µL
	ATP 10 mM	1,0 µL
	T4 DNA Ligase 200 U/µL	0,5 µL
	H ₂ O estéril	11,5 µL
Volume final		40 µL

Purificação e enriquecimento das bibliotecas

Previamente a PCR de enriquecimento, as amostras foram submetidas ao processo de purificação. No protocolo sugerido por Poland *et al.* (2012), essa etapa é realizada utilizando aparelho QIAgility. No entanto, todo o procedimento foi realizado manualmente seguindo adaptação do LAGM. Dessa forma, a fim de reduzir as chances de contaminação, de erros de pipetagem e manipulação, e de aprimorar a confecção e homogeneização dos *pools*, as amostras contidas em cada uma das oito linhas da placa (*8 well strip*) foram agrupadas para realização desta etapa.

Para tanto, separamos um tubo de 0,6 mL para cada linha da placa (oito tubos), e adicionamos 6 µL de cada amostra indexada (12 amostras), totalizando um volume final de 72 µL por tubo. Dessas

misturas, foram confeccionados dois *pools* de todas as bibliotecas, agrupando 25 μL das misturas iniciais em tubos de 1,5 mL, totalizando 200 μL de volume final. Combinamos esse multiplex das reações de ligação (200 μL) com o tampão de captura (1000 μL) do conjunto de reagentes QIAquick PCR Purification Kit da Qiagen, cujo volume de 600 μL foi disposto em coluna de purificação correspondente a cada *pool*, seguido de centrifugação de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, adicionamos às mesmas colunas os 600 μL restantes das soluções, dando prosseguimento ao procedimento de purificação convencional. Realizamos a etapa de lavagem, ressuspendemos o produto purificado em 60 μL de tampão de eluição e obtivemos os dois *pools* das bibliotecas purificadas.

A fim de potencializar a amplificação e de reduzir a ocorrência de amplificação preferencial de fragmentos que podem ocorrer durante uma única reação, foram realizadas etapas curtas de PCR de enriquecimento de fragmentos que contêm entre 200 e 500 bases, e que são mais apropriados à amplificação por ponte (*bridge PCR*; Poland *et al.*, 2012). Para essa reação foram utilizados 10 μL do *pool* de bibliotecas purificado, 12,5 μL NEB Master Mix 2X, 2,0 μL dos iniciadores senso e antissenso Illumina 10 μM e H_2O estéril. O perfil da reação foi 95°C por 30 segundos; 16 ciclos de 95°C por 10 segundos, 62°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos; e incubação a 4°C. Após a PCR, o *pool* de bibliotecas foi novamente purificado.

A biblioteca final foi quantificada em PCR quantitativo em tempo real (qPCR; *quantitative PCR*), utilizando o conjunto de reagentes Illumina DNA Standards and Primer Premix Kit (KAPA BIOSYSTEMS). Os conjuntos de reagentes para quantificação de bibliotecas contêm o material necessários para a quantificação precisa, confiável e reprodutível baseadas em amostras padrão com concentrações conhecidas. Através de um detector de fluorescência, a eficiência da quantificação foi medida pela amplificação em tempo real, observando o padrão das curvas de crescimento. Ainda, o *pool* de bibliotecas foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para estimar o tamanho dos fragmentos gerados.

Corrida NextSeq

O sequenciamento de alta performance foi realizado em uma plataforma prestadora de serviço NextSeq Illumina do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Universidade São Paulo

campus Ribeirão Preto. Para tanto, utilizamos o conjunto de reagentes NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (150 Cycles) da Illumina, realizando o sequenciamento do tipo “*single-end*”, onde apenas uma extremidade do fragmento foi sequenciada. De acordo com o manual NextSeq™ 550 System (Illumina, 2022), a corrida especificada pode produzir cerca de 130 milhões de leituras únicas, gerando de 32-39 Gb de dados com índice de qualidade *Phred Quality Scores* 30 (q30; 99,9% de acurácia) > 75%.

Construção e comparações de catálogos de locus

As análises dos dados obtidos após o sequenciamento foram realizadas utilizando ferramentas de bioinformática que primeiramente permitiram identificar as sequências de cada um dos indivíduos. Para tanto, utilizamos o programa Stacks que pode recuperar milhares de marcadores de SNPs a partir de sequenciamentos *single-end* ou *paired-end* Illumina de representação reduzida do genoma, e cujo fluxograma de montagem de catálogo de *locus* consiste em um pipeline modular que constrói com eficiência um grande número de sequências curtas de várias amostras (Catchen *et al.*, 2011, 2013). O programa Stacks identifica e genotipa *locus* de indivíduos utilizando ou não sequências de referência, incorporando modelo de estimativa por máxima verossimilhança para identificar polimorfismos nas sequências e distingui-los de erros de sequenciamento. Para construção e comparações dos catálogos de *locus*, as seguintes etapas foram realizadas:

A) *process_radtags*”: A primeira parte do processo consistiu na realização da entrada dos dados brutos (formato fastq.gz), contendo o pool de fragmentos de DNA com adaptadores e barcodes sequenciados; chamamos de “*tags*” as sequências dos fragmentos de DNA clivado juntamente com os adaptadores (Figura 14A1). Em seguida, a função “*demultiplexing*” classificou os dados brutos misturados a fim de recuperar e distribuir as *reads* (leituras/sequências) das amostras individuais da biblioteca Illumina, filtradas justamente com base nas sequências dos adaptadores (Figura 14A2). A análise de qualidade foi realizada baseada nos valores da filtragem interna do sequenciamento, considerando as probabilidades de erro estimadas utilizando o índice Phred (Illumina, 2017) e removendo leituras menos confiáveis baseado na intensidade de seu brilho captado pelo NextSeq. Apenas as *tags* que continham a sequência exata dos adaptadores foram filtradas e utilizadas nas análises (Figura 14A3). As extremidades foram editadas, excluindo regiões de adaptadores, gerando sequências de 130 bases, partindo do pressuposto que o tamanho mínimo das tags considerado por

Poland *et al.* (2012), é de ~125 bases. A partir da separação das sequências por indivíduos e da criação de arquivos com filtros atribuindo valores as amostras (pontos de coleta, coordenadas, ecótopos), os dados foram submetidos às abordagens propostas neste estudo e serão descritas a seguir.

B) pipeline USTACKS (Figura 14B1): Escolhemos o pipeline *de novo*, ou seja, sem genoma de referência, uma vez que não existe anotação de *Triatoma brasiliensis* e espécies aparentadas na literatura. Dessa forma, uma montagem *de novo* do catálogo foi iniciada agrupando os dados de cada indivíduo em *loci* e identificando os locais de nucleotídeos polimórficos.

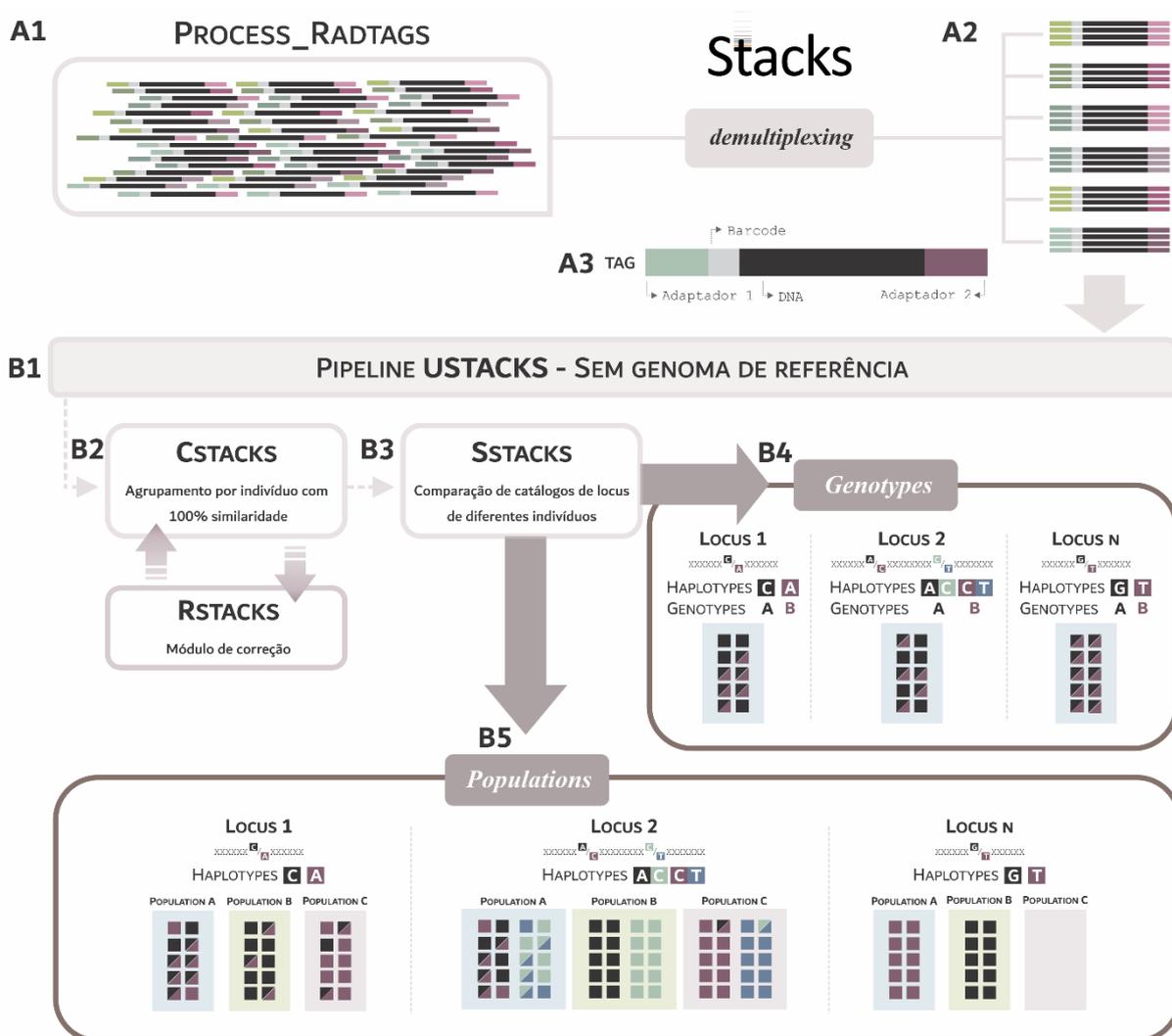
C) CSTACKS e RSTACKS (Figura 14B2): O primeiro passo do pipeline *de novo* criou pilhas de sequências (“empilhar”; tradução literal de “*stacks*”) utilizando scripts individuais. A ferramenta CSTACKS agrupou os dados de cada indivíduo de duas maneiras: primeiro agrupamento de sequências com 100% de similaridade; em seguida esse agrupamento foi automaticamente refeito utilizando o módulo de correção RSTACKS, considerando uma diferença de dois nucleotídeos e refazendo os catálogos individuais.

D) STACKS (Figura 14B3): Após os sítios polimórficos terem sido identificados dentro dos catálogos de cada indivíduo, a ferramenta STACKS comparou os catálogos entre si. O modelo utilizado pelo programa considera como SNPS apenas os polimorfismos com profundidade $\geq 5X$; e a proporção do segundo alelo mais frequente em um *locus* (MAF; “*Minor allele frequency*”) ≥ 0.01 ; que estejam presentes em pelo menos em 75% dos indivíduos de pelo menos 12 localidades, retendo apenas um SNP por *tag*. Dessa forma, as informações alélicas foram convertidas em um conjunto de genótipos.

E) “genotypes”: Este módulo atribuiu um ou dois haplótipos em um *locus* de um único indivíduo diploide, avaliando o conjunto de haplótipos dentro e entre as populações. Dessa forma, as informações alélicas foram convertidas em um conjunto de genótipos (Figura 14B4).

F) “population”: Este módulo analisou um conjunto de dados de amostras individuais oriundos de uma população pré-determinada, computando uma série de estatísticas de genética populacional (Figura 14B5).

Figura 14. Fluxograma modificado de Catchen *et al.* (2013). A1) “*process_radtags*”, indicando fragmentos de DNA com adaptadores e barcodes; A2) “*demultiplexing*”, indicando as sequências por indivíduo; A3) componentes da *tag*, considerando as características das bibliotecas de Poland *et al.* (2012). B1) Pipeline USTACKS, cuja montagem dos catálogos é *de novo*; B2) módulos CSTACKS, realizado para construção de catálogos de *locus* para cada indivíduo e RSTACKS para correção e; B3) módulo SSTACKS, para comparações dos catálogos de *locus* de diferentes indivíduos. B4) Comandos “*genotypes*”, que atribui haplótipos e genótipos aos indivíduos e; B5) “*populations*”, organiza os *loci* dentro e entre populações, estimando índices de genética de população.



Análises de seleção e diversidade baseado em SNPs

A fim de avaliar assinaturas putativas de seleção nos SNPs identificados nos catálogos construídos com o pipeline STACKS, utilizamos as informações de polimorfismos para realizar

Análises de Componentes Principais (“*Principal Component Analysis*”; PCA) e identificar *loci* com frequências alélicas divergentes. Para tanto, utilizamos os pacotes PCADAPT (Luu *et al.*, 2017) e FSTHET (Flanagan e Jones, 2017) no ambiente de programação R e RStudio version 3.6.1 (R Core Team, 2013; R Studio Team, 2015).

Por definição, as análises de PCA visam reduzir a dimensão de conjuntos contendo grande volume de informações, porém preservando máximo de variabilidade possível, bem como a capacidade de interpretação (Jolliffe e Cadima, 2016). Com base em análises estatísticas de PCA, o pacote PCADAPT detecta marcadores genéticos envolvidos na adaptação biológica, identificando dados com valores que se encontram a uma distância anormal de outros valores da amostragem, se comportando de maneira discrepante – os “*outliers*”. Além das análises de componentes principais (PCs) da matriz de genótipos, o PCADAPT executa uma segunda tarefa que avalia testes estatísticos e seus intervalos de confiança (valor de p) baseado nas correlações entre SNPs e os primeiros PCs (K). De acordo com o manual do programa, primeiramente a PCA deve ser realizada com um número suficientemente grande de PCs (por exemplo, $K=20$), para posteriormente selecionar o K satisfatório baseado no padrão da curva gerada em um gráfico do tipo “*scree plot*”; o recomendado é o K representado em uma curva acentuada (seguida por uma dobra e uma linha reta), que corresponde à estrutura da população.

A partir do mesmo conjunto de dados do catálogo de *locus*, o programa FSTHET calculou valores extremos de diferenciação genética em relação à sua heterozigosidade, como metodologia complementar (Flanagan e Jones, 2017). A abordagem utilizada para identificação de *loci* supostamente sob seleção, busca identificar *loci* com grande diferenciação genética (F_{st}) quando comparado à heterozigosidade esperada (H_e), considerando que a relação F_{st}/H_e pode mudar com base na demografia da população. Como já observado anteriormente, conceitualmente a diferenciação genética ou índice de fixação de alelos (F_{st}), se define como a medida padronizada de diferenciação de frequência gênica de um alelo em uma população (Nei, 1986). Já a heterozigosidade esperada (H_e), ou diversidade genética de um *locus*, se entende como variabilidade estimada de uma população descrevendo sua proporção de genótipos heterozigotos, considerando efeitos muito pequenos de forças evolutivas, ou seja, sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (Harris e DeGiorgio, 2017).

Após interpretação dos resultados do PCADAPT e FSTHET, foram considerados SNPs sob seleção os outliers da amostragem em ambas as análises; os *loci* restantes foram considerados neutros,

ou seja, *loci* cujas variações não afetam a aptidão dos indivíduos (ou *fitness*), não contribuindo para seleção natural.

A) *Loci* putativamente sob seleção

Utilizando os dados de similaridade e padrão dos *loci* putativamente sob seleção, as sequências foram confrontadas com o banco de dados de genômica funcional Blast2Go (Gotz *et al.*, 2008), para obter informações sobre mapeamento e anotação funcional eficiente de DNA ou sequências de proteínas, bem como componentes celulares, funções e processos biológicos, com base no vocabulário Gene Ontology. Ainda, partindo de pressuposto que as regiões analisadas podem ser de origem aleatória, a fim de rastrear e classificar sequências repetitivas de DNA intercaladas e de baixa complexidade, como elementos móveis, utilizamos os bancos de dados Repbase (Jurka *et al.*, 2005) e RepeatMasker versão 4.0. (Smit *et al.*, 2013).

B) *Loci* neutros

Os *loci* considerados neutros, foram submetidos a análises de diversidade e estrutura genética através da Análise Discriminante dos Componentes Principais, estimativas de índices de F_{ST} e heterozigidade, no ambiente de programação R e RStudio version 3.6.1 (R Core Team, 2013; R Studio Team, 2015). As análises de diversidade e estrutura genética foram realizadas utilizando o pacote *diversity* (Keenan *et al.*, 2013) para estimar o número total de alelos (A), riqueza alélica (A_r), heterozigidade observada (H_o), heterozigidade esperada (H_E), os coeficientes de endogamia (F_{IS}) e a diferenciação genética por meio do Índice de Fixação (F_{ST}) global.

Para inferências de estrutura genética, realizamos Análises Discriminante de Componentes Principais (DAPC) com o pacote *adegenet* (Jombart e Ahmed, 2011), reduzindo a dimensão de conjuntos com grupos previamente definidos. As comparações entre cada indivíduo e os locais de coleta, consideraram o número ótimo de agrupamentos genéticos (K) como o número total de locais de coleta ($n=14$). Para o cálculo do número mais provável de agrupamentos genéticos, estimamos o número K usando o método K-means baseado no Bayesian Information Criterion (BIC). Análises de Variância Molecular (AMOVA) foram calculadas utilizando o pacote *poppr* (Kamvar *et al.*, 2014), assim como a análise de agrupamento bayesiano, assumindo o modelo de mistura e frequências alélicas correlacionadas entre as populações. Para tanto, foram realizados processos independentes para cada valor de K , aceitando 1.000.000 gerações e burn-in de 100.000 (10%). Ainda utilizando o

pacote poppr (Kamvar *et al.*, 2014), calculamos estimativas de FST de locus e comparações de diversidade genética par-a-par, bem como equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW), desequilíbrio de ligação (LD), testes entre pares de loci. Para todos os componentes da estatística genética foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

IV.VII. Produção e edição de imagens

As figuras apresentadas neste trabalho foram produzidas e editadas nos programas CorelDraw X7 versão 17.1.0.572 e Power Point Office Microsoft 365, utilizando imagens vetoriais gratuitas de bancos de dados online, retirados das páginas dos fabricantes de equipamentos e reagentes, da ferramenta online de Imagem e Ilustração Científica BioRender (disponível em <https://www.biorender.com>). As imagens de satélite foram obtidas do Google Maps. Os mapas foram confeccionados considerando os pontos de coleta aferidos utilizando GPS cujas coordenadas foram convertidas para graus decimais com a ferramenta online speciesLink (disponível em <http://splink.cria.org.br/>), e utilizando o programa Arqview v3.1. com as formas definidas (“shape”) da base de dados do Projeto RadamBrasil, e posterior edição no CorelDraw X7. Todas as fotografias foram devidamente creditadas nas legendas das figuras.

V. RESULTADOS

Do total de 1.625 insetos coletados previamente no município de Currais Novos e disponibilizados para este estudo, 1.365 eram de diferentes estádios ninfais, enquanto 260 eram adultos. Deste total, 77% dos insetos coletados foram provenientes do ambiente peridomiciliar, enquanto 21% originaram-se do ambiente silvestre em afloramentos rochosos e apenas 1% provinha de ambiente domiciliar. Vale ressaltar que no contexto de infestações peridomiciliares, foram coletados números substanciais de insetos em cinco locais distintos, com as seguintes contagens: CN69P ($n = 519$), CN71 ($n = 52$), CN76P ($n = 94$), CN81P ($n = 96$) e CN86P ($n = 463$), conforme detalhado na Tabela 2.

Foram isoladas amostras de DNA de 260 indivíduos adultos identificados morfologicamente oriundos de Currais Novos (CN $n = 251$) e Cajazeiras (CZ $n = 9$). Selecionamos as amostras com melhores concentração e integridade para identificação através de taxonomia alfa, baseada em informações comparativas do marcador mitocondrial em bancos de dados e para posterior genotipagem de nucleotídeos de polimorfismo único para abordagens populacionais, com pareamento das amostras quando possível (APÊNDICE B). Dessa forma, foram utilizadas 109 amostras para sequenciamento convencional (CN $n = 102$; CZ $n = 7$) e 95 amostras para genotipagem por sequenciamento (CN $n = 90$; CZ $n = 5$), como listado no APÊNDICE C.

V.I. Análises do gene MT-CYB

Foram geradas 226 sequências e 109 *contigs* com tamanho médio de 553 pares de base (pb) do gene MT-CYB de indivíduos que foram identificados como *T. brasiliensis* com 100% de cobertura e identidade acima de 99% (APÊNDICE D). As sequências foram alinhadas utilizando como referência uma sequência do GB (AY336524) e editadas para o quadro de leitura contendo 510 pb. Após descarte de sítios contendo ambiguidades ou dados faltantes, o número total de sítios analisados foi de 504. Os dados do sequenciamento convencional foram analisados considerando os dois

conjuntos de dados (DATASET1 e DATASET 2) comparando todas as sequências obtidas e a sequência do banco de dados; e por agrupamentos de pontos de coleta (populações), considerando somente as amostras de Currais Novos – para esta última análise foram consideradas apenas as possíveis populações biológicas, com mais de um indivíduo coletado por ponto.

V.I.I. MT-CYB DATASET 1

Estimativas haplotípicas

Foram analisadas 110 sequências de forma comparativa, onde foram detectados 34 sítios variáveis entre as sequências de MT-CYB de *T. brasiliensis* (APÊNDICE E). Os sítios variáveis ocorreram majoritariamente na terceira posição da trinca (79,4%), incluindo a posição #3 onde o códon do H02 é ATA que também codifica uma Metionina (códon de início). Todas as variações foram do tipo transição, sendo 18 substituições de base pirimidina por outra pirimidina (C→T = 6; T→C = 12) e 16 de base purina por outra purina (G→A = 8; A→G = 8). Baseado nas variações estimadas, foram identificados 23 haplótipos, sendo 10 singletons (sequência de apenas um indivíduo) e 13 compartilhados, com diversidade haplotípica (Hd) de 0,881 (Tabela 7). As sequências produzidas neste estudo foram devidamente depositadas em bancos de dados, considerando uma sequência para cada haplótipo identificado (GB PP315985 – PP316007).

A rede de junção mediana (MJ) estimada para avaliar estruturas subpopulacionais, apresentou estrutura estrelada (*starlike*), sugerindo o haplótipo central H03 como ancestral e expansão populacional dentro do nosso conjunto de dados (Figura 15). O haplótipo H03 exibiu a maior frequência e foi compartilhado por 31 indivíduos originários dos três ecótopos amostrados, representando 77% dos pontos de coleta de Currais Novos. Entre as amostras que compartilham o H03, inclui-se a única amostra intradomiciliar (CN75D.1).

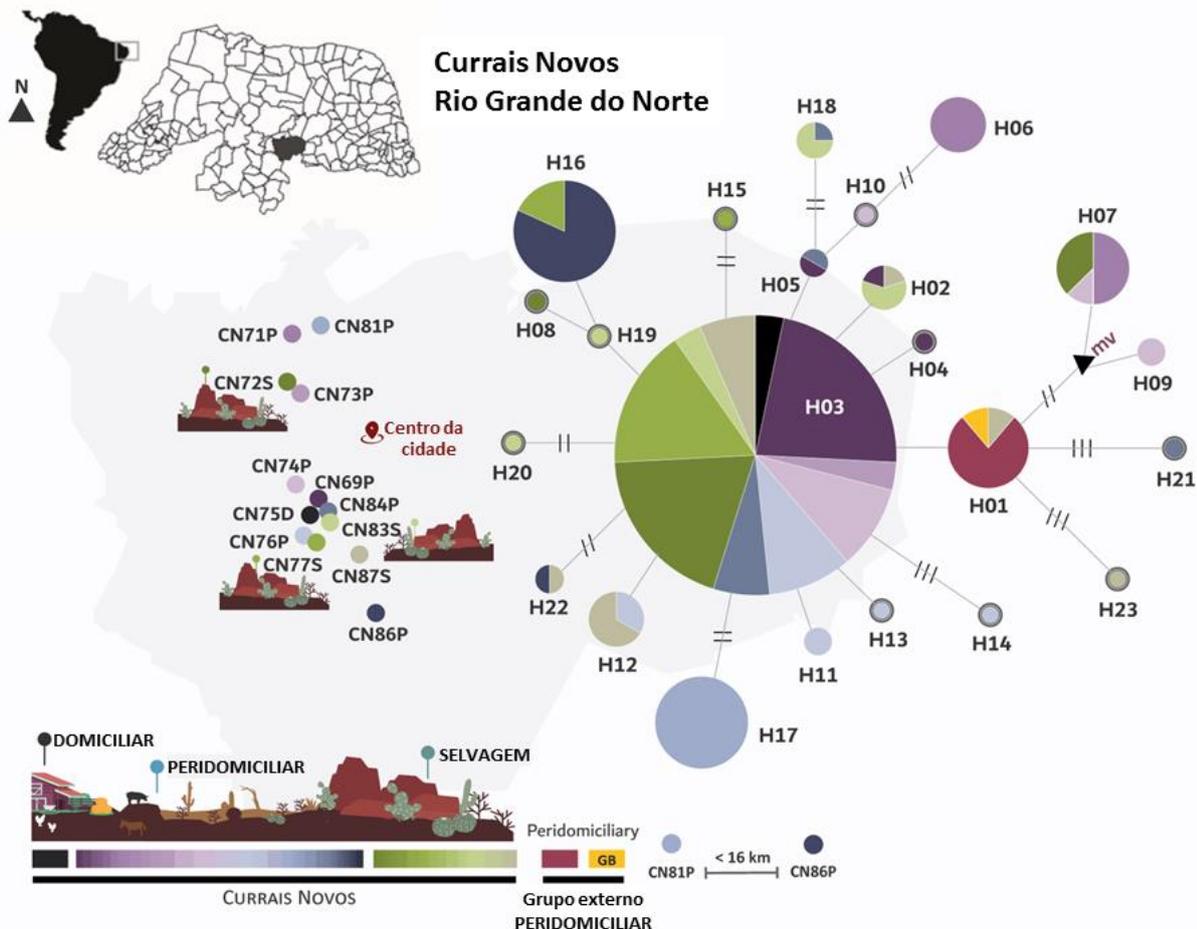
A amostra referência foi incluída no conjunto do H01, compartilhado com outras oito amostras, sendo todos os indivíduos do ecótopo peridomiciliar de Cajazeiras (n=7) e um indivíduo do ambiente silvestre de Currais Novos (CN87S.7). Notavelmente, a rede haplotípica não revelou qualquer estrutura geográfica ou ecotípica discernível, sugerindo que este haplótipo foi amplamente distribuído. No entanto, de maneira discordante, a distribuição espacial dos haplótipos mostrou que os pontos mais ao norte (CN81P, CN71P) e mais ao sul (CN86P) se apresentaram mais homogêneos.

O H17 foi identificado exclusivamente em todos os dez indivíduos do ponto de coleta mais extremo ao norte, configurando a população peridomiciliar CN81P. Sua presença distinta apenas nesta população específica é um indicativo de fundação de uma população, uma vez que todos os indivíduos apresentam herança matrilinear única. No ponto CN71P os indivíduos amostrados compartilharam sequências de apenas dois haplótipos (H06 e H07), bem como o ponto CN86P que também se apresentou homogêneo, sendo representado por dois haplótipos (H16 e H22).

Tabela 7. Lista de haplótipos de sequências de MT-CYB de *Triatoma brasiliensis* do município de Currais Novos (CN; RN), Cajazeiras (CZ; PB) e Garanhuns (PE; GB AY336524), indicando cada haplótipo (H), número de indivíduos que compartilham cada sequência (n), os indivíduos amostrados e o número de depósito do GenBank. (*) Sequência referência retirada de Monteiro *et al.* (2004).

H	n	Amostras	Acesso GenBank
H01	9	<i>Triatoma brasiliensis</i> haplotipo a CZ19P.2, CZ19P.6, CZ19P.14, CZ19P.15, CZ19P.16, CZ19P.25, CZ19P.27, CN87S.7	AY336524* PP315985
H02	5	CN69P.1, CN83S.1, CN83S.4, CN83S.10, CN87S.5	PP315986
H03	31	CN75D.1, CN69P.2, CN69P.3, CN69.7, CN69P.8, CN69P.10, CN69P.11, CN69P.12, CN72S.2, CN72S.6, CN72S.7, CN72S.10, CN72S.12, CN72S.13, CN73P.2, CN74P.4, CN74P.6, CN74P.10, CN76P.6, CN76P.8, CN76P.10, CN77S.4, CN77S.5, CN77S.7, CN77S.8, CN77S.9, CN83S.5, CN84P.3, CN84P.5, CN87S.3, CN87S.6	PP315987
H04	1	CN69P.4	PP315988
H05	2	CN69P.5, CN84P.4	PP315989
H06	6	CN71P.1, CN71P.2, CN71P.3, CN71P.5, CN71P.10, CN71P.12	PP315990
H07	8	CN71P.4, CN71P.6, CN71P.9, CN71P.11, CN74P.7, CN72S.8, CN72S.9, CN72S.14	PP315991
H08	1	CN72S.3	PP315992
H09	3	CN74P.1, CN74P.12, CN74P.13	PP315993
H10	1	CN74P.2	PP315994
H11	3	CN76P.1, CN76P.9, CN76P.12	PP315995
H12	6	CN76P.11, CN76P.14, CN87S.4, CN87S.8, CN87S.9, CN87S.11	PP315996
H13	1	CN76P.2	PP315997
H14	1	CN76P.15	PP315998
H15	1	CN77S.3	PP315999
H16	11	CN86P.1, CN86P.2, CN86P.3, CN86P.4, CN86P.5, CN86P.6, CN86P.8, CN86P.10, CN86P.11, CN77S.1, CN77S.2	PP316000
H17	10	CN81P.2, CN81P.3, CN81P.4, CN81P.5, CN81P.6, CN81P.7, CN81P.8, CN81P.11, CN81P.12, CN81P.13	PP316001
H18	4	CN84P.2, CN83S.2, CN83S.6, CN83S.11	PP316002
H19	1	CN83S.3	PP316003
H20	1	CN83S.9	PP316004
H21	1	CN84P.1	PP316005
H22	2	CN86P.12, CN87S.2	PP316006
H23	1	CN87S.10	PP316007

Figura 15. Rede de junção mediana (MJ) gerada a partir de 110 sequências MT-CYB de *Triatoma brasiliensis*. Os tamanhos dos círculos na rede correspondem ao número de amostras associadas a cada haplótipo (H). As cores do gráfico circulares e suas fatias representam diferentes locais de coleta, incluindo Currais Novos (CN), Cajazeiras (CZ) e sequências do GenBank (GB), que estão detalhados na legenda localizada no canto inferior da figura. Os comprimentos dos ramos são relativos às distâncias dos haplótipos e os traços indicam etapas mutacionais maiores que um. A escala fornecida na figura denota a distância entre os dois pontos finais do transecto de coleta. O vetor mediano é representado pela sigla mv. Para obter detalhes sobre lista de haplótipos e número amostral, ver tabela 7.



V.I.II. MT-CYB DATASET 2

Consideramos possíveis populações biológicas apenas os pontos geográficos e ecótopos com um conjunto de indivíduos coletados. Dessa forma, selecionamos 100 sequências que foram atribuídas a 11 grupos representando os pontos de coleta, cada um contendo de cinco a 10 amostras. Utilizando os agrupamentos pré-estabelecidos, foi gerada uma matriz de índices de divergência genética (R_{ST}) a

fim de estimar o fluxo gênico entre as populações. Consideramos significativos os valores baseados em $p \leq 0,05$ (Tabela 8).

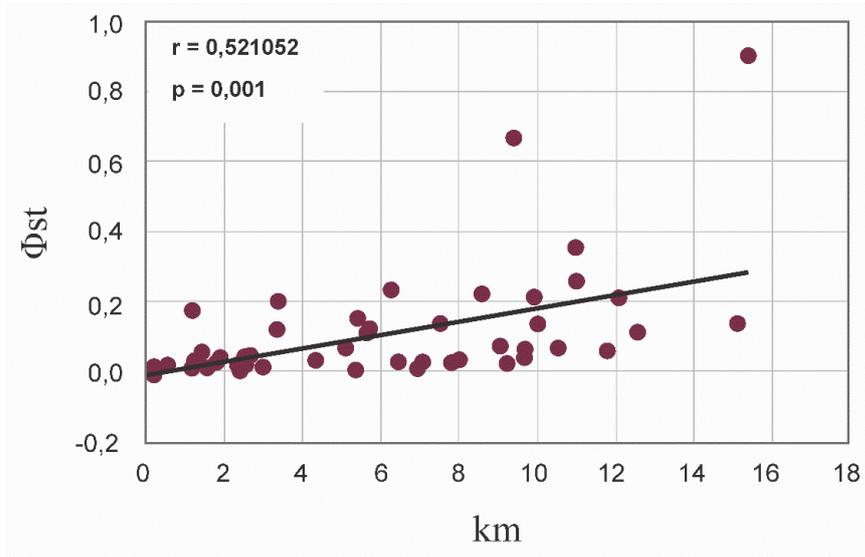
Os valores de divergência genética (R_{ST}) do ponto CN81P foram os mais notáveis, porém esperados. As comparações par-a-par estimaram divergência entre 0.572 e 0.900 (CN81P e CN83S; CN81P e CN86P), confirmando a baixa diversidade genética dentro da estrutura populacional. As estimativas populacionais aqui inferidas confirmam que todos os indivíduos coletados nesse ponto fazem parte de uma linhagem fundada por uma única fêmea fertilizada. Para além do ponto CN81P, os outros dois pontos nos extremos norte e sul também apresentaram altos valores de divergência. Avaliando a correlação das matrizes de diferenciação genética par-a-par e de distância geográfica, teste de Mantel demonstrou correlação moderada e sigficativa ($r = 0,521052$, $p < 0,001$), conforme ilustrado na Figura 16.

Tabela 8. Estimativas par-a-par de divergência genética (R_{ST}) baseadas em sequências MT-CYB de *Triatoma brasiliensis* de 11 locais de coleta do município de Currais Novos. As linhas superiores indicam valores p baseados em 10.000 permutações; as linhas inferiores indicam valores de F_{ST} .

Pops	CN69P	CN71P	CN72S	CN74P	CN76P	CN77S	CN81P	CN83S	CN84P	CN86P	CN87S
CN69P		0.00188	0.20483	0.01772	0.09880	0.10732	10^{-5}	0.09791	0.07385	10^{-4}	0.06900
CN71P	0.41786		0.03109	0.05613	10^{-5}	0.00267	10^{-5}	0.00307	0.05396	10^{-5}	0.00149
CN72S	0.15686	0.26426		0.22780	0.02782	0.10544	10^{-5}	0.00683	0.11712	10^{-5}	0.04920
CN74P	0.31446	0.21218	0.01948		0.00257	0.03782	0.00010	0.00802	0.11514	10^{-4}	0.01307
CN76P	0.07407	0.39909	0.15459	0.27811		0.03911	10^{-5}	0.00079	0.08504	0.00030	0.19018
CN77S	0.08046	0.38818	0.12869	0.27381	0.09428		10^{-5}	0.06346	0.07405	0.01307	0.02505
CN81P	0.86957	0.64444	0.66667	0.68006	0.72031	0.77872		10^{-5}	0.00059	10^{-5}	10^{-5}
CN83S	0.11887	0.33757	0.19114	0.26210	0.16851	0.14175	0.57276		0.46609	10^{-5}	0.00376
CN84P	0.10031	0.24506	0.10299	0.15493	0.09831	0.10881	0.66851	0		0.00089	0.07791
CN86P	0.69565	0.57778	0.52381	0.57445	0.58238	0.42732	0.90000	0.50962	0.55182		10^{-5}
CN87S	0.09159	0.36949	0.12186	0.22391	0.04353	0.10940	0.67361	0.15275	0.08660	0.54290	

(*) Valores significativos ($p < 0,05$) estão em negrito.

Figura 16. Testes de Mantel considerando todos os locais de coleta de *Triatoma brasiliensis*.



A distribuição hierárquica da variação genética foi estimada através de testes AMOVA, onde realizamos quatro testes induzidos e 11 testes de forma randômica sistematizada (Tabela 9; APÊNDICE F). Consideramos como possível agrupamento biologicamente viável os quatro agrupamentos chamados daqui por diante de (i) população Norte 1, incluindo CN81P; (ii) população Norte 2, incluindo CN71P; (iii) população Sul, incluindo CN86P; e (iv) população Central, incluindo CN69P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S). Essa configuração apresentou valores significativos de variação entre grupos (42.50%; $\Phi_{ct} = 0.4250$), entre populações dentro de grupos (9.15%; $\Phi_{sc} = 0.15909$) e dentro de populações (48.35%; $\Phi_{st} = 0.51648$).

Considerando essa configuração populacional, realizamos testes de neutralidade a fim de identificar expansão ou retração das populações definidas pela AMOVA (Tabela 10). Os testes de neutralidade realizados apresentaram valores negativos e significativos ($p > 0.05$) apenas para a população Central, sendo D de Tajima = -2.05189 e F_s de Fu = -12.16600, indicando excesso de polimorfismos de baixa frequência em relação à expectativa, e número excessivo de alelos esperado em uma população com expansão recente, respectivamente (Ashfaq *et al.*, 2014).

Tabela 9. Agrupamentos da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de *Triatoma brasiliensis* com base em sequências MT-CYB, indicando os locais de coleta e as variações percentuais (%) em diversos níveis hierárquicos: entre grupos (Φ_{ct}), entre populações dentro de grupos (Φ_{sc}) e dentro de populações (Φ_{st}), considerando os índices de maior valor com intervalo de confiança significativo ($p > 0,05$) como indicador de agrupamentos geneticamente viáveis. A lista completa dos testes se encontra no APÊNDICE F.

Teste	Agrupamentos	Populações (Pontos de coleta / deme)	Φ_{ct} Entre Grupos			Φ_{sc} Entre Populações Dentro de Grupos			Φ_{st} Dentro de Populações		
			%	Φ_{ct}	p	%	Φ_{sc}	p	%	Φ_{st}	p
1	Todos os pontos de coleta								60,44	0,395	< 10 ⁻⁵ *
2	Por ecótopo	Peridomiciliar (CN69P + CN71P + CN74P + CN76P + CN81P + CN84P + CN86P) Selvagem (CN72S + CN77S + CN83S + CN87S)	-6,36	-0,06355	0,97673	44,05	0,41418	< 10 ⁻⁵ *	62,31	0,37695	< 10 ⁻⁵ *
3	Distribuição geográfica	Norte (CN71P + CN72S + CN81P) Central (CN69P + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S) Sul (CN86P)	14,25	0,14247	0,09693	28,80	0,33580	< 10 ⁻⁵ *	56,96	0,43043	< 10 ⁻⁵ *
4	Localidades de coleta	S, Malhada (CN71P + CN81P) Furna da Onça (CN72S) F, Cacimba da Pedra (CN74P) F, Barra da Areia (CN69P + CN83S + CN84P) S, Morada do Mocó (CN76P + CN77S) B, Paizinho Maria (CN87S) S, Areias de Baixo (CN86P)	60,40	0,00834	0,49059	0,83	0,39093	< 10 ⁻⁵ *	38,77	0,39602	< 10 ⁻⁵ *
7	4	Norte 1 (CN81P) Norte 2 (CN71P) Sul (CN86P) Central (CN69P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)	42,50	0,4250	0,00535*	9,15	0,15909	< 10⁻⁵*	48,35	0,51648	< 10⁻⁵*

Tabela 10. Testes de neutralidade das populações de *Triatoma brasiliensis* com base em sequências de MT-CYB definidas pela AMOVA. Valores significativos ($p > 0,05$) estão em negrito.

Neutralidade e demografia		Grupo de populações			
		Norte 1 (CN81P)	Norte 2 (CN71P)	Central (CN69P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)	Sul (CN86P)
Teste <i>D</i> de Tajima	Tamanho amostral	10	10	70	10
	D de Tajima	0	2.19508	-2.05189	-1.66706
Teste <i>F_s</i> de Fu	Número real de alelos	1	2	21	2
	F _s de Fu	0	6.85861	-12.16600	1.74414

V.II. Genotipagem de SNPs

Foram geradas 132.311.661 sequências a partir de uma biblioteca de 95 amostras (Tabela 5), e após análise de qualidade, as sequências de nove indivíduos foram descartadas levando em consideração o baixo número de sequências geradas (< 100.000), o número muito alto de sequências ou a quantidade de adaptador sequenciado (APÊNDICE G). Dessa forma, as análises seguintes foram realizadas com 86 amostras. O catálogo de *locus* foi construído sem genoma de referência e, baseados nas comparações dos catálogos individuais de cada amostra sequenciada, foram identificados 3.013 SNPs com tamanho padrão de 130 pb. Foram identificadas 1781 variações do tipo transição, sendo as substituições de base pirimidina por outra pirimidina ($C \leftrightarrow T = 872$), de base purina por outra purina ($A \leftrightarrow G = 909$); e 1232 transversões, sendo as substituições $A \leftrightarrow C = 246$, $A \leftrightarrow T = 475$, $C \leftrightarrow G = 243$ e $G \leftrightarrow T = 268$.

Tabela 11. Resultado do sequenciamento de uma biblioteca de 95 amostras em plataforma NextSeq (Illumina).

Dado	Total
Total de bibliotecas geradas	95
Total de sequências	132.311.661
Falha nas leituras filtradas do Illumina	0
<i>Reads</i> de baixa qualidade	669.680
<i>Reads</i> retidas	120.057.084
Bibliotecas remanescentes	86
SNPs identificados	3.013

V.II.I. Análises de *locus* sob seleção

Em conjunto, as análises utilizando os programas PCADAPT e FSTHET nos permitiram identificar 11 *loci* putativamente sob seleção (Tabela 12). As sequências foram confrontadas com bancos de dados utilizados pelo programa Blas2Go para identificação dos *loci* onde foram observadas 11 regiões, das quais sete regiões não retornaram nenhum resultado (Figura 17). Em contrapartida, os quatro *loci* restantes foram de alguma maneira indetificados como proteína hipotética, putativa, não caracterizada ou predita. O único *locus* que retornou resultado com anotação, foi o CLocus_4708 apresentando oito resultados com 96% de cobertura e identidade variando de 42,86% a 45,24% correspondente a um elemento móvel (transposable element; TE) do tipo *jockey-like* identificado na formiga-argentina *Linepithema humile* (Hymenoptera, Formicidae) (Tabela 13). Apesar da similaridade observada com uma sequência do retrotransposon, nossa busca por sequências de elementos móveis *jockey-like* no Repbase e no RepeatMasker não produziu nenhuma sequência repetitiva que apresentasse similaridade com triatomíneos.

Tabela 12. *Loci* putativamente sob seleção, identificando a sequência putativamente de referência (REF) e a variante (VAR), bem como a sequência de nucleotídeos de cada *locus*. Mais informações no APÊNDICE H.

Locus	REF	VAR	Sequência
1007	A	G	TGCAGCCCATAAAGGGCCTCCTTGGGTTTCTTAACGATTTTCACACCATTTCATTCCTATCTTTTCGC TTTCGTCCCTCCACCGCCTACCATCGAGATGAATCAAATCTCCCTCTGCTTTGTCCAGCCATCTTT
1013	G	A	TGCAGAGCAGCCTGGCTATCCGAATAAATGACGACTCTGGAGTAATACTCCCGTCTTCTTTAT TTCGGCGGGCGCAGATAATAATCGCGACTAGCTCCGCCTGAAAGACCGTAGCTAGCGTACCCAGGC
2975	A	C	TGCAGGTCAAGAACAGCGGCAAAACCCCTTTCAAACAGGGGTCAATATACAGTCAAGAACCAGCCG CAACACCTGGACTGTATTTTCTCGTACAAGGCTCAATGTACTCAAAAAGGACCACCTGGTCAC
4708	T	C	TGCAGACGTATTCGGATGATGGGGTAAACTTAATCACAGGGAAGCATCTGAGTGTGGTGGAGCGAC TTGTTGCAGTCGGCGTTATCTTACGTGGAGCAGTGGTGTAGGAATATGGCTTGTCCGTTAACCC
5592	G	A	TGCAGTAAAATGCACTGTGCTTCCACCTGTGTATTTATTATTAAAGGTAGGGAAGGAATTATTATC GTGCGTTGGATTTCACAAAGATAAAGTTCGGGCGGAAACCATCAATGTTACCCTTAGATTTCCCTC
11602	C	T	TGCAGCCTACCCATTGAAGCCTTTTTTGCCAACCCCTTAATGTCTAGTAGTCTAATGACTAGAGC AGAAACGAAATAATGTATTCCCTGACATAAATAACAAGTCCCTGGGATTCTCCAGGCTACGATCATA
13423	A	G	TGCAGGCCAAGAAGTGCAGGCAAAACCCCTTTCAAACAGGGGTCAAGAACACAAGAAGTACAGC CACAAGTTACAAGAACCAGCGCAACACCTGGCCTGTATTTCTCCATACAAGGGTCAAAGTACAC
13996	G	A	TGCAGCACATGCAGCGCCAGTATGCGCTGCCTGGGAAACTTATCACCTTCATCAAGTTGTGCGAA TGGTCCGAAGTGCCAGATAAGCTGCCAGTAAACGCCATAAGTCAATGCATTAAGTCTGAATGAC
15649	T	G	TGCAGAACTCCAAAAACGGTCTACTTGGAGAAGGGGACGACCTAGTGGACGGTGGATCCAGGAT ATGGAAAAGGACTTTACAGCGCTCGGTGTCCAACATTGGAGAAGGAGAGCGCTGTGCATGGAGGA
15983	A	T	TGCAGTTAGCTTGGGCGAGTAGCTGTGGATAAACTTTTTTCGTTTGCCCTCTGGCCTGGAATTTTGA CCCACCATTCCTTGTATCGGTCTGCATCCATAGCATGATGGATGCACTCCTGAGGCACCTTTGAG
25592	G	T	TGCAGGTCAAGAACCAGCGGCAAAACCCCTTTCAAACAGGGGTCAATATACAGTCAAGAACCAGCC GCAACACCTGGGCTGTATTTCTTCATTCAAGGGTCAATGTACTCAAACGGCCACTTGGCCAC

Figura 17. Distribuição dos dados resultantes da busca no programa Blas2Go para identificação dos *loci* putativamente sob seleção.

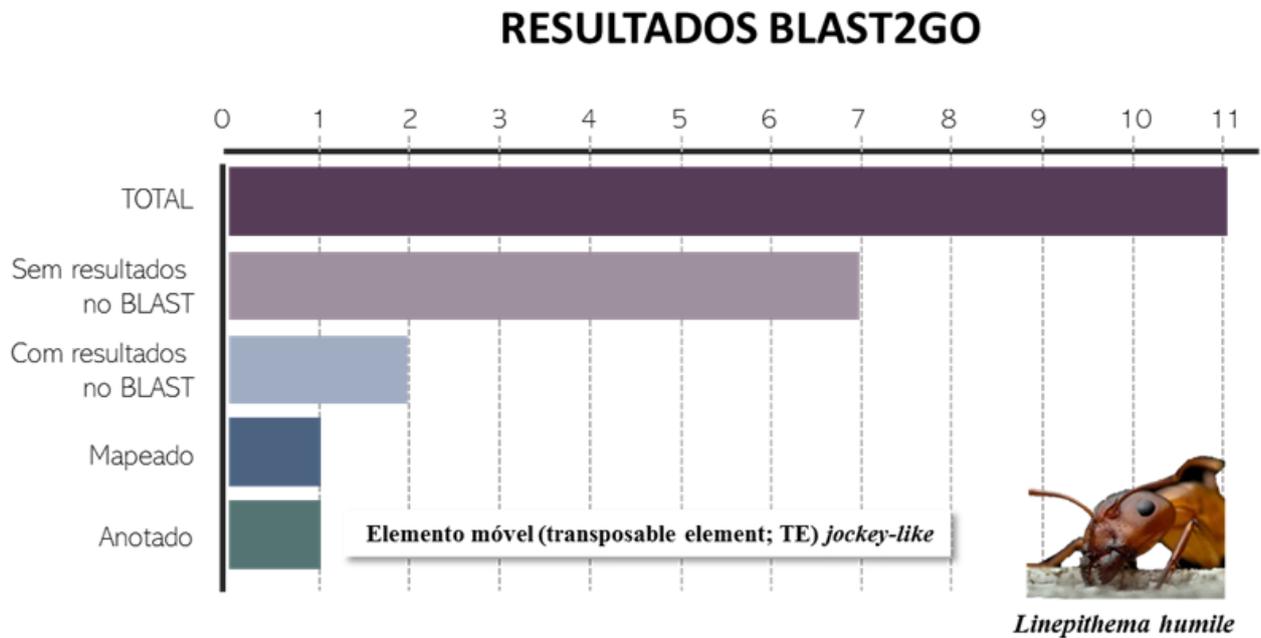


Tabela 13. Resultados da busca no programa Blas2Go para identificação dos *loci* putativamente sob seleção, considerando a descrição dos resultados com maior score de similaridade.

Locus	Hits	BLAST	Mapeamento	Anotação	Descrição
1007	5	Sim	Sim		Proteína de transporte de tricarboxilato putativa
1013	-	-	-	-	-
2975	-	-	-	-	-
4708	18	Sim	Sim	Sim	Elemento móvel (transposable element; TE) <i>jockey-like</i>
5592	-	-	-	-	-
11602	-	-	-	-	-
13423	-	-	-	-	-
13996	19	Sim	-	-	Proteína não caracterizada LOC113520032
15649	3	Sim	-	-	Proteína hipotética COJ52_14372
15983	-	-	-	-	-
25592	-	-	-	-	-

O restante da pesquisa no banco de dados retornou 45 resultados com diferentes índices de similaridade em regiões homólogas de insetos de diferentes ordens (APÊNDICE I). Não houve

nenhuma identificação em indivíduos aparentados à Triatominae; os representantes da Ordem Hemiptera foram *Diaphorina citri* (Subordem Sternorrhyncha), *Bemisia tabaci* (Subordem Sternorrhyncha) e *Laodelphax striatellus* (Subordem Auchenorrhyncha).

V.II.II. Análises de diversidade

As análises de diversidade genética foram realizadas usando os 3.002 *loci* neutros que não foram identificados como valores discrepantes. Dos 516.344 genótipos obtidos, os dados faltantes totalizaram 63.410 (12,28%). As amostras analisadas foram agrupadas de duas formas: quanto à similaridade agrupando os indivíduos em “clusters” (agrupamentos) baseados na análise discriminante dos componentes principais; e quanto à porcentagem de similaridade que cada indivíduo possui com cada população (indivíduo x população).

Na Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), identificamos o número mais provável de aglomerados genéticos como K5, cujos resultados exibiram cinco perfis genéticos sem estrutura ecotípica ou geográfica clara (Figura 18). As amostras atribuídas ao cluster 1 (C1) representaram 71% das amostras ($n = 61$), com distribuição espacial incluindo a única amostra domiciliar (CN75D.1), a totalidade das amostras das populações peridomiciliares CN73P ($n = 2$) e CN77S ($n = 7$), e uma porcentagem considerável de outros pontos amostrados. Os clusters C2, C4 e C5 apresentaram um perfil bastante similar, sendo representados por sete amostras, com apenas uma de origem silvestre em cada cluster. Já o C3 agrupou amostras exclusivamente oriundas do peridomicílio (APÊNDICE J).

A análise de estrutura revelou mistura genética entre quase todas as amostras dentro da distribuição microgeográfica (Figura 19A). No algoritmo de reamostragem de atribuição genética, três das cinco amostras da população externa foram classificadas com uma probabilidade superior a 98% para seus respectivos grupos de referência, levando em consideração a probabilidade de cada amostra pertencer à sua população de referência. Da mesma forma, a amostra domiciliar demonstrou uma probabilidade de 100% de pertencer ao seu cluster designado, assim como uma amostra silvática de CN77S.5. No entanto, para as populações restantes, todas as amostras mostraram uma alta probabilidade ($> 10\%$) de serem migrantes de primeira geração, uma tendência corroborada por valores F_{ST} baixos e estatisticamente não significativos ($p > 0,05$) (Figura 19B).

A Análise de Variância Molecular conduzida em loci neutros, considerando tanto os locais de coleta quanto o ecótopo, não revelou nenhuma estrutura significativa entre populações ou entre grupos de populações. Os valores médios de diversidade genética e endogamia também foram estimados (Tabela 14). A heterozigosidade observada variou de 0,1434 a 0,1659, com um valor médio de $H_O=0,1505$, enquanto a heterozigosidade esperada variou de 0,1561 a 0,1683, com um valor médio de $H_E=0,1625$, todos indicando valores relativamente altos. A média dos coeficientes de endogamia ($F_{IS}=0,0739$) também sugeriu cruzamentos aleatórios entre indivíduos relacionados.

Figura 18. Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) de 86 amostras com base em 3.002 SNPs neutros. A) grupamento das amostras em cinco clusters, indicando os locais de coleta de origem com suas cores pré-definidas. B) Gráfico de barras dos coeficientes de pertencimento dos ecótopos, indicando as cores atribuídas aos clusters; em destaque a amostra CN75D do ecótopo domiciliar.

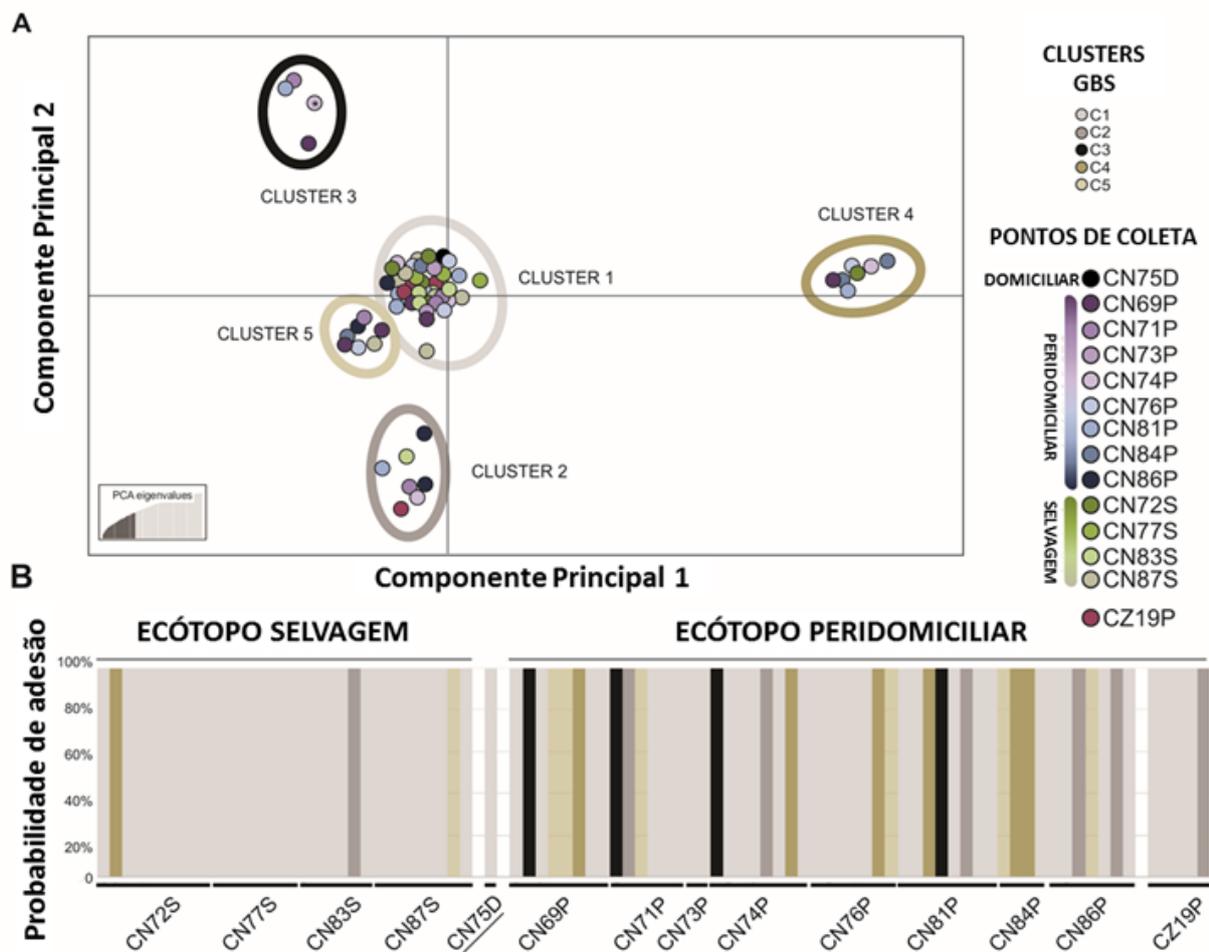


Figura 19. A) Análise estrutural de 86 amostras baseadas em 3.002 SNPs neutros. As cores foram codificadas de acordo com cada local de coleta de Currais Novos (CN) e Cajazeiras (CZ) identificados na legenda das Figura 13. B) Mapa de calor indicando as estimativas de F_{ST} entre locais de coleta, com base nos marcadores SNP neutros.

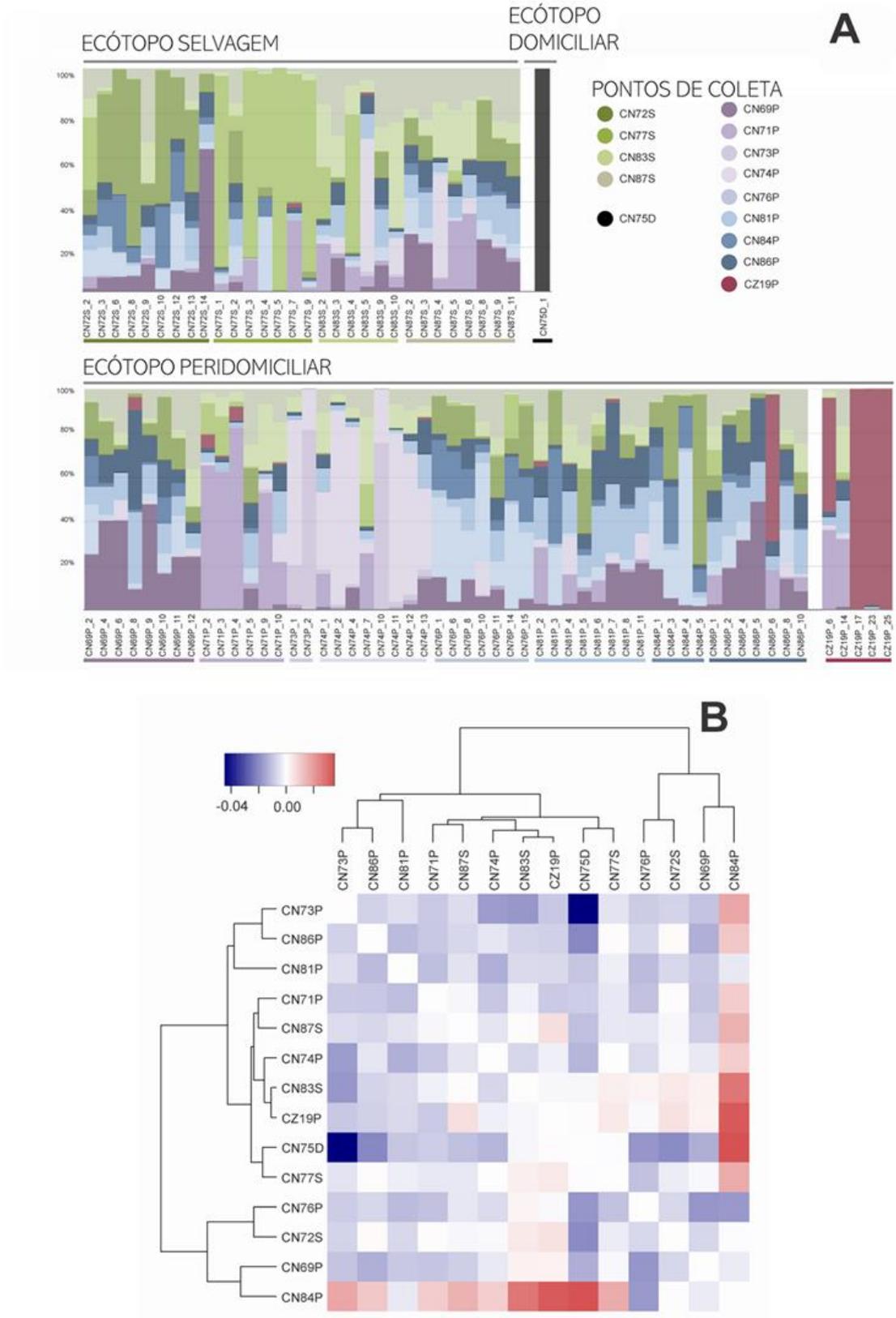


Tabela 14. Estimativas de diversidade genética e endogamia de *Triatoma brasiliensis* de cada ponto de coleta. São indicados os valores dos coeficientes por ponto e médios de endogamia (F_{IS}), heterozigosidade observada (H_O) e heterozigosidade esperada (H_E). N.A. = não analisado.

Pontos de coleta	Alelos	F_{IS}	H_O	H_E
CN69P	4619	0.0500	0.1548	0.1654
CN71P	4370	0.0261	0.1585	0.1660
CN73P	3568	-0.0191	0.1442	0.1627
CN74P	4634	0.0618	0.1492	0.1621
CN75D	3404	N.A.	0.1434	N.A.
CN76P	4485	0.0628	0.1507	0.1637
CN81P	4446	0.0564	0.1495	0.1615
CN84P	4214	-0.0159	0.1659	0.1683
CN86P	4114	0.0879	0.1450	0.1639
CZ19P	4093	0.0360	0.1459	0.1565
CN72S	4518	0.0736	0.1470	0.1617
CN77S	4246	0.0499	0.1461	0.1561
CN83S	3876	0.0430	0.1474	0.1575
CN87S	3586	0.0397	0.1512	0.1593
Média		0.0739	0.1505	0.1625

VI. DISCUSSÃO

Estudos de controle de endemias por infestação de vetores buscam aliados através da determinação de focos naturais e da compreensão de processos demográficos e de diversificação de uma espécie, ou de um complexo de espécies, potencialmente vetores. Os focos de infestação são avaliados pelo fluxo gênico entre sítios geográficos e ecótopos. Devido à alta diversidade de espécies e aos ambientes altamente variáveis no Brasil, cada região possui seu próprio ciclo antropozoonótico estabelecido de forma única. Para entender os ciclos de transmissão da DC, estudos localizados são fundamentais para o conhecimento da epidemiologia da doença como um todo (Ferreira e Silva, 2006; Sarquis *et al.*, 2010; Coura e Junqueira, 2012).

Montes de Oca-Aguilar *et al.* (2022) forneceram *insights* sobre características morfofuncionais e adaptação em vetores da DC ao longo de gradientes natureza-urbanos, lançando luz sobre as interações dinâmicas entre mudanças ambientais e fenótipos de vetores. Os autores enfatizam que os mecanismos microevolutivos observados em populações de insetos vetores adaptados a ambientes humanos diferem daqueles em populações de insetos não sinantrópicos. Isto ocorre, principalmente, porque os humanos criam ambientes favoráveis para a reprodução dos vetores, facilitando também a sua dispersão através do transporte passivo. Além disso, as populações de insetos domiciliários estão sujeitas a medidas de controle de vetores e, frequentemente, sofrem graves gargalos, levando à eliminação local dos habitats antrópicos, pelo menos temporariamente (Monteiro *et al.*, 2018). Para *T. infestans* de áreas andinas bolivianas, Brenière *et al.* (2013) conduziram um estudo para explorar a estrutura genética e identificar a fonte de reinfestação de insetos em várias escalas geográficas. A sua investigação, que empregou análises de microssatélites, revelou variações genéticas significativas, mesmo em escalas geográficas relativamente pequenas. Fitzpatrick *et al.* (2008) propuseram que a colonização de casas por populações venezuelanas de *Rhodnius prolixus* originárias de habitats silvestres próximos ocorre, embora com pouca frequência, como indicado pela variação MT-CYB.

Triatoma brasiliensis se destaca desses modelos pelas características únicas de infestação. Esta espécie é conhecida por formar grandes colônias em todas as faixas de ecótopos, desde ambientes silvestres até domiciliares e peridomiciliares (Lima-Neiva *et al.*, 2021). Além de se adaptar completamente aos habitats antrópicos e apresentar hábitos alimentares ecléticos, esta espécie se alimenta de animais domiciliares e silvestres, além de humanos (Lilioso *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2020).

Neste estudo, apresentamos resultados referentes à estrutura genética de populações de *T. brasiliensis* coletadas em ambientes intradomiciliares, peridomiciliares e naturais dentro de uma região caracterizada por alta pressão de reinfestação após tratamento com inseticidas (Lilioso *et al.*, 2017). A variação genética no MT-CYB foi analisada principalmente para inferir eventos demográficos, enquanto o NGS permitiu uma compreensão mais detalhada da estrutura genética. O trabalho desenvolvido foi o primeiro estudo que estimou o fluxo gênico entre diferentes ecótopos usando um marcador genômico para uma espécie brasileira de triatomíneos. Embora técnicas baseadas em sequenciamento de alto rendimento (HTS) tenham sido aplicadas a *T. brasiliensis*, elas se concentraram, principalmente, na compreensão da expressão gênica diferencial em populações de insetos de ambientes distintos (Marchant *et al.*, 2015, 2016).

VI.I. Análises mitocondriais

A genealogia baseada em MT-CYB revelou uma rede de haplótipos em formato de estrela, indicativa de um cenário clássico de expansão populacional, o que está alinhado com descobertas anteriores para *T. brasiliensis* (Monteiro *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2008; 2016). Esse padrão foi corroborado por testes de neutralidade utilizando D de Tajima e FS de Fu, que indicaram uma expansão dentro do conjunto geral de *T. brasiliensis* do transecto amostrado em Currais Novos. Os resultados da AMOVA demonstraram significância na estruturação das populações com base em sua proximidade com a área central da cidade, especialmente onde a maioria das populações silvestres está localizada.

A ausência de diversidade genética em populações mais distantes da área central da cidade pode ser atribuída à fundação de colônias por pequenas populações originais de uma única linhagem materna, sendo uma indicação de deriva genética, neste caso pelo estabelecimento de uma nova

população por parte de alguns fundadores originais de uma única linhagem materna (Mayr, 1970). Isso pode se aplicar a CN71P e CN86P, mas é particularmente notável na população CN81P (Norte 1) que apresentou haplótipo exclusivo e elevadas estimativas de divergência ($\Phi_{st} = 0,572$ a $0,9$). A população Norte 1 poderia ser iniciada por apenas uma fêmea dispersa carregando ovos, assim como fêmeas voadoras de *T. infestans* fertilizadas e famintas no Chaco argentino (Abraham *et al.*, 2011; Gürtler *et al.*, 2014). Em um estudo transversal realizado por Barreto *et al.* (2019), os autores além de relatarem espécies de triatomíneos com infecção natural por *T. cruzi* em ecótopos intradomiciliares e peridomiciliares (incluindo *T. brasiliensis*), observaram alta prevalência de ninfas capturadas em peridomicílio sem declínio nos anos amostrados. Isto pode estar relacionado à invasão por fêmeas férteis e pode ser um indício de adaptação à ambientes modificados, representando um verdadeiro risco para os humanos por colonização intradomiciliar (Villela *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2007).

No entanto, os testes de Mantel indicaram que a diferenciação observada não foi explicada apenas pelas distâncias geográficas. Os valores positivos de D de Tajima nas populações peridomiciliares indicam uma escassez de alelos raros. Esta observação está alinhada com a ocorrência de contrações populacionais abruptas, possivelmente atribuídas às medidas de controle por pulverização de inseticidas, e sugere a potencial influência da seleção balanceadora (Tajima, 1989). Esta força seletiva pode ter sido seguida por crescimento populacional, especialmente considerando o tamanho substancial dessas populações ($n > 51$ amostras). Considerando a avaliação das estimativas de D de Tajima para avaliar a resistência a inseticidas em mosquitos (Fouet *et al.*, 2018), é essencial a investigação contínua para monitorar o potencial surgimento de resistência a inseticidas, conforme destacado por Sonoda *et al.* (2010).

VI.II. Genotipagem de SNPs

VI.II.I. Loci putativamente sob seleção

Entre os 11 *loci* hipoteticamente sob seleção, identificamos um *locus* anotado similar a um elemento móvel do tipo *jockey* predito na formiga argentina *Linepithema humile*. O elemento *jockey* pertence à ordem LINE de retrotransposons não-LTR e faz parte da superfamília/grupo mais recente de Elementos Transponíveis (TE). Importante notar que os elementos *jockey* são encontrados exclusivamente em Arthropoda (Priimägi *et al.*, 1988; Lynch, 2006; Metcalfe e Casane, 2014; Tambones *et al.*, 2019). Elementos Transponíveis (TEs) são, de fato, difundidos em todos os genomas

eucarióticos e representam uma grande contribuição para a variação do tamanho do genoma. Os TEs podem representar uma porção substancial de um genoma, variando de 4% a 85% e são considerados valiosos em estudos filogenéticos devido à sua capacidade de transposição e sua presença em diversas linhagens, tornando-os indicadores úteis para entender as relações evolutivas (Lynch, 2006; Fablet e Vieira, 2011; Metcalfe e Casane, 2014; Castro *et al.*, 2020).

Nosso esforço para classificar a sequência no *locus* utilizando as ferramentas próprias para busca TEs Repbase (Jurka *et al.*, 2005) e RepeatMasker não retornaram resultados. No entanto, uma busca específica por elementos *jockey* dentro da subfamília Triatominae no Repbase forneceu oito resultados descritos em *R. prolixus*, denominados TE Jockey-1_RPr até Jockey-8_RPr (Bao e Jurka, 2015). Os elementos *jockey* mencionados acima foram recentemente identificados em três espécies do gênero *Rhodnius* após os autores identificarem que os genomas apresentaram uma proporção de TE três a quatro vezes maior do que esperado e sugeriram uma contribuição na diversificação do complexo de espécies (Castro *et al.*, 2020).

A região sob seleção detectada, provavelmente, refere-se à um TE não identificado em espécies de *Triatoma*. Estudos adicionais são necessários para identificar outros TEs no conjunto de dados neutros de GBS e realizar inferências sobre seu papel na especiação. Entre as regiões hipoteticamente sob seleção, algumas correspondem a insetos conhecidos como pragas agrícolas e representam grande preocupação econômica. Da mesma forma, espécies de *Triatoma* devem receber atenção em relação ao conhecimento de seu genoma, dada sua importância epidemiológica.

VI.II.II. Análises de diversidade baseada em *loci* neutros

As populações de Currais Novos exibiram um padrão misto, o que contradiz o padrão de diferenciação genética baseado no MT-CYB. Para o gene mitocondrial, observamos uma estrutura significativa para as populações nos extremos do transecto de coleta CN71P, CN86P e CN81P, esta última compartilhava o mesmo haplótipo de MT-CYB, porém não foram observados sinais de endogamia através do F_{IS} . Como resultado, hipotetizamos que as fêmeas dessas populações peridomiciliares podem ter comportamento de poliandria e estar acasalando com múltiplos machos de várias fontes de invasores. O coeficiente global de endogamia ($F_{IS} = 0,0739$) e o índice de fixação ($F_{ST} = -0,0037$) são consistentes com a baixa estrutura genética e similaridade entre indivíduos de

diferentes ecótopos e locais. Este padrão contrasta com o que foi observado para *T. infestans* nos Andes Bolivianos utilizando microssatélites (Breniere *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2018).

Em contrapartida, as amostras oriundas da região central se agruparam independentemente da origem dos insetos avaliados; inclusive a análise de clusterização não diferenciou efetivamente as populações de Currais Novos do grupo externo em termos de agrupamento. Como resultado, três amostras das populações externas, que estão a 220 km de distância, foram confiavelmente atribuídas ao seu próprio cluster com mais de 98% de probabilidade, distinguindo-se claramente de todas as outras. Esses achados validam nosso protocolo de SNP para avaliar o fluxo gênico em sistemática gama. Surpreendentemente, a amostra domiciliar e um inseto silvestre específico (CN77S.5) foram agrupados em um cluster distinto separado de todos os outros, e essa observação merece investigação adicional com um conjunto de dados maior. Para as amostras restantes coletadas dentro de uma pequena faixa geográfica (dentro de 16 km), houve sinais consistentes de panmixia, independentemente do parâmetro de agrupamento utilizado.

VI.III. Implicações para medidas de controle de vetores

A ausência de estrutura genética populacional (isto é, panmixia) indica migração irrestrita (fluxo gênico) entre ambientes domiciliares e silvestres. Nestes casos, os vetores demonstram tolerância às operações tradicionais de pulverização de inseticidas, uma vez que populações silvestres são inacessíveis. O trabalho de campo que possibilitou que este estudo fosse realizado, ocorreu após campanhas sistemáticas de controle vetorial, que incluíram o novo tratamento das casas após a detecção de infestações. À luz das nossas observações, que indicam a potencial evasão das medidas de controle por pequenas populações de fêmeas em áreas peridomiciliares, recomendamos a implementação de abordagens mais sensíveis para a detecção de vetores. Tais abordagens necessitam aprimorar significativamente a precisão da vigilância após os esforços de tratamento, facilitando o controle sustentado – especialmente no contexto de um potencial de resistência incipiente aos inseticidas. Relativamente a esta última preocupação, é crucial incorporar avaliações dos níveis de resistência nas avaliações de rotina do controle dos vectores. A elevada diversidade genética observada em populações peridomiciliares perto de afloramentos rochosos na área central de Currais Novos implica uma possibilidade exacerbada de rápida reinfestação, possivelmente decorrente de múltiplos eventos de imigração.

Personalizando estratégias de intervenção com modos de ação específicos para estas áreas podem ser essenciais para prevenir o ressurgimento de reinfestações rápidas. Além disso, promover o envolvimento e a educação da comunidade (APÊNDICE K) pode capacitar os residentes para denunciar e abordar prontamente as infestações, como proposto pela Resposta Vetorial da OMS. O padrão de infestação exibido por *T. brasiliensis* exige a integração de soluções inovadoras estratégias no quadro de controle existente, mantendo o potencial para criar um programa de controle de vetores mais resiliente e adaptativo.

VII. CONCLUSÃO

- A diferenciação observada no gene *MT-CYB* provavelmente é resultado de artefatos da amostragem de campo, agravado por eventos demográficos desencadeados por medidas de controle direcionadas a *T. brasiliensis*, ao invés de refletir a diferenciação natural.
- A baixa diversidade haplotípica observada em algumas populações peridomiciliares deve ser levada em consideração ao avaliar as recuperações populacionais após a pulverização de inseticidas.
- A evidência de panmixia local identificada através da abordagem do GBS é apoiada pelos valores baixos e não significativos de FST tanto à escala ecotípica como local. No contexto do local escolhido, nossos resultados também destacam a preocupação epidemiológica colocada por este padrão panmítico, especialmente porque as populações silvestres permanecem fora do alcance das medidas de controle disponíveis.
- Embora não haja nenhuma estrutura geográfica ou ecotípica aparente na escala microgeográfica, validamos nosso protocolo GBS distinguindo com sucesso amostras coletadas a uma distância significativa de nossa área alvo.
- Em nosso conjunto de dados, os resultados indicam que os sinais genéticos de ambos os marcadores são complementares, enfatizando a importância de considerar a natureza e o padrão de herança de cada marcador na compreensão da dinâmica populacional de *T. brasiliensis*.

VIII. REFERÊNCIAS

Abrahan, L.B., Gorla, D.E. & Catalá, S.S. (2011). Dispersal of *Triatoma infestans* and other Triatominae species in the arid Chaco of Argentina: Flying, walking or passive carriage? The importance of walking females. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 106, 232–239.

Agudelo Higueta, N.I., Beatty, N.L., Forsyth, C., Henao-Martínez, A.F., Manne-Goehler, J. on behalf of the US Chagas Research Consortium (2024). Chagas disease in the United States: a call for increased investment and collaborative research. **The Lancet Regional Health – Americas**, 34, 100768.

Akhoundi, M., Sereno, D., Marteau, A., Bruel, C. & Izri, A. (2020). Who Bites Me? A Tentative Discriminative Key to Diagnose Hematophagous Ectoparasites Biting Using Clinical Manifestations. **Diagnostics** 10, 308.

Alevi, K.C.C., de Oliveira, J., Moreira, F.F.F., Jurberg, J., da Rosa, J.A. & de Azeredo-Oliveira, M.T.V. (2015). Chromosomal characteristics and distribution of constitutive heterochromatin in the Matogrossensis and Rubrovaria subcomplexes. **Infection, Genetics and Evolution** 33, 158–162.

Alevi, K.C.C., Guerra, A.L., Imperador, C.H.L., Jurberg, J., Moreira, F.F.F. & Oliveira, M.T.V. de A. (2017). Mitochondrial Gene Confirms the Specific Status of *Triatoma pintodiasi* Jurberg, Cunha, and Rocha, 2013 (Hemiptera, Triatominae), an Endemic Species in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 96, 200–201.

Alevi, K.C.C., Mendonça, P.P., Pereira, N.P., Guerra, A.L., Facina, C.H., da Rosa, J.A. & de Azeredo Oliveira, M.T.V. (2013). Distribution of constitutive heterochromatin in two species of triatomines: *Triatoma lenti* Sherlock and Serafim (1967) and *Triatoma sherlocki* Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata (2002). **Infection, Genetics and Evolution** 13, 301–303.

Alevi, K.C.C., Pinotti, H., De Araújo, R.F., De Azeredo Oliveira, M.T.V., Da Rosa, J.A. & Mendonça, V.J. (2018). Hybrid collapse confirms the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae), an endemic species in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 98, 475–477.

Alevi, K.C.C., Rosa, J.A. & Azeredo-Oliveira, M.T.V. (2014). Cytotaxonomy of the Brasiliensis subcomplex and the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa** 3838, 583.

Allendorf, F.W. (2017). Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. **Molecular Ecology** 26, 420–430.

Almeida, C.E., Faucher, L., Lavina, M., Costa, J., Harry, M., Vinhaes, M.C., De Almeida, J.R., Silveira, A.C., *et al.* (2016). Molecular Individual-Based Approach on *Triatoma brasiliensis*: Inferences on Triatomine Foci, Trypanosoma cruzi Natural Infection Prevalence, Parasite Diversity and Feeding Sources. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 10, 410–417.

Almeida, C.E., Oliveira, H.L., Correia, N., Dornak, L.L.L.L., Gumiel, M., Neiva, V.L.V.L., Harry, M., Mendonça, V.J.V.J., *et al.* (2012). Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. **Acta Tropica** 122, 71–79.

Almeida, C.E., Máximo, M.M., Pires-Silva, D., Takiya, D.M., Valença-Barbosa, C., Viana, M.C., Reigada, C., Iñiguez, A.M., *et al.* (2024). From molecules to ecosystems: Insights into a network of interactions for a Chagas disease outbreak using *Triatoma brasiliensis* as natural samplers. **Acta Tropica** 251, 107107.

Almeida, C.E., Pacheco, R.S., Haag, K., Dupas, S., Dotson, E.M. & Costa, J. (2008). Inferring from the Cyt B gene the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) genetic structure and domiciliary infestation in the State of Paraíba, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 78, 791–802.

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., *et al.* (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature** 290, 457–465.

Aragão, M.B. (1971). Sobre a dispersão do *Triatoma infestans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 5, 183–191.

Ashford, R.W. (2001). When Is a Reservoir Not a Reservoir?. **Emerging Infectious Diseases** 9, 1495–1496.

Avise, J.C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences** 312, 325–342.

Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A. & Johnson, E.A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. **PLoS ONE** 3, e3376.

Bandelt, H.J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16, 37–48.

Bao, W. & Jurka, J. (2015). DNA transposons from the genome of *Rhodnius prolixus*. **Rebase Reports** 15, 3418.

Barbosa-Silva, A.N., Da Câmara, A.C.J., Martins, K., Nunes, D.F., de Oliveira, P.I.C., de Azevedo, P.R.M., Chiari, E. & Galvão, L.M. da C. (2016). Characteristics of triatomine infestation and natural *Trypanosoma cruzi* infection in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 49, 57–67.

Barreto, M.A.F., Cavalcanti, M.A.F., Andrade, C. de M., Nascimento, E.G.C. do. & Pereira, W.O. (2019). Indicadores entomológicos de triatomíneos no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva** 24, 1483–1493.

Batista, V.S.P., Fernandes, F.A., Cordeiro-Estrela, P., Sarquis, O. & Lima, M.M. (2013). Ecotope effect in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) suggests phenotypic plasticity rather than adaptation. **Medical and Veterinary Entomology** 27, 247–254.

- Belay, E.D., Kile, J.C., Hall, A.J., Barton-Behravesh, C., Parsons, M.B., Salyer, S. & Walke, H. (2017). Zoonotic Disease Programs for Enhancing Global Health Security. **Emerging Infectious Diseases** 23, S65–S70.
- Bezerra, C.M., Barbosa, S.E., Souza, R.D.C.M. De., Barezani, C.P., Gürtler, R.E., Ramos, A.N. & Diotaiuti, L. (2018). *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911: Food sources and diversity of *Trypanosoma cruzi* in wild and artificial environments of the semiarid region of Ceará, northeastern Brazil. **Parasites and Vectors** 11, 642.
- Bezerra, C.M., Belisário, C.J., D'Ávila Pessoa, G.C., Rosa, A.C.L., Barezani, C.P., Ferreira, F.C., Ramos, A.N.J., Gürtler, R.E. & Diotaiuti, L. (2020). Microsatellite variation revealed panmictic pattern for *Triatoma brasiliensis* (Triatominae: Reduviidae) in rural northeastern Brazil: the control measures implications. **BMC Genetics** 21, 92.
- Boore, J.L. (1999). Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research** 27, 1767–1780.
- Brand, M.D. (1997). Regulation analysis of energy metabolism. **Journal of Experimental Biology** 200, 193–202.
- Brenière, S.F., Salas, R., Buitrago, R., Brémond, P., Sosa, V., Bosseno, M.-F., Waleckx, E., Depickère, S. & Barnabé, C. (2013). Wild Populations of *Triatoma infestans* Are Highly Connected to Intra-Peridomestic Conspecific Populations in the Bolivian Andes. **PLoS ONE** 8, e80786.
- Campos, M., Conn, J.E., Alonso, D.P., Vinetz, J.M., Emerson, K.J. & Ribolla, P.E.M. (2017). Microgeographical structure in the major Neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* using microsatellites and SNP markers. **Parasites and Vectors** 10, 76.
- Campos, F.F.; de Oliveira, J.; Santos Santana, J.K.; Ravazi, A.; dos Reis, Y.V.; Marson Marquioli, L.; Galvão, C.; de Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Aristeu da Rosa, J.; Alevi, K.C.C. (2024) One Genome, Multiple Phenotypes: Would *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001 (Hemiptera, Triatominae) Be a Valid Species or a Phenotypic Polymorphism of *R. neglectus* Lent, 1954? **Diversity** 16, 472.
- Carbajal de la Fuente, A.L., Minoli, S.A., Lopes, C.M., Noireau, F., Lazzari, C.R. & Lorenzo, M.G. (2007). Flight dispersal of the Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in northeastern Brazil. **Acta Tropica** 101, 115–119.
- Carbajal-de-la-Fuente, A.L., Sánchez-Casaccia, P., Piccinali, R.V., Provecho, Y., Salvá, L., Meli, S., Cano, F., Hernández, R. & Nattero, J. (2022). Urban vectors of Chagas disease in the American continent: A systematic review of epidemiological surveys. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 16, e0011003.
- Castellani, C.A., Longchamps, R.J., Sun, J., Guallar, E. & Arking, D.E. (2020). Thinking outside the nucleus: Mitochondrial DNA copy number in health and disease. **Mitochondrion** 53, 214–223.
- Castro, M.R.J., Goubert, C., Monteiro, F.A., Vieira, C. & Carareto, C.M.A. (2020). Homology-Free Detection of Transposable Elements Unveils Their Dynamics in Three Ecologically Distinct *Rhodnius* Species. **Genes** 11, 170.

- Catchen, J., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A. & Cresko, W.A. (2013). Stacks: An analysis tool set for population genomics. **Molecular Ecology** 22, 3124–3140.
- Catchen, J.M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W. & Postlethwait, J.H. (2011). Stacks: Building and genotyping loci de novo from short-read sequences. **G3: Genes, Genomes, Genetics** 1, 171–182.
- Cator, L.J., Johnson, L.R., Mordecai, E.A., El Moustaid, F., Smallwood, T.R.C., LaDeau, S.L., Johansson, M.A., Hudson, P.J., *et al.* (2020). The Role of Vector Trait Variation in Vector-Borne Disease Dynamics. **Frontiers in Ecology and Evolution** 8, 189.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2021). American Trypanosomiasis - *Trypanosoma cruzi*. **DPDX – Laboratory Identification Of Parasites Of Public Health Concern, Global Health, Division Of Parasitic Diseases And Malaria**.
- Ceccarelli, S., Balsalobre, A., Medone, P., Cano, M.E., Gurgel Gonçalves, R., Feliciangeli, D., Vezzani, D., Wisnivesky-Colli, C., *et al.* (2018). DataTri, a database of American triatomine species occurrence. **Scientific Data** 5, 180071.
- Ceccarelli, S., Balsalobre, A., Vicente, M.E., Curtis-Robles, R., Hamer, S.A., Landa, J.M.A., Rabinovich, J.E. & Marti, G.A. (2022). American triatomine species occurrences: updates and novelties in the DataTri database. **Gigabyte** 2022, 1–14.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 1, 159–218.
- Cleber Galvão. & José Jurberg. (2014). Introdução. In Cleber Galvão (Eds.), **Vetores da doença de chagas no Brasil** (pp. 5–9). Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://static.scielo.org/scielobooks/mw58j/pdf/galvao-9788598203096.pdf>.
- CodonCode Corporation. (2019). CodonCode. www.codoncode.com/aligner.
- Confalonieri, U.E.C. (2010). Emergência de doenças infecciosas humanas: processos ecológicos e abordagens preditivas. **Oecologia Australis** 14, 591–602.
- Costa, J. & Marchon-Silva, V. (1998). Período de intermuda e resistência ao jejum de diferentes populações de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomología y Vectores** 5, 23–24.
- Costa, J. & Felix, M. (2007). *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 102, 87–90.
- Costa, J. & Lorenzo, M. (2009). Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines–Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 104 Suppl, 46–51.
- Costa, J., Barth, O.M., Marchon-Silva, V., De Almeida, C.E., Freitas-Sibajev, M.G.R. & Panzera, F. (1997a). Morphological Studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) Genital Structures and Eggs of Different Chromatic Forms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 92, 493–498.

- Costa, J., Freitas-Sibajev, M.G.R., Marchon-Silva, V., Pires, M.Q. & Pacheco, R.S. (1997b). Isoenzymes Detect Variation in Populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 92, 459–464.
- Costa, J., Ribeiro De Almeida, J., Britto, C., Duarte, R., Marchon-Silva, V. & Pacheco, R.D.S. (1998). Ecotopes, Natural Infection and Trophic Resources of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 93, 7–13.
- Costa, J., Peterson, A.T. & Beard, C. Ben. (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). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 67, 516–520.
- Costa, J., Almeida, C.E., Dujardin, J.P. & Beard, C.B. (2003a). Crossing Experiments Detect Genetic Incompatibility among Populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98, 637–639.
- Costa, J., Almeida, C.E., Dotson, E.M., Lins, A., Vinhaes, M., Silveira, A.C. & Beard, C. Ben. (2003b). The epidemiologic importance of *Triatoma brasiliensis* as a Chagas disease vector in Brazil: a revision of domiciliary captures during 1993-1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98, 443–449.
- Costa, J., Argolo, A.M. & Felix, M. (2006). Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Zootaxa** 47–52.
- Costa, J., Peterson, A.T. & Dujardin, J.P. (2009). Morphological evidence suggests homoploid hybridization as a possible mode of speciation in the Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). **Infection, Genetics and Evolution** 9, 263–270.
- Costa, J., Cordeiro Correia, N., Neiva, V.L., Gonçalves, T.C.M. & Felix, M. (2013). Revalidation and redescription of *Triatoma brasiliensis macromelasoma* Galvão, 1956 and an identification key for the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 108, 785–789.
- Costa, J., Dornak, L.L., Almeida, C.E. & Peterson, A.T. (2014). Distributional potential of the *Triatoma brasiliensis* species complex at present and under scenarios of future climate conditions. **Parasites and Vectors** 7, 238.
- Costa, J., Bargues, M.D., Neiva, V.L., Lawrence, G., Gumiel, M., Oliveira, G., Cabello, P., Lima, M., *et al.* (2016). Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of *Triatoma brasiliensis* species complex. **Infection, Genetics and Evolution** 37, 77–87.
- Costa, J., Neiva, V.L. & Almeida, C.E. (2020). O complexo *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) como modelo de estudo: uma abordagem multidisciplinar e ecoepidemiológica. **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores** (pp. 99–121). Stricto Sensu Editora.

- Costa, J., Dale, C., Galvão, C., Almeida, C.E. & Dujardin, J.P. (2021). Do the new triatomine species pose new challenges or strategies for monitoring Chagas disease? An overview from 1979-2021. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 116, e210015.
- Coura, J.R. (1966). Report on an outbreak of acute Chagas disease in Teutônia, Município de Estrela, Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro.
- Coura, J.R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 102, 113–122.
- Coura, J.R. (2015). The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 110, 277–282.
- Coura, J.R. & Junqueira, A.C. (2012). Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 107, 145–154.
- Coura, J.R. & Viñas, P.A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature** 465, S6–S7.
- Coura, J.R., Viñas, P.A. & Junqueira, A.C. (2014). Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 109, 856–862.
- Dale, C., Almeida, C.E., Mendonça, V.J., Oliveira, J., da Rosa, J.A., Galvão, C., Costa, J., da Rosa, J.A., *et al.* (2018). An updated and illustrated dichotomous key for the Chagas disease vectors of *Triatoma brasiliensis* species complex and their epidemiologic importance. **ZooKeys** 805, 33–43.
- da Silva, N.N., Clausell, D.T., Nolibos, H., de Mello, A.L., Ossanai, J., Rapone, T. & Snell, T. (1968). Epidemic outbreak of Chagas disease probably due to oral contamination. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 10, 265–276.
- Davey, J.W., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M. & Blaxter, M.L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics** 12, 499–510.
- de Alencar, J.E. (1987). História Natural da Doença de Chagas no Estado do Ceará. Fortaleza. Imprensa Universitária da UFC Universidade Federal do Ceará. Imprensa Universitária.
- de Oliveira, J. *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835). Coleção de Triatominae, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp Araraquara. <https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/panstrongylus/panstrongylus-megistus/>. Acesso em 27 de Julho de 2023a.
- de Oliveira, J. *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965. Coleção de Triatominae, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp Araraquara. <https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/psammolestes/psammolestes-tertius/>. Acesso em 30 de Junho de 2023b.
- de Oliveira, J., Ayala, J.M., Justi, S.A., da Rosa, J.A. & Galvão, C. (2018). Description of a new species of *Nesotriatoma* Usinger, 1944 from Cuba and revalidation of synonymy between *Nesotriatoma bruneri* (Usinger, 1944) and *N. flavida* (Neiva, 1911) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Journal of Vector Ecology** 43, 148–157.

de Oliveira, J., da Rosa, J.A. & Alevi, K.C.C. (2021). Chagas Disease Vectors of Espírito Santo, Brazil: First Report of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Triatominae) in the Brazilian State and Development of an Identification Key Based on Cytogenetic Data. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 104, 653–655.

de Paiva, V.F., Ambrozini, L.M. & Pinotti, H. *Triatoma sordida* (Stål, 1859). Coleção de Triatominae, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp Araraquara. <https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/triatoma/triatoma-sordida/>. Acesso em 30 de Junho de 2023.

de Pancorbo, M.M., Castro, A., Fernández-Fernández, I., Cuevas, N., Castillo, M. & Saloña, M. (2004). Molecular identification of arthropods by *cytochrome b* analysis. **International Congress Series** 1261, 398–400.

de Souza, A.L. da S., Multini, L.C., Marrelli, M.T. & Wilke, A.B.B. (2020). Wing geometric morphometrics for identification of mosquito species (Diptera: Culicidae) of neglected epidemiological importance. **Acta Tropica** 211, 105593.

Dias, J., Ramos, A., Gontijo, E., Luquetti, A., Shikanai-Yasuda, A.M., Coura, J.R., Torres, R.M., Melo, J.R., *et al.* (2016). 2 nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 49, 3–60.

Dias-Lima, A.G. & Sherlock, Í.A. (2000). Sylvatic Vectors Invading Houses and the Risk of Emergence of Cases of Chagas Disease in Salvador, State of Bahia, Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 95, 611–613.

Diniz, M.T.M. & Pereira, V.H.C. (2015). Climatologia do estado do Rio Grande do Norte, Brasil: Sistemas atmosféricos atuantes e mapeamento de tipos de clima. **Boletim Goiano de Geografia** 35, 488–506.

DNPM - Departamento Nacional da Produção Mineral. (1981). Jaguaribe/Natal: geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação, uso potencial da terra. Projeto Radambrasil (pp. 740). Rio de Janeiro: Ministério de Minas e Energia.

Dotson, E.M. & Beard, C.B. (2001). Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. **Insect Molecular Biology** 10, 205–215.

Ersts, P.J. (2019). Geographic Distance Matrix Generator. American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Disponível em http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg.

Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources** 10, 564–567.

Eyre, T.A. (2006). The HUGO Gene Nomenclature Database, 2006 updates. **Nucleic Acids Research** 34, D319–D321.

Fablet, M. & Vieira, C. (2011). Evolvability, epigenetics and transposable elements. **BioMolecular Concepts** 2, 333–341.

- Falcone, R. & Nascimento, J.D. *Rhodnius neglectus* Lent, 1954. Coleção de Triatominae, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp Araraquara. <https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/rhodnius/rhodnius-neglectus/>. Acesso em 30 de Junho de 2023.
- Fernandes, A.J., Diotaiuti, L., Dias, J.C.P., Romanha, Á.J. & Chiari, E. (1994). Inter-relações entre os ciclos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** 10, 473–480.
- Ferreira, I.D.L.M. & Silva, T.P.T.E. (2006). Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: An historical fact. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39, 507–509.
- Ferreira, L.F., Britto, C., Cardoso, M.A., Fernandes, O., Reinhard, K. & Araújo, A. (2000). Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. **Acta Tropica** 75, 79–84.
- Fitzpatrick, S., Feliciangeli, M.D., Sanchez-Martin, M.J., Monteiro, F.A. & Miles, M.A. (2008). Molecular Genetics Reveal That Silvatic *Rhodnius prolixus* Do Colonise Rural Houses. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 2, e210.
- Flanagan, S.P. & Jones, A.G. (2017). Constraints on the FST–Heterozygosity Outlier Approach. **Journal of Heredity** 108, 561–573.
- Florêncio, W.G., de Oliveira Meneguetti, D.U., Ceretti Junior, W., Toledo Marrelli, M., da Rosa, J.A. & de Oliveira, J. (2023). *Triatoma jatai* Gonçalves *et al.*, 2013 (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae: Triatominae): new occurrence for the state of Ceará, Brazil. **Revista Chilena De Entomología** 49, 227–230.
- Forattini, O.P., Ferreira, O.A., Rocha e Silva, E.O. da. & Rabello, E.X. (1979). Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana: XIV - Persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em região de intensa atividade agropecuária. **Revista de Saúde Pública** 13, 123–146.
- Forero, D. (2008). The systematics of the Hemiptera. **Revista Colombiana de Entomología** 34, 1–21.
- Fouet, C., Atkinson, P. & Kamdem, C. (2018). Human Interventions: Driving Forces of Mosquito Evolution. **Trends in Parasitology** 34, 127–139.
- Freitas, A.L.C., Freitas, S.P.C., Gonçalves, T.C.M. & Lima Neto, A.S. (2007). Vigilância entomológica dos vetores da doença de Chagas no município de Farias Brito, estado do Ceará – Brasil. **Cadernos de Saúde Coletiva** 15, 231–240.
- Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** 147, 915–925.
- Galvão, C. (2014). **Vetores da doença de chagas no Brasil (pp. 5–9)**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://static.scielo.org/scielobooks/mw58j/pdf/galvao-9788598203096.pdf>.

Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha, D.D.A.S. & Jurberg, J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa** 202, 1–36.

Galvão, C. & Gurgel-Gonçalves, R. (2014). Vetores conhecidos no Brasil. In Cleber Galvão (Eds.), **Vetores da doença de chagas no Brasil** (pp. 88–170). Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://static.scielo.org/scielobooks/mw58j/pdf/galvao-9788598203096.pdf>.

Galvão, C. & Justi, S.A. (2015). An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Tropica** 151, 116–125.

Galvão, C. & Paula, A.S. de. (2014). Sistemática e evolução dos vetores. In Cleber Galvão (Eds.), **Vetores da doença de chagas no Brasil** (pp. 26–32). Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://static.scielo.org/scielobooks/mw58j/pdf/galvao-9788598203096.pdf>.

Garcia, E.S. (2009). Arthur Neiva - Informações sobre a biologia do *Conorhinus megistus* Burm e Contribuição do Artigo de Arthur Neiva (1910) para a Biologia dos Hemiptera, Subfamília Triatominae, Família Reduviidae. In Carvalheiro, J. da R., Azevedo, N., Araújo-Jorge, T.C. de, *et al.* (Eds.), **Clássicos em Doença de Chagas: histórias e perspectivas no centenário da descoberta** (pp. 131–148). Editora FIOCRUZ.

Geer, D. (1773). Mémoires pour servir à l’histoire des Insectes. **Vec Stockholm** 1, 448 pp.

Gonçalves, T.C.M. & Costa, J. (2017). Morfologia. **Portal da Doença de Chagas - Vice Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas**. <https://chagas.fiocruz.br/vetor/morfologia/>.

Gorla, D.E., Xiao-Nong, Z., Diotaiuti, L., Khoa, P.T., Waleckx, E., Souza, R. de C.M. de., Qin, L., Lam, T.X. & Freilij, H. (2022). Different profiles and epidemiological scenarios: past, present and future. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 117, e200409.

Gorla, D. & Noireau, F. (2017). Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In Telleria, J. & Tibayrenc, M. (Eds.), **American Trypanosomiasis Chagas Disease** (pp. 197–221). Elsevier.

Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talon, M., *et al.* (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research** 36, 3420–3435.

Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F. & Dumonteil, E. (2012). Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity** 108, 190–202.

Grazia, J.; Takiya, D.M.; Wolff, V.R.S.; Schwertner, C.F.; Mejdalani, G.; Cavichioli, R.R.; Peronti, A.L.B.G.; Queiroz, D.L.; Burckhardt, D.; Fernandes, J.A.M.; Moreira, F.F.F.; Gil-Santana, H.R.; Ferreira, P.S.F.; Carrenho, R.; Brugnera, R.; Guidoti, M. (2024). Cap. 25, Hemiptera Linnaeus, 1758, pp. 368-456. In: Rafael, J.A.; Melo, G.A.R.; Carvalho, C.J.B. de; Casari, S. & Constantino, R. (eds). *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. 2ª ed. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus. 880 pp.

Grilli, S., Galizi, R. & Taxiarchi, C. (2021). Genetic Technologies for Sustainable Management of Insect Pests and Disease Vectors. **Sustainability** 13, 5653.

- Groom, Z., Protopapas, A.D. & Zochios, V. (2017). Tropical diseases of the myocardium: a review. **International Journal of General Medicine** 10, 101–111.
- Guarneri, A.A., Carvalho, M. das G., Pereira, M.H. & Diotaiuti, L. (2000). Potencial biológico do *Triatoma brasiliensis*. **Cadernos de Saúde Pública** 16, S101–S104.
- Gubler, D.J. (2009). Vector-borne diseases. **Revue Scientifique et Technique** 28, 583–588.
- Gurgel-Gonçalves, R. & Cuba, C.A.C. (2009). Predicting the Potential Geographical Distribution of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Reduviidae) Based on Ecological Niche Modeling. **Journal of Medical Entomology** 46, 952–960.
- Gurgel-Gonçalves, R., Galvão, C., Costa, J. & Peterson, A.T. (2012). Geographic Distribution of Chagas Disease Vectors in Brazil Based on Ecological Niche Modeling. **Journal of Tropical Medicine** 2012, 1–15.
- Gürtler, R.E. & Yadon, Z.E. (2014). Eco-bio-social research on community-based approaches for Chagas disease vector control in Latin America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 109, 91–98.
- Hamilton, P.B. & Stevens, J.R. (2017). Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. **American Trypanosomiasis Chagas Disease** (pp. 321–344). Elsevier.
- Harris, A.M. & DeGiorgio, M. (2017). An Unbiased Estimator of Gene Diversity with Improved Variance for Samples Containing Related and Inbred Individuals of any Ploidy. **G3 Genes Genomes Genetics** 7, 671–691.
- Heather, J.M. & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics** 107, 1–8.
- Hernandez-Castro, L.E., Paterno, M., Villacís, A.G., Andersson, B., Costales, J.A., Noia, M. De., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C.A., *et al.* (2017). 2b-RAD genotyping for population genomic studies of Chagas disease vectors: *Rhodnius ecuadoriensis* in Ecuador. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 11, e0005710.
- HGNC Database. (2009). **HUGO Gene Nomenclature Committee** (HGNC).
- Horstick, O., Tozan, Y. & Wilder-Smith, A. (2015). Reviewing Dengue: Still a Neglected Tropical Disease?. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 9, e0003632.
- Illumina. (2017). Calculating Percent Passing Filter for Patterned and Nonpatterned Flow Cells. **Technical Note: Informatics**. <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/hiseq-x-percent-pf-technical-note-770-2014-043.pdf>.
- Illumina. (2021). NextSeq 550 System Guide. https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/translations/nextseq-550-system-guide-15069765-ptb.pdf.
- Illumina. (2022). NextSeq™ 550 System - Tunable sequencing output and array scanning on a single instrument. **Specification Sheet**.

assets/marketing-literature/nextseq-550-system-spec-sheet-m-gl-01298/nextseq-550-system-spec-sheet-m-gl-01298.pdf.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2021). Cidades@ - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/currais-novos/panorama>.

Irish, A., Whitman, J.D., Clark, E.H., Marcus R., Bern C. (2022). Updated Estimates and Mapping for Prevalence of Chagas Disease among Adults, United States. **Emerg Infect Dis** 28, 1313–1320.

James, S. & Santos, M. (2023). The Promise and Challenge of Genetic Biocontrol Approaches for Malaria Elimination. **Trop. Med. Infect. Dis.** 8, 201.

Jansen, A.M., Xavier, S.C. das C. & Roque, A.L.R. (2020). Landmarks of the Knowledge and *Trypanosoma cruzi* Biology in the Wild Environment. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 10, 10.

Johnson, K.P., Dietrich, C.H., Friedrich, F., Beutel, R.G., Wipfler, B., Peters, R.S., Allen, J.M., Petersen, M., *et al.* (2018). Phylogenomics and the evolution of hemipteroid insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 115, 12775–12780.

Jolliffe, I.T. & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences** 374, 20150202.

Jombart, T. & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics** 27, 3070–3071.

Jurberg, J., Galvão, C., Santos, C.M. dos. & Rangel, M.B.A. (2008). Descrição de ovos e estádios ninfais de *Triatoma carcavalloei* (Hemiptera, Reduviidae) por meio de microscopia óptica. **Iheringia. Série Zoologia** 98, 441–446.

Jurberg, J., Galvão, C., Weirauch, C. & Moreira, F.F.F. (2015). Hematophagous Bugs (Reduviidae, Triatominae). In Antônio R. Panizzi & Jocélia Grazia (Eds.), **True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics. Entomology in Focus** (pp. 353–393). Dordrecht: Springer.

Jurberg, J., Gonçalves, T.C.M., Costa, J.M. & Souza, W. de. (1986). Contribuição ao estudo morfológico de ovos e ninfas de *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 81, 111–120.

Jurberg, J., Rodrigues, J.M.S., Moreira, F.F.F., Dale, C., Cordeiro, I.R.S., Lamas Jr, V.D., Galvão, C. & Rocha, D.S. (2014). Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil (Vetores da Doença de Chagas). Rio de Janeiro: **Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos - Instituto Oswaldo Cruz**.

Jurka, J., Kapitonov, V.V., Pavlicek, A., Klonowski, P., Kohany, O. & Walichiewicz, J. (2005). Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research** 110, 462–467.

Justi, S.A., Cahan, S., Stevens, L., Monroy, C., Lima-Cordón, R. & Dorn, P.L. (2018). Vectors of diversity: Genome wide diversity across the geographic range of the Chagas disease vector *Triatoma*

dimidiata sensu lato (Hemiptera: Reduviidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 120, 144–150.

Justi, S.A. & Dale, C. (2021). Designation of the neotype of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), with full integrated redescription including mitogenome and nuclear ITS-2 sequences. **ZooKeys** 1076, 9–24.

Kamimura, E.H., Viana, M.C., Lilio, M., Fontes, F.H.M.M., Pires-Silva, D., Valença-Barbosa, C., Carbajal-De-La-Fuente, A.L., Folly-Ramos, E., *et al.* (2020). Drivers of molecular and morphometric variation in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Triatominae): The resolution of geometric morphometrics for populational structuring on a microgeographical scale. **Parasites & Vectors** 13, 455.

Kamvar, Z.N., Tabima, J.F. & Grünwald, N.J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. **PeerJ** 2, e281.

Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W. & Prodöhl, P.A. (2013). An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in Ecology and Evolution** 4, 782–788.

Kirk, H. & Freeland, J.R. (2011). Applications and Implications of Neutral versus Non-neutral Markers in Molecular Ecology. **International Journal of Molecular Sciences** 12, 3966–3988.

Kropf, S.P. & Sá, M.R. (2009). The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos** 16, 13–34.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33, 1870–1874.

Ladoukakis, E.D. & Zouros, E. (2017). Evolution and inheritance of animal mitochondrial DNA: rules and exceptions. **Journal of Biological Research-Thessaloniki** 24, 2.

Lainson, R., Shaw, J.J. & Naiff, R.D. (1980). Chagas' disease in the Amazon: speculations on transmission per os. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 22, 294–297.

Lazzari, C.R. (2014). Biologia e Comportamento. In Galvão, C. (Eds.), **Vetores da Doença de Chagas no Brasil** (pp. 64–74). Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://static.scielo.org/scielobooks/mw58j/pdf/galvao-9788598203096.pdf>.

Lehane, M.J., McEwen, P.K., Whitaker, C.J. & Schofield, C.J. (1992). The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. **Acta Tropica** 52, 27–38.

Leite, G.R., dos Santos, C.B. & Falqueto, A. (2011). Influence of the landscape on dispersal of sylvatic triatomines to anthropic habitats in the Atlantic Forest. **Journal of Biogeography John Wiley & Sons, Ltd** 38, 651–663. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02442.x>.

Lent, H. & Wygodzinsky, P.W. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and Their Significance as Vectors of Chagas' Disease. **American Museum of Natural History** 163, 125–520.

- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J. & Sandri, T.L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in Public Health** 7, 166.
- Li, H., Leavengood, J.M., Chapman, E.G., Burkhardt, D., Song, F., Jiang, P., Liu, J., Zhou, X. & Cai, W. (2017). Mitochondrial phylogenomics of Hemiptera reveals adaptive innovations driving the diversification of true bugs. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 284, 20171223.
- Lilioso, M., Folly-Ramos, E., Rocha, F.L., Rabinovich, J., Capdevielle-Dulac, C., Harry, M., Marcet, P.L., Costa, J. & Almeida, C.E. (2017). High *Triatoma brasiliensis* densities and *Trypanosoma cruzi* prevalence in domestic and peridomestic habitats in the State of Rio Grande do Norte, Brazil: The source for Chagas disease outbreaks?. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 96, 1456–1459.
- Lima-Neiva, V., Toma, H.K., Abrantes Aguiar, L.M., Lopes, C.M., Dias, L.P., Monte Gonçalves, T.C. & Costa, J. (2021). The connection between *Trypanosoma cruzi* transmission cycles by *Triatoma brasiliensis brasiliensis*: A threat to human health in an area susceptible to desertification in the Seridó, Rio Grande do Norte, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 15, e0009919.
- Lima, V.S., Iniguez, A.M., Otsuki, K., Ferreira, L.F., Araújo, A., Vicente, A.C.P. & Jansen, A.M. (2008). Chagas Disease in Ancient Hunter-Gatherer Population, Brazil. **Emerging Infectious Diseases** 14, 1001–1002.
- Lucena, D.T.D. (1970). Estudo sobre a Doença de Chagas no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais** 22, 3–173.
- Luu, K., Bazin, E. & Blum, M.G.B. (2017). pcadapt: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. **Molecular Ecology Resources** 17, 67–77.
- Lyman, D.F., Monteiro, F.A., Escalante, A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D.M., Dujardin, J.P. & Beard, C.B. (1999). Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 60, 377–386.
- Lynch, M. (2006). The Origins of Eukaryotic Gene Structure. **Molecular Biology and Evolution** 23, 450–468.
- MacCarthy, C. (1998). Chromas. Southport, Queensland, Australia: School of Health Science, Griffith University, Gold Coast Campus.
- Magori, K. & Drake, J.M. (2013). The Population Dynamics of Vector-borne Diseases. **Nature Education Knowledge** 4, 14.
- Manne-Goehler, J., Umeh, C.A., Montgomery, S.P., Wirtz, V.J. (2016). Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. **PLoS Negl Trop Dis** 10(11): e0005033.
- Marchant, A., Mougel, F., Almeida, C., Jacquín-Joly, E., Costa, J. & Harry, M. (2015). De novo transcriptome assembly for a non-model species, the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis*, a vector of Chagas disease. **Genetica** 143, 225–239.

Marchant, A., Mougél, F., Jacquín-Joly, E., Costa, J., Almeida, C.E. & Harry, M. (2016). Under-Expression of Chemosensory Genes in Domiciliary Bugs of the Chagas Disease Vector *Triatoma brasiliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 10, e0005067.

Mayr, E. (1970). Populations, Species, and Evolution: An Abridgment of Animal Species and Evolution. **Cambridge, MA: Harvard University Press.**

McCallum, H. & Dobson, A. (2002). Disease, habitat fragmentation and conservation. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 269, 2041–2049.

McEwen, P.K. & Lehane, M.J. (1994). Relationships between flight initiation and oviposition in *Triatoma infestans* (Klug) (Hem., Reduviidae). **Journal of Applied Entomology** 117, 217–223.

Mendes-Sousa, A.F., Araújo, L.D.N. de., Sousa, S.S. de., Alencar, S. de C., Sousa Júnior, W.A. de., Sousa, L.M. de., Rocha, S.M. da., Maia, J.C. da S., *et al.* (2020). Triatomine bugs (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the Domiciles of the Guaribas Valley Territory, in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 53, e20200177.

Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Medeiros, L.M. de O., Nascimento, J.D., de Azeredo-Oliveira, M.T.V. & da Rosa, J.A. (2014). Cytogenetic and morphologic approaches of hybrids from experimental crosses between *Triatoma lenti* Sherlock & Serafim, 1967 and *T. sherlocki* Papa *et al.*, 2002 (Hemiptera: Reduviidae). **Infection, Genetics and Evolution** 26, 123–131.

Mendonça, V.J., Alevi, K.C.C., Pinotti, H., Gurgel-Gonçalves, R., Pita, S., Guerra, A.L., Panzera, F., De Araújo, R.F., *et al.* (2016). Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. **Zootaxa** 4107, 239–254.

Mendonça, V.J., Da Silva, M.T.A., De Araújo, R.F., Martins, J., Bacci, M., Almeida, C.E., Costa, J., Graminha, M.A.S. *et al.* (2009). Phylogeny of *Triatoma sherlocki* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) inferred from two mitochondrial genes suggests its location within the *Triatoma brasiliensis* complex. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 81, 858–864.

Metcalf, C.J. & Casane, D. (2014). Modular organization and reticulate evolution of the ORF1 of *Jockey* superfamily transposable elements. **Mobile DNA** 5, 19.

Miles, M.A. (2003). American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **BMJ** 326, 1444–1448.

Ministério da Defesa. (2021). Manual de abreviaturas, siglas, símbolos e convenções cartográficas das Forças Armadas. Disponível em: <https://www.gov.br/defesa/pt-br/arquivos/File/legislacao/emcfa/publicacoes/manual-md33-m-02-manual-de-abreviaturas-siglas-simbolos-e-convencoes-cartograficas.pdf>.

Ministério da Saúde. (2016). Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses: normas técnicas e operacionais. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Ministério da Saúde.** Disponível em https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_prevencao_controle_zoonoses.pdf.

Ministério da Saúde. (2022). Mortalidade por doença de Chagas (2010 a 2019). **Ministério da Saúde**. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas/arquivos/mortalidade-por-doenca-de-chagas-2010-a-2019.pdf/view>

Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R.S., Donath, A., Mayer, C., Frandsen, P.B., Ware, J., *et al.* (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. **Science** 346, 763–767.

Monsalve-Lara, J., Lilioso, M., Valença-Barbosa, C., Thyssen, P.J., Miguel, D.C., Limeira, C., Gadelha, F.R., Fontes, F.V.H.M., *et al.* (2021). The risk of oral transmission in an area of a Chagas disease outbreak in the Brazilian northeast evaluated through entomological, socioeconomic and schooling indicators. **Acta Tropica** 215, 105803.

Monteiro, F.A., Barrett, T. V., Fitzpatrick, S., Cordon-Rosales, C., Feliciangeli, D. & Beard, C.B. (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Molecular Ecology** 12, 997–1006.

Monteiro, F.A., Donnelly, M.J., Beard, C.B. & Costa, J. (2004). Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 32, 46–56.

Monteiro, F.A., Weirauch, C., Felix, M., Lazoski, C. & Abad-Franch, F. (2018). Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. **Advances in Parasitology** 99, 265–344.

Montes de Oca-Aguilar, A.C., González-Martínez, A., Chan-González, R., Ibarra-López, P., Smith-Ávila, S., Córdoba-Aguilar, A. & Ibarra-Cerdeña, C.N. (2022). Signs of Urban Evolution? Morpho-Functional Traits Co-variation Along a Nature-Urban Gradient in a Chagas Disease Vector. **Frontiers in Ecology and Evolution** 10, 805040.

Moritz, C., Dowling, T.E. & Brown, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 18, 269–292.

Nascimento, M.A.L. do. & Ferreira, R.V. (2012). Geoparque Seridó (RN): proposta. In Schobbenhaus, C. & Silva, Cassio Roberto da (Eds.), **Geoparques do Brasil: propostas** (pp. 361–416). CPRM - Serviço Geológico do Brasil. <https://rigeo.cprm.gov.br/handle/doc/1209>. Acesso em 5 de Julho de 2022.

Nascimento, J.D., Da Rosa, J.A., Salgado-Roa, F.C., Hernández, C., Pardo-Díaz, C., Alevi, K.C.C., Ravazi, A., De Oliveira, J., *et al.* (2019). Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa *et al.*, 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species?. **PLoS ONE** 14, e0211285.

National Academy of Sciences. (2008). Vector-borne diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections. Washington, D.C.

Neafsey, D.E., Lawniczak, M.K.N., Park, D.J., Redmond, S.N., Coulibaly, M.B., Traoré, S.F., Sagnon, N., Costantini, C., *et al.* (2010). SNP Genotyping Defines Complex Gene-Flow Boundaries Among African Malaria Vector Mosquitoes. **Science** 330, 514–517.

- Nei, M. (1986). Definition and Estimation of Fixation Indices. **Evolution** 40, 643.
- Neiva, A. (1910). Informações sobre a biologia do *Conorhinus megistus* Burm. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 2, 206–212.
- Oliveira Correia, J.P.S., Gil-Santana, H.R., Dale, C. & Galvão, C. (2022). *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky Is a Junior Synonym of *Triatoma williami* Galvão, Souza and Lima. **Insects** 13, 591.
- Oliveira, J., Marcet, P.L., Takiya, D.M., Mendonça, V.J., Belintani, T., Bargues, M.D., Mateo, L., Chagas, V., *et al.* (2017). Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the Brasiliensis subcomplex. **Acta Tropica** 170, 140–148.
- Oliveira-Correia, J.P.S.; Gil-Santana, H.R.; Dale, C.; Galvão, C. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky Is a Junior Synonym of **Triatoma williami** Galvão, Souza and Lima. (2022). **Insects**, 13, 591.
- Oliveira-Correia, J.P.S., de Oliveira, J., Gil-Santana, H.R. et al. Taxonomic reassessment of *Rhodnius zeledoni* Jurberg, Rocha & Galvão: a morphological and morphometric analysis comparing its taxonomic relationship with *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto. (2024). **BMC Zool** 9, 6.
- Organização Mundial de Saúde - World Health Organization. (2012). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-975>
- Organização Mundial de Saúde - World Health Organization. (2017). Global vector control response 2017–2030. **Control of Neglected Tropical Diseases (NTD), Global Malaria Programme (GMP), High Impact Epidemics (EHI), Vector Control and Resistance**. Geneva. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/9789241512978>
- Organização Mundial de Saúde - World Health Organization. (2018). Chagas Disease in the Americas: A Review of the Current Public Health Situation and a Vision for the Future. **Report: Conclusions and Recommendations**. Washington, D.C. Disponível em <https://www.who.int/publications/i/item/Chagas-Disease-in-the-Americas-conclusions-recommendations-2018>.
- Organização Mundial de Saúde - World Health Organization. (2022). Onchocerciasis. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/onchocerciasis>.
- Organização Mundial de Saúde - World Health Organization. (2023). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). Disponível em [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- Panfilio, K.A. & Angelini, D.R. (2018). By land, air, and sea: hemipteran diversity through the genomic lens. **Current Opinion in Insect Science** 25, 106–115.
- Panizzi, A.R. & Grazia, J. (2015). Introduction to True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics. In Panizzi, A.R. & Grazia, J. (Eds.), **True Bugs (Heteroptera) of the Neotropics. Entomology in Focus** (pp. 3–20). Springer, Dordrecht.

Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M. & Steinlechner, M. (2000). Species identification by means of the *cytochrome b* gene. **International Journal of Legal Medicine** 114, 23–28.

Paschoaletto, L., Dale, C., Lima-Neiva, V., Carbajal-de-la-Fuente, A.L., de Oliveira, J., Benítez, H.A. & Costa, J. (2022). Morphological Stasis in Time? A *Triatoma brasiliensis brasiliensis* Study Using Geometric Morphometrics in the Long Run. **Animals** 12, 1362.

Pathirage, D.R.K., Weeraratne, T.C., Senanayake, S.C., Karunaratne, S.H.P.P. & Karunaweera, N.D. (2021). Genetic diversity and population structure of *Phlebotomus argentipes*: Vector of *Leishmania donovani* in Sri Lanka. **PLoS ONE** 16, e0256819.

Pérez-Molina, J.A. & Molina, I. (2018). Chagas disease. **The Lancet** 391, 82–94.

Pinotti, H. & Ambrozini, L. *Triatoma pseudomaculata* (Correia e Espínola, 1964). Coleção de Triatominae, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp Araraquara. <https://www2.fcfa.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/triatoma/triatoma-pseudomaculata/>. Acesso em 30 de Junho de 2023.

Pinotti, H., de Oliveira, J., Ravazi, A., Madeira, F.F., dos Reis, Y.V., de Oliveira, A.B.B., de Azeredo-Oliveira, M.T.V., da Rosa, J.A. & Alevi, K.C.C. (2021). Revisiting the hybridization processes in the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera, Triatominae): Interspecific genomic compatibility point to a possible recent diversification of the species grouped in this monophyletic complex. **PLoS ONE** 16, e0257992.

Pita, S., Lorite, P., Nattero, J., Galvão, C., Alevi, K.C.C., Teves, S.C., Azeredo-Oliveira, M.T.V. & Panzera, F. (2016). New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution** 43, 225–231.

Poinar, G. (2019). A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. **Cretaceous Research** 93, 90–97.

Poland, J.A., Brown, P.J., Sorrells, M.E. & Jannink, J.-L. (2012). Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. **PLoS ONE** 7, e32253.

Priimägi, A.F., Mizrokhi, L.J. & Ilyin, Y. V. (1988). The *Drosophila* mobile element *jockey* belongs to LINEs and contains coding sequences homologous to some retroviral proteins. **Gene** 70, 253–262.

Ramos, L.J., Souza, J.L. de., Souza, C.R. de., Oliveira, J. de., Rosa, J.A. da., Camargo, L.M.A., Cunha, R.M. da. & Meneguetti, D.U. de O. (2018). First report of *Triatoma sordida* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the State of Acre and Brazilian Western Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 51, 77–79.

R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: **R Foundation for Statistical Computing**.

Ribeiro, G., dos Santos, C.G.S., Lanza, F., Reis, J., Vaccarezza, F., Diniz, C., Miranda, D.L.P., de Araújo, R.F., *et al.* (2019). Wide distribution of *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines in the State of Bahia, Brazil. **Parasites & Vectors** 12, 604.

Ribeiro-Jr, G., Abad-Franch, F., de Sousa, O.M.F., dos Santos, C.G.S., Fonseca, E.O.L., dos Santos, R.F., Cunha, G.M., de Carvalho, C.M.M., *et al.* (2021). TriatoScore: an entomological-risk score for Chagas disease vector control-surveillance. **Parasites & Vectors** 14, 492.

Rinker, D.C., Pitts, R.J. & Zwiebel, L.J. (2016). Disease vectors in the era of next generation sequencing. **Genome Biology** 17, 95.

Robinet, C., David, G. & Jactel, H. (2019). Modeling the distances traveled by flying insects based on the combination of flight mill and mark-release-recapture experiments. **Ecological Modelling** 402, 85–92.

Rocha, E.M., Katak, R. de M., Campos de Oliveira, J., Araujo, M. da S., Carlos, B.C., Galizi, R., Tripet, F., Marinotti, O. & Souza-Neto, J.A. (2020). Vector-Focused Approaches to Curb Malaria Transmission in the Brazilian Amazon: An Overview of Current and Future Challenges and Strategies. **Tropical Medicine and Infectious Disease** 5, 161.

Romaña, C.A., Brunstein, D., Collin-Delavaud, A., Sousa, O. & Ortega-Barría, E. (2003). Public policies of development in Latin America and Chagas' disease. **The Lancet** 362, 579.

Roque, A.L.R. & Jansen, A.M. (2014). Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In Cleber Galvão (Eds.), **Vetores da doença de chagas no Brasil** (pp. 75–87). Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. <https://static.scielo.org/scielobooks/mw58j/pdf/galvao-9788598203096.pdf>.

Rothhammer, F., Allison, M.J., Núñez, L., Standen, V. & Arriaza, B. (1985). Chagas' disease in pre-Columbian South America. **American Journal of Physical Anthropology** 68, 495–498.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution** 34, 3299–3302.

R Studio Team. (2015). RStudio: Integrated Development for R. Boston, MA: **RStudio, Inc.**

Rubel, F. & Kottek, M. (2010). Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification. **Meteorologische Zeitschrift** 19, 135–141.

Salcedo, M.K., Hoffmann, J., Donoughe, S. & Mahadevan, L. (2019). Computational analysis of size, shape and structure of insect wings. **Biology Open** 8, bio040774.

Sarquis, O., Borges-Pereira, J., Mac Cord, J.R., Gomes, T.F., Cabello, P.H. & Lima, M.M. (2004). Epidemiology of chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 99, 263–270.

Sarquis, O., Carvalho-Costa, F.A., Oliveira, L.S., Duarte, R., D'Andrea, P.S., De Oliveira, T.G. & Lima, M.M. (2010). Ecology of *Triatoma brasiliensis* in northeastern Brazil: Seasonal distribution,

feeding resources, and *Trypanosoma cruzi* infection in a sylvatic population. **Journal of Vector Ecology** 35, 385–394.

Sarquis, O., Oliveira, L.S., Rego, R., Gonçalves, J.M., Lima, M.M. & Maciel-de-Freitas, R. (2011). Evaluation of RbCl and CrCl₃ as markers of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) nymphs: persistence and influence of Rb and Cr on triatomine biology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 106, 385–389.

Sarquis, O., Sposina, R., De Oliveira, T.G., Cord, J.R. Mac., Cabello, P.H., Borges-Pereira, J. & Lima, M.M. (2006). Aspects of peridomestic ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101, 143–147.

Sauer, F.G., Jaworski, L., Erdbeer, L., Heitmann, A., Schmidt-Chanasit, J., Kiel, E. & Lühken, R. (2020). Geometric morphometric wing analysis represents a robust tool to identify female mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Germany. **Scientific Reports** 10, 17613.

Schofield, C., Diotaiuti, L. & Dujardin, J. (1999). The process of domestication in triatominae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94, 375–378.

Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. (2022). Boletim Epidemiológico - Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica. **Boletim Especial de doença de Chagas - Número especial**. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022/view>.

Sereno, D. (2022). Epidemiology of Vector-Borne Diseases 2.0. **Microorganisms** 10, 1555.

Serviço Geológico do Brasil - CPRM. (2005). Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea. **Diagnóstico do município de Currais Novos, estado do Rio Grande do Norte** (pp. 1–12). Organizado [por] João de Castro Mascarenhas, Breno Augusto Beltrã o, Luiz Carlos de Souza Junior, Saulo de Tarso Monteiro Pires, Dunaldson Eliezer Guedes Alcoforado da Rocha, Valdecílio Galvão Duarte de Carvalho. Recife: CPRM/PRODEEM. Disponível em https://rigeo.cprm.gov.br/bitstream/doc/16955/1/rel_currais_novos.pdf

Shaw, J., Lainson, R. & Fraiha, H. (1969). Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. **Revista de Saúde Pública** 3, 153–157.

Shikanai-Yasuda, M.A. & Carvalho, N.B. (2012). Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases** 54, 845–852.

Silva, M.B.A., Rocha, D. da S., Jurberg, J., da Silva, A., de Farias, M.C.G. & Galvão, C. (2016). Registration of new geographical distribution of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille) 1811 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Brazil. **Revista de Patologia Tropical** 45, 323–326.

Silva, T.R.M., Barros, G.M.M. do R., Lima, T.A.R.F., Giannelli, A., Silva, G.M. da., Alves, K.M. de L., Carvalho, G.A. de. & Ramos, R.A.N. (2019). Spatial distribution of triatomine bugs in a Chagas disease endemic region in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 52, e20190278.

Simmons, R.B. & Weller, S.J. (2001). Utility and Evolution of *Cytochrome b* in Insects. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 20, 196–210.

Smit, A.F.A., Hubley, R. & Green, P. (2013). RepeatMasker Open-4.0. <http://www.repeatmasker.org>.

Soares, D.A., Andrade, S.M. & Campos, J.J.B. (2001). Epidemiologia e Indicadores de Saúde. In Andrade, S.M., Soares, D.A., & Cordoni Junior, L. (Eds.), **Bases da Saúde Coletiva** (pp. 183–210). Londrina: Editora UEL.

Sonoda, I.V., Dias, L.S., Bezerra, C.M., Dias, J.C.P., Romanha, A.J. & Diotaiuti, L. (2010). Susceptibility of *Triatoma brasiliensis* from state of Ceará, Northeastern Brazil, to the pyrethroid deltamethrin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 105, 348–352.

Souza, R. de C.M. de., Gorla, D.E., Chame, M., Jaramillo, N., Monroy, C. & Diotaiuti, L. (2022). Chagas disease in the context of the 2030 agenda: global warming and vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 117, e200479.

Syndercombe Court, D. (2021). Mitochondrial DNA in forensic use. **Emerging Topics in Life Sciences** 5, 415–426.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphisms. **Genetics** 123, 585–595.

Tambones, I.L., Haudry, A., Simão, M.C. & Carareto, C.M.A. (2019). High frequency of horizontal transfer in *Jockey* families (LINE order) of drosophilids. **Mobile DNA** 10, 43.

Valença-Barbosa, C., Lima, M.M., Sarquis, O., Bezerra, C.M. & Abad-Franch, F. (2014). Modeling Disease Vector Occurrence When Detection Is Imperfect II: Drivers of Site-Occupancy by Synanthropic *Triatoma brasiliensis* in the Brazilian Northeast. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 8, e2861.

Valente, S.A. da S., da Costa Valente, V., das Neves Pinto, A.Y., de Jesus Barbosa César, M., dos Santos, M.P., Miranda, C.O.S., Cuervo, P. & Fernandes, O. (2009). Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 103, 291–297.

Van Zee, J., Piesman, J.F., Hojgaard, A. & Black IV, W.C. (2015). Nuclear Markers Reveal Predominantly North to South Gene Flow in *Ixodes scapularis*, the Tick Vector of the Lyme Disease Spirochete. **PLoS ONE** 10, e0139630.

Vargas, A., Malta, J.M.A.S., da Costa, V.M., Cláudio, L.D.G., Alves, R.V., Cordeiro, G. da S., Aguiar, L.M.A.L.M.A., Percio, J., *et al.* (2018). Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de Saúde Pública** 34, e00006517.

Vendrami, D.P., Ceretti-Junior, W., Obara, M.T., Mendonça, V.J., Fonseca, E.O.L., Medeiros-Sousa, A.R., Marrelli, M.T. & Gurgel-Gonçalves, R. (2021). Phenotypic and genetic variation of *Triatoma costalimai* (Hemiptera: Reduviidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 54, 1–4.

- Viana, M.C., Alves-Pereira, A., Oliveira, M.A.P., Valença-Barbosa, C., Folly-Ramos, E., Souza, A.P., Takiya, D.M. & Almeida, C.E. (2024). Population genetics and genomics of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil. **Acta Tropica** 252, 107144.
- Villela, M.M., Souza, J.B., Mello, V.P., Azeredo, B.V. de M. & Dias, J.C.P. (2005). Vigilância entomológica da doença de Chagas na região centro-oeste de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2000 e 2003. **Cadernos de Saúde Pública** 21, 878–886.
- Wai, T., Ao, A., Zhang, X., Cyr, D., Dufort, D. & Shoubridge, E.A. (2010). The Role of Mitochondrial DNA Copy Number in Mammalian Fertility¹. **Biology of Reproduction** 83, 52–62.
- Waleckx, E., Gourbière, S. & Dumonteil, E. (2015). Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 110, 324–38.
- Wiesner, R.J., Rüegg, J.C. & Morano, I. (1992). Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction: Copy number of mitochondrial DNA in rat tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 183, 553–559.
- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., *et al.* (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society** 26, 375–400.
- Wright, S. (1931). Evolution in mendelian populations. **Genetics** 16, 97–159.
- Zhang, D.-X. & Hewitt, G.M. (1997). Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. **Biochemical Systematics and Ecology** 25, 99–120.
- Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta tropica** 184, 38–52.
- Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.G., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., *et al.* (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution** 12, 240–253.
- Zingales, B., Souto, R.P., Mangia, R.H., Lisboa, C. V., Campbell, D.A., Coura, J.R., Jansen, A. & Fernandes, O. (1998). Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal for Parasitology** 28, 105–112.

IX. APÊNDICES

APÊNDICE A – TABELA 1. Sequências de barcodes e adaptadores utilizados no sequenciamento de alta performance, indicando a combinação utilizada por poço/amostra.

POÇO	AMOSTRAS	BARCODE	ADAPTADOR 1	ADAPTADOR 2
A1	CN75D.1	AACT	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACTTGCA	AGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A2	CN76P.12	CCAG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCAGTGCA	CTGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A3	CN76P.2	TTGA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTGATGCA	TCAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A4	CN84P.5	GGTA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGTATGCA	TACCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A5	CN69P.8	ATTG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATTGTGCA	CAATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A6	CN77S.2	CGGT	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGGTTGCA	ACCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A7	CN81P.8	TGCG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCGTGCA	CGCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A8	CZ19P.14	GTAT	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTATTGCA	ATACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A9	CN81P.11	AACCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAACCATGCA	TGGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A10	CN83S.10	CCACG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCACGTGCA	CGTGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A11	CN77S.8	TATAA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTATAATGCA	TTATAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
A12	CN83S.9	GAGCG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAGCGTGCA	CGCTCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B1	CN85D.1	ACATA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACATATGCA	TATGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B2	CN76P.14	CTCAG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTCAGTGCA	CTGAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B3	CN69P.12	TCTGG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTCTGGTGCA	CCAGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B4	CN72S.2	CGGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGGCATGCA	TGCCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B5	CN71P.6	GAAGA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAAGATGCA	TCTTCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B6	CN87S.3	ACGAG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGAGTGCA	CTCGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B7	CN71P.5	TTCTA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTCTATGCA	TAGAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B8	CN76P.15	AGTCG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGTCGTGCA	CGACTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B9	CN77S.1	GCCAA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCCAATGCA	TTGGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B10	CN86P.8	TAATG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAATGTGCA	CATTAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B11	CN83S.4	GTTCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTTCATGCA	TGAACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
B12	CN74P.2	GGCGG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGGCGGTGCA	CCGCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C1	CN73P.1	CAGAT	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGATTGCA	ATCTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C2	CZ19P.23	ACTGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACTGCATGCA	TGCAGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C3	CN74P.12	CTGCCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCTGCCATGCA	TGGCAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C4	CN69P.2	TGATCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGATCATGCA	TGATCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C5	CN86P.6	AAGTCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAAGTCATGCA	TGACTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C6	CN74P.10	CGTACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGTACATGCA	TGTACGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C7	CN71P.2	TTCGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTCGCATGCA	TGCGAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C8	CN87S.2	GTAACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTAACATGCA	TGTTACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C9	CN77S.9	GATCCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGATCCATGCA	TGGATCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

C10	CN86P.2	ACATCG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACATCGTGCA	CGATGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C11	CN81P.4	TCGCAA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTCGCAATGCA	TTGCGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
C12	CN77S.3	CGCTGA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGTGATGCA	TCACGCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D1	CN72S.14	AACGTG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAACGTGTGCA	CACGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D2	CN74P.11	CCTAAG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTAAGTGCA	CTTAGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D3	CN87S.11	TTACGA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTACGATGCA	TCGTAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D4	CN77S.7	ATGGCG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTATGGCGTGCA	CGCCATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D5	CN87S.8	GGACTA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGACTATGCA	TAGTCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D6	CZ19P.17	CACTAG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCACTAGTGCA	CTAGTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D7	CN86P.3	TCTAGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTCTAGCATGCA	TGCTAGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D8	CN71P.1	GTGGCCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTGGCCATGCA	TGGCCACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D9	CN86P.10	AGAATCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGAATCATGCA	TGATTCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D10	CN87S.5	CATCGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCATCGCATGCA	TGCGATGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D11	CN81P.5	TCCGACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTCCGACATGCA	TGTCGGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
D12	CN73P.2	AGGTCCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGGTCCATGCA	TGGACCTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E1	CN19S.12	GAATACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGAATACATGCA	TGTATTCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E2	CZ19P.6	CCTGTCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTGTCAATGCA	TGACAGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E3	CN87S.9	TTCCGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTCCGCATGCA	TGCGGAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E4	CN71P.10	TAGACCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTAGACCATGCA	TGGTCTAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E5	CN72S.8	GGCCTCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGCCTCATGCA	TGAGGCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E6	CN86P.1	ACATGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACATGCATGCA	TGCATGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E7	CZ19P.25	CTTGCAA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTTGCAATGCA	TTGCAAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E8	CN81P.6	ATGAACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTATGAACATGCA	TGTTTCATAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E9	CN84P.2	GGATCAA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGATCAATGCA	TTGATCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E10	CN83S.3	CACATGA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCACATGATGCA	TCATGTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E11	CN74P.7	TGTCACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTGTACATGCA	TGTGACAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
E12	CN74P.13	GCTGGACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGCTGGACATGCA	TGTCCAGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F1	CN84P.4	AAGATGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTAAGATGCATGCA	TGCATCTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F2	CN76P.10	CCATGCCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCATGCCATGCA	TGGCATGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F3	CN69P.9	TTCGAAACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTCGAAACATGCA	TGTTTCGAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F4	CN76P.8	TGGCCGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTGGCCGCATGCA	TGCGGCCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F5	CN84P.3	GAATACCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAATACCATGCA	TGGTATTCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F6	CN69P.4	ACCGTCCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACCGTCCATGCA	TGGACGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F7	CN84P.1	CTTACGCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTTACGCATGCA	TGCGTAAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F8	CN74P.1	TAGCGACA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAGCGCATGCA	TGTCGCTAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F9	CN77S.4	GGAAACAAT	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGAACAATTGCA	ATTGTTCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F10	CN86P.4	ACCTACCG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACCTACCGTGCA	CGGTAGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F11	CN83S.5	CTTCTGTA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCTTCTGTATGCA	TACAGAAGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
F12	CN81P.2	CGAGGTGA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGAGGTGATGCA	TCACCTCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G1	CN72S.9	GAGAACAT	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAGAACATTGCA	ATGTTCTCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G2	CN69P.11	ACCTCATG	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTACCTCATGTGCA	CATGAGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G3	CN72S.13	TTGCTTCA	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTGCTTCATGCA	TGAAGCAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

G4	CN71P.9	CGTGAGGT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGTGAGGTTGCA	ACCTCACGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G5	CN86P.5	GAACGACCT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAACGACCTTGCA	AGGTTCGTTCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G6	CN72S.6	ACCATGACA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTACCATGACATGCA	TGTCATGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G7	CN87S.6	TTGTCCTCA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTGTCCTCATGCA	TGAGGACAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G8	CN76P.1	ACTGGTGGT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTACTGGTGGTTGCA	ACCACCAGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G9	CN71P.3	GGAACAAGT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGAACAAGTTGCA	ACTTGTTCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G10	CN83S.2	CACCATGAA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTCACCATGAATGCA	TTCATGGTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G11	CN81P.3	TTGTTCCCTA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTGTTCCCTATGCA	TAGGAACAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
G12	CN74P.4	GGTGAGTCT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGTGAGTCTTGCA	AGACTCACCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H1	CN72S.10	AACAGAATA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTAACAGAATATGCA	TATTCTGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H2	CN69P.10	CCACCTCGT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCACCTCGTTGCA	ACGAGGTGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H3	CN76P.6	TTGTTTCGAT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTGTTTCGATTGCA	ATCGAACAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H4	CN72S.3	GGTTGGTCA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGTTGGTCATGCA	TGACCAACCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H5	CN81P.7	AACGAACAT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTAACGAACATTGCA	ATGTTTCGTTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H6	CN76P.11	CCAACCTGA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCAACCTGATGCA	TCAGGTTGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H7	CN71P.4	TTGCTTACA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTGCTTACATGCA	TGTAAGCAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H8	CN77S.5	AGTGGCGTT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTAGTGGCGTTTGCA	AACGCCACTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H9	CN83S.6	GAACAGAAT	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTGAACAGAATTGCA	ATTCTGTTTCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H10	CN69P.6	CCTACACCG	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTCCTACACCGTGCA	CGGTGTAGGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H11	CN87S.4	TTCTTGTTA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTTTCTTGTTATGCA	TAACAAGAAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT
H12	branco	CGAGGTGGA	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTCGAGGTGGATGCA	TCCACCTCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

APÊNDICE B –TABELA 2. Amostras selecionadas para o estudo, indicando o município e estado, pontos de coleta, ecótopo e indivíduos cujo DNA foi isolado, tratado, quantificado, amplificado e sequenciado por sequenciamento convencional, e as bibliotecas para Sequenciamento de Nova Geração foram indexadas e sequenciadas. As células da coluna “Tratamento com RNase” que estão em branco significam que as amostras estavam degradadas e não foram tratadas, ou que o N amostral desejado já havia sido alcançado. Da mesma forma, a coluna “Quantificação com QUBIT (ng/μL)” e as etapas seguintes.

Município / Estado	Ecótopo	Amostra (Indivíduos processados)	DNA isolado da perna	Tratamento com RNase	Quantificação com QUBIT (ng/μL)	PCR do MT-CYB	Sequenciamento convencional do MT-CYB	Construção de biblioteca NGS
<i>Ponto de coleta CZ19P</i>								
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.2	isolado	tratado				
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.6	isolado	tratado	2,34 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.14	isolado	tratado	6,26 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.15	isolado	tratado				
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.16	isolado	tratado				
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.17	isolado	tratado	5,36 ng/μL	Amplificado		Biblioteca sequenciada
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.23	isolado	tratado	2,16 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.25	isolado	tratado	5,9 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Cajazeiras / PB	Peridomicílio	CZ19P.27	isolado	tratado		Amplificado	Sequenciado	
<i>Ponto de coleta CN69P</i>								
Currais Novos / RN	Peridomicílio	CN69P.1	isolado	tratado	4,46 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicílio	CN69P.2	isolado	tratado	3,62 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicílio	CN69P.3	isolado	tratado	2,62 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicílio	CN69P.4	isolado	tratado	5,5 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicílio	CN69P.5	isolado	tratado		Amplificado	Sequenciado	
Currais Novos / RN	Peridomicílio	CN69P.6	isolado	tratado	10,8 ng/μL	Amplificado		Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicílio	CN69P.7	isolado	tratado		Amplificado	Sequenciado	
Currais Novos / RN	Peridomicílio	CN69P.8	isolado	tratado	2,36 ng/μL			

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.9	isolado	tratado	3,13 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.10	isolado	tratado	2,7 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.11	isolado	tratado	2,35 ng/ μ L			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.12	isolado	tratado	2,73 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.13	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.14	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.15	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.16	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.17	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.18	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.19	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.20	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.21	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.22	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.23	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.24	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.25	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.26	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.27	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.28	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.29	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN69P.30	isolado					

Ponto de coleta CN71P

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.1	isolado	tratado	6,7 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.2	isolado	tratado	5,8 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.3	isolado	tratado	9,08 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.4	isolado	tratado	6,24 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.5	isolado	tratado	5,74 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.6	isolado	tratado	4,52 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.7	isolado	tratado	3,62 ng/ μ L			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.8	isolado	tratado	3,58 ng/ μ L			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.9	isolado	tratado	4,42 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.10	isolado	tratado	3,85 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.11	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.12	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.13	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.14	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.15	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.16	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.17	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.18	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.19	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.20	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.21	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.22	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.23	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.24	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.25	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.26	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN71P.27	isolado					

Ponto de coleta CN72S

Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.1	isolado	tratado		Repetir		
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.2	isolado	tratado	3,58 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.3	isolado	tratado	4,42 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada

Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.4	isolado	tratado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.5	isolado	tratado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.6	isolado	tratado	5,5 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.7	isolado	tratado		Amplificado	Sequenciado		
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.8	isolado	tratado	4,78 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.9	isolado	tratado	1,64 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.10	isolado	tratado	1,64 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.11	isolado	tratado	1,13 ng/ μ L				
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.12	isolado	tratado	1,51 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.13	isolado	tratado	3,18 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.14	isolado	tratado	1,24 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.15	isolado	tratado	0,93 ng/ μ L				
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.16	isolado						
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.17	isolado						
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.18	isolado						
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.19	isolado						
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.20	isolado						
Currais Novos / RN	Silvestre	CN72S.21	isolado						
<i>Ponto de coleta CN73P</i>									
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN73P.1	isolado	tratado	0,098 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN73P.2	isolado	tratado	18,9 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada	
<i>Ponto de coleta CN74P</i>									
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.1	isolado	tratado	6,76 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.2	isolado	tratado	14,4 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.3							
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.4	isolado	tratado	45,6 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada	
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.5							

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.6	isolado	tratado		Amplificado	Sequenciado	
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.7	isolado	tratado	13,2 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.8	isolado	tratado	0,38 ng/μL	Amplificado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.9	isolado	tratado	1,35 ng/μL			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.10	isolado	tratado	5,29 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.11	isolado	tratado	2,17 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.12	isolado	tratado	2,77 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.13	isolado	tratado	21,8 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.14	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN74P.15	isolado					

Ponto de coleta CN75D

Currais Novos / RN	Domiciliar	CN75D.1	isolado	tratado	Não detectado*	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
--------------------	------------	---------	---------	---------	----------------	-------------	-------------	------------------------

Ponto de coleta CN76P

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.1	isolado	tratado	7,06 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.2	isolado	tratado	2,7 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.3	isolado	tratado				
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.4	isolado	tratado				
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.5	isolado	tratado				
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.6	isolado	tratado	3,24 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.7	isolado	tratado				
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.8	isolado	tratado	4,4 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.9	isolado	tratado	6,4 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.10	isolado	tratado	2,35 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.11	isolado	tratado	5,56 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.12	isolado	tratado	1,7 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.13	isolado	tratado	0,96 ng/μL			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.14	isolado	tratado	1,79 ng/μL			Biblioteca sequenciada

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.15	isolado	tratado	1,09 ng/μL
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.16	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.17	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.18	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.19	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.20	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.21	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.22	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.23	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.24	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.25	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.26	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.27	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.28	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.29	isolado		
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN76P.30	isolado		

Ponto de coleta CN77S

Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.1	isolado	tratado	7,44 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.2	isolado	tratado	5,2 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.3	isolado	tratado	15,1 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.4	isolado	tratado	8,82 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.5	isolado	tratado	7,32 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.6	isolado	tratado	1,8 ng/μL			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.7	isolado	tratado	3,83 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.8	isolado	tratado	11,1 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.9	isolado	tratado	7,59 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN77S.10	isolado	tratado	2,86 ng/μL			

Ponto de coleta CN81P

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.2	isolado	tratado	23,4 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.3	isolado	tratado	13,7 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.4	isolado	tratado	11,4 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.5	isolado	tratado	12,1 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.6	isolado	tratado	6,7 ng/ μ L	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.7	isolado	tratado	5,12 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.8	isolado	tratado	5,67 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.9	isolado	tratado	3,81 ng/ μ L			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.10	isolado	tratado	3,85 ng/ μ L			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.11	isolado	tratado	7,39 ng/ μ L			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.12	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.13	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.14	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.15	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.16	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.17	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.18	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.19	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.20	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.21	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.22	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.23	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.24	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.25	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.26	isolado					
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.27	isolado					

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.28	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.29	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN81P.30	isolado

Ponto de coleta CN83S

Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.1	isolado	tratado	8,48 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.2	isolado	tratado	10,7 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.3	isolado	tratado	9,78 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.4	isolado	tratado	11,3 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.5	isolado	tratado	13,2 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.6	isolado	tratado	9,21 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.7	isolado	tratado	8,42 ng/μL			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.8	isolado	tratado	-			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.9	isolado	tratado	13,9 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.10	isolado	tratado	9,47 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.11	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.12	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.13	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.14	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.15	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.16	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.17	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.18	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.19	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.20	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.21	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.22	isolado					
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.23	isolado					

Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.24	isolado
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.25	isolado
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.26	isolado
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.27	isolado
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.28	isolado
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.29	isolado
Currais Novos / RN	Silvestre	CN83S.30	isolado

Ponto de coleta CN84P

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN84P.1	isolado	tratado	5,9 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN84P.2	isolado	tratado	8,4 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN84P.3	isolado	tratado	5,1 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN84P.4	isolado	tratado	1,58 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN84P.5	isolado	tratado	3.32 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada

Ponto de coleta CN85D

Currais Novos / RN	Domiciliar	CN85D.1	isolado	tratado	Não detectado*			Biblioteca sequenciada
--------------------	------------	---------	---------	---------	----------------	--	--	------------------------

Ponto de coleta CN86P

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.1	isolado	tratado	5,4 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.2	isolado	tratado	9,54 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.3	isolado	tratado	5,84 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.4	isolado	tratado	10,5 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.5	isolado	tratado	5,1 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.6	isolado	tratado	4,56 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.7	isolado	tratado	2,58 ng/μL			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.8	isolado	tratado	9,48 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.9	isolado	tratado	3,47 ng/μL			
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.10	isolado	tratado	7,59 ng/μL			Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.11	isolado					

Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.12	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.13	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.14	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.15	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.16	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.17	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.18	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.19	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.20	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.21	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.22	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.23	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.24	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.25	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.26	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.27	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.28	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.29	isolado
Currais Novos / RN	Peridomicilio	CN86P.30	isolado

Ponto de coleta CN87S

Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.1	isolado	tratado				
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.2	isolado	tratado	6,5 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.3	isolado	tratado	5,26 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.4	isolado	tratado	13,9 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.5	isolado	tratado	9,74 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.6	isolado	tratado	6,08 ng/μL	Amplificado	Sequenciado	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.7	isolado	tratado	1,53 ng/μL			

Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.8	isolado	tratado	4,7 ng/ μ L	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.9	isolado	tratado	2,86 ng/ μ L	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.10	isolado	tratado	2,74 ng/ μ L	
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.11	isolado	tratado	2,77 ng/ μ L	Biblioteca sequenciada
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.12	isolado			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.13	isolado			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.14	isolado			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.15	isolado			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.16	isolado			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.17	isolado			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.18	isolado			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.19	isolado			
Currais Novos / RN	Silvestre	CN87S.20	isolado			

APÊNDICE C – Lista dos espécimes amostrados neste estudo, indicando local de coleta, locais de coleta, ecótopo, coordenadas e número sequencial da amostra individual. As siglas CN estão relacionadas ao município de Currais Novos, RN ao estado do Rio Grande do Norte, CZ ao município de Cajazeiras, PB ao estado da Paraíba e BR ao Brasil. Entre parênteses informamos quais análises foram realizadas; abordagens do gene mitocondrial *Citocromo b* (MT-CYB) e/ou polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Ao final de cada local de coleta informamos o número total de amostras por localidade (N) e amostras analisadas.

Localidade Sítio Malhada, Currais Novos, RN, BR.

- **Ponto de coleta: CN71P (-6.151583, -36.520611)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CN71P.1 (MT-CYB), CN71P.2 (MT-CYB/SNP), CN71P.3 (MT-CYB/SNP), CN71P.4 (MT-CYB/SNP), CN71P.5 (MT-CYB/SNP), CN71P.6 (MT-CYB), CN71P.9 (MT-CYB/SNP), CN71P.10 (MT-CYB/SNP), CN71P.11 (MT-CYB), CN71P.12 (MT-CYB).

N = 10; MT-CYB N = 10; SNP N = 6.

- **Ponto de coleta: CN81P (-6.147028, -36.511000)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CN81P.2 (MT-CYB/SNP), CN81P.3 (MT-CYB/SNP), CN81P.4 (MT-CYB/SNP), CN81P.5 (MT-CYB/SNP), CN81P.6 (MT-CYB/SNP), CN81P.7 (MT-CYB/SNP), CN81P.8 (MT-CYB/SNP), CN81P.11 (MT-CYB/SNP), CN81P.12 (MT-CYB), CN81P.13 (MT-CYB).

N = 10; MT-CYB N = 10; SNP N = 8.

Localidade Furna da Onça, Currais Novos, RN, BR.

- **Ponto de coleta: CN72S (-6.175833, -36.521361)**

Ecótopo selvagem

Amostras: CN72S.2 (MT-CYB/SNP), CN72S.3 (MT-CYB/SNP), CN72S.6 (MT-CYB/SNP), CN72S.7 (MT-CYB), CN72S.8 (MT-CYB/SNP), CN72S.9 (MT-CYB/SNP), CN72S.10 (MT-CYB/SNP), CN72S.12 (MT-CYB/SNP), CN72S.13 (MT-CYB/SNP), CN72S.14 (MT-CYB/SNP).

N = 10; MT-CYB N = 10; SNP N = 9.

- **Ponto de coleta: CN73P (-6.176929, -36.520953)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CN73P.1 (SNP), CN73P.2 (MT-CYB/SNP).

N = 2; MT-CYB N = 1; SNP N = 2.

Localidade Fazenda Cacimba da Pedra, Currais Novos, RN, BR.

- **Ponto de coleta: CN74P (-6.224167, -36.519389)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CN74P.1 (MT-CYB/SNP), CN74P.2 (MT-CYB/SNP), CN74P.4 (MT-CYB/SNP), CN74P.6 (MT-CYB), CN74P.7 (MT-CYB/SNP), CN74P.10 (MT-CYB/SNP), CN74P.11 (SNP), CN74P.12 (MT-CYB/SNP), CN74P.13 (MT-CYB/SNP).

N = 9; MT-CYB N = 8; SNP N = 8.

- **Ponto de coleta: CN75D (-6.237194, -36.512444)**

Ecótopo domiciliar

Amostra: CN75D.1 (MT-CYB/SNP).

N = 1; MT-CYB N = 1; SNP N = 1."

Localidade Fazenda Barra da Areia, Currais Novos, RN, BR.

- **Ponto de coleta: CN69P (-6.232944, -36.510306)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CN69P.1 (MT-CYB), CN69P.2 (MT-CYB/SNP), CN69P.3 (MT-CYB), CN69P.4 (MT-CYB/SNP), CN69P.5 (MT-CYB), CN69P.6 (SNP), CN69.7 (MT-CYB), CN69P.8 (MT-CYB/SNP), CN69P.9 (SNP), CN69P.10 (MT-CYB/SNP), CN69P.11 (MT-CYB/SNP), CN69P.12 (MT-CYB/SNP).

N = 12; MT-CYB N = 10; SNP N = 8.

- **Ponto de coleta: CN83S (-6.237472, -36.507750)**

Ecótopo selvagem

Amostras: CN83S.1 (MT-CYB), CN83S.2 (MT-CYB/SNP), CN83S.3 (MT-CYB/SNP), CN83S.4 (MT-CYB/SNP), CN83S.5 (MT-CYB/SNP), CN83S.6 (MT-CYB/), CN83S.9 (MT-CYB/SNP), CN83S.10 (MT-CYB/SNP), CN83S.11 (MT-CYB).

N = 9; MT-CYB N = 9; SNP N = 6.

- **Ponto de coleta: CN84P (-6.237111, -36.508694)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CN84P.1 (MT-CYB/SNP), CN84P.2 (MT-CYB/), CN84P.3 (MT-CYB/SNP), CN84P.4 (MT-CYB/SNP), CN84P.5 (MT-CYB/SNP).

N = 5; MT-CYB N = 5; SNP N = 4.

Localidade Sítio Morada do Mocó, Currais Novos, RN, BR.

- **Ponto de coleta: CN76P (-6.246496, -36.514565)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CN76P.1 (MT-CYB/SNP), CN76P.2 (MT-CYB/), CN76P.6 (MT-CYB/SNP), CN76P.8 (MT-CYB/SNP), CN76P.9 (MT-CYB), CN76P.10 (MT-CYB/SNP), CN76P.11 (MT-CYB/SNP), CN76P.12 (MT-CYB/), CN76P.14 (MT-CYB/SNP), CN76P.15 (MT-CYB/SNP).

N = 10; MT-CYB N = 10; SNP N = 7.

- **Ponto de coleta: CN77S (-6.246425, -36.513495)**

Ecótopo selvagem

Amostras: CN77S.1 (MT-CYB/SNP), CN77S.2 (MT-CYB/SNP), CN77S.3 (MT-CYB/SNP), CN77S.4 (MT-CYB/SNP), CN77S.5 (MT-CYB/SNP), CN77S.7 (MT-CYB/SNP), CN77S.8 (MT-CYB/), CN77S.9 (MT-CYB/SNP).

N = 8; MT-CYB N = 8; SNP N = 7.

Localidade Bairro Paizinho Maria, Currais Novos, RN, BR.

- **Ponto de coleta: CN87S (-6.254778, -36.494556)**

Ecótopo selvagem

Amostras: CN87S.2 (MT-CYB/SNP), CN87S.3 (MT-CYB/SNP), CN87S.4 (MT-CYB/SNP), CN87S.5 (MT-CYB/SNP), CN87S.6 (MT-CYB/SNP), CN87S.7 (MT-CYB), CN87S.8 (MT-CYB/SNP), CN87S.9 (MT-CYB/SNP), CN87S.10 (MT-CYB), CN87S.11 (MT-CYB/SNP).

N = 10; MT-CYB N = 10; SNP N = 8.

Localidade Sítio Areias de Baixo, Currais Novos, RN, BR.

- **Ponto de coleta: CN85D (-6.279639, -36.484306)**

Ecótopo domiciliar

Amostra: CN85D.1.

N = 1

- **Ponto de coleta: CN86P (-6.283861, -36.486639)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CN86P.1 (MT-CYB/SNP), CN86P.2 (MT-CYB/SNP), CN86P.3 (MT-CYB/), CN86P.4 (MT-CYB/SNP), CN86P.5 (MT-CYB/SNP), CN86P.6 (MT-CYB/SNP), CN86P.8 (MT-CYB/SNP), CN86P.10 (MT-CYB/SNP), CN86P.11 (MT-CYB), CN86P.12 (MT-CYB).

N = 10; MT-CYB N = 10; SNP N = 7.

Localidade Lagoa do Bé, Cajazeiras, PB, BR.

- **Ponto de coleta: CZ19P (-6.823694, -38.421667)**

Ecótopo peridomiciliar

Amostras: CZ19P.2 (MT-CYB), CZ19P.6 (MT-CYB/SNP), CZ19P.14 (MT-CYB/SNP), CZ19P.15 (MT-CYB), CZ19P.16 (MT-CYB), CZ19P.17 (SNP), CZ19P.23 (SNP), CZ19P.25 (MT-CYB/SNP), CZ19P.27, (MT-CYB).

N = 9; MT-CYB N = 7; SNP N = 5.

APÊNDICE D –TABELA 3. Amostras de *Triatoma brasiliensis* sequenciadas neste estudo (MT-CYB), indicando a quantidade de sequências geradas, a população (pontos de coleta), o registro da amostra, o iniciador (Citb F senso; Citb R anti-senso), a qualidade da sequência gerada segundo interpretação do eletroferograma e do programa CODON CODE, bem como o tamanho do contig gerado, e as informações de identificação realizadas através da ferramenta BLAST (cobertura e identidade). As cores na coluna “Qualidade” indicam se a sequência pôde ou não ser utilizada, onde somente as sequências em verde foram aproveitadas. (*) indicam que a houve mais de um sequenciamento da amostra.

N	Amostra	Iniciador	Qualidade	Qualidade CODON CODE (BP)	Tamanho do contig CODON CODE (BP)	BLAST ID	BLAST COVER	Taxa	
Ponto de coleta CN69P									
1	CN69P.1	Citb F	[Green]	546 pb	510 pb	99.8%	100%	<i>T. brasiliensis</i>	
2	CN69P.1	Citb R		548 pb	510 pb	99.8%	100%	<i>T. brasiliensis</i>	
3	CN69P.2	Citb F		549 pb	510 pb	99.8%	100%	<i>T. brasiliensis</i>	
4	CN69P.2	Citb R		548 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>	
5	CN69P.3	Citb F		554 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>	
6	CN69P.3	Citb R		[Red]					
7	CN69P.4	Citb F							
8	CN69P.4	Citb R							
9	CN69P.5	Citb F							
10	CN69P.5	Citb R							
	CN69P.6	Citb F							
	CN69P.6	Citb R							
	CN69P.6	Citb F							
	CN69P.6	Citb R							
11	CN69P.7	Citb F	[Green]	546 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>	
12	CN69P.7	Citb R							
13	CN69P.8	Citb F	[Green]	561 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>	

14	CN69P.8	Citb R						
	CN69P.9	Citb F						
	CN69P.9	Citb R						
15	CN69P.10	Citb F		552 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
16	CN69P.10	Citb R						
17	CN69P.11	Citb F		551 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
18	CN69P.11	Citb R						
19	CN69P.12	Citb F		555 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
20	CN69P.12	Citb R						

Ponto de coleta CN71P

21	CN71P.1	Citb F						
22	CN71P.1	Citb R		549 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
23	CN71P.2	Citb F		548 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
24	CN71P.2	Citb R						
25	CN71P.3	Citb F		549 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
26	CN71P.3	Citb R						
27	CN71P.4*	Citb F		554 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
28	CN71P.4*	Citb R						
29	CN71P.4*	Citb F		562 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
30	CN71P.4*	Citb R						
31	CN71P.5	Citb F		551 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
32	CN71P.5	Citb R						
33	CN71P.6	Citb F		556 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
34	CN71P.6	Citb R						
35	CN71P.9	Citb F		555 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
36	CN71P.9	Citb R						
37	CN71P.10	Citb F		549 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
38	CN71P.10	Citb R						

39	CN71P.11	Citb F		546 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
40	CN71P.11	Citb R						
41	CN71P.12	Citb F						
42	CN71P.12	Citb R		556 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>

Ponto de coleta CN72S

	CN72S.1	Citb F						
	CN72S.1	Citb R						
43	CN72S.2	Citb F		552 pb	510 pb	99.8%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
44	CN72S.2	Citb R						
45	CN72S.3	Citb F		548 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
46	CN72S.3	Citb R						
47	CN72S.6	Citb F		553 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
48	CN72S.6	Citb R						
49	CN72S.7	Citb F		549 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
50	CN72S.7	Citb R						
51	CN72S.8	Citb F		558 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
52	CN72S.8	Citb R						
53	CN72S.9	Citb F		550 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
54	CN72S.9	Citb R						
55	CN72S.10	Citb F		554 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
56	CN72S.10	Citb R						
57	CN72S.12	Citb F		562 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
58	CN72S.12	Citb R						
59	CN72S.13	Citb F		561 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
60	CN72S.13	Citb R						
61	CN72S.14	Citb F		556 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
62	CN72S.14	Citb R						

Ponto de coleta CN73P

63	CN73P.2	Citb F		556 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
64	CN73P.2	Citb R						

Ponto de coleta CN74P

65	CN74P.1*	Citb F		553 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
66	CN74P.1*	Citb R						
67	CN74P.1*	Citb F		549 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
68	CN74P.1*	Citb R						
69	CN74P.2	Citb F		557 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
70	CN74P.2	Citb R						
71	CN74P.4	Citb F		551 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
72	CN74P.4	Citb R						
73	CN74P.6	Citb F		556 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
74	CN74P.6	Citb R						
75	CN74P.7	Citb F		554 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
76	CN74P.7	Citb R						
77	CN74P.10	Citb F		565 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
78	CN74P.10	Citb R						
79	CN74P.12	Citb F		561 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
80	CN74P.12	Citb R						
81	CN74P.13	Citb F		560 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
82	CN74P.13	Citb R						

Ponto de coleta CN75D

83	CN75D.1	Citb F		549 pb	510 pb	99.8%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
84	CN75D.1	Citb R						

Ponto de coleta CN76P

	CN76P.1	Citb F						
	CN76P.1	Citb R						
85	CN76P.1	Citb F		558 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
86	CN76P.1	Citb R						
87	CN76P.2	Citb F		558 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
88	CN76P.2	Citb R						
89	CN76P.6	Citb F		558 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
90	CN76P.6	Citb R						
91	CN76P.8	Citb F		557 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
92	CN76P.8	Citb R						
93	CN76P.9	Citb F		549 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
94	CN76P.9	Citb R						
95	CN76P.10	Citb F		549 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
96	CN76P.10	Citb R						
97	CN76P.11	Citb F		552 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
98	CN76P.11	Citb R						
99	CN76P.12	Citb F		554 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
100	CN76P.12	Citb R						
101	CN76P.14	Citb F		549 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
102	CN76P.14	Citb R						
103	CN76P.15	Citb F		557 pb	510 pb	99.22%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
104	CN76P.15	Citb R						

Ponto de coleta CN77S

105	CN77S.1	Citb F		545 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
106	CN77S.1	Citb R						
107	CN77S.2	Citb F		550 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>

108	CN77S.2	Citb R						
109	CN77S.3	Citb F						
110	CN77S.3	Citb R		541 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
111	CN77S.4*	Citb F						
112	CN77S.4*	Citb R		543 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
113	CN77S.4*	Citb F						
114	CN77S.4*	Citb R		561 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
115	CN77S.5	Citb F						
116	CN77S.5	Citb R		548 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
117	CN77S.7	Citb F						
118	CN77S.7	Citb R		554 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
119	CN77S.8	Citb F						
120	CN77S.8	Citb R		547 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
121	CN77S.9	Citb F						
122	CN77S.9	Citb R		546 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>

Ponto de coleta CN81P

123	CN81P.2	Citb F						
124	CN81P.2	Citb R		547 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
125	CN81P.3	Citb F						
126	CN81P.3	Citb R		546 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
127	CN81P.4	Citb F						
128	CN81P.4	Citb R		553 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
129	CN81P.5	Citb F						
130	CN81P.5	Citb R		549 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
131	CN81P.6	Citb F						
132	CN81P.6	Citb R		551 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
133	CN81P.7	Citb F						
134	CN81P.7	Citb R		555 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>

135	CN81P.8	Citb F		553 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
136	CN81P.8	Citb R						
137	CN81P.11	Citb F		558 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
138	CN81P.11	Citb R						
139	CN81P.12	Citb F		543 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
140	CN81P.12	Citb R						
141	CN81P.13	Citb F		528 pb	505 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
142	CN81P.13	Citb R						

Ponto de coleta CN83S

143	CN83S.1	Citb F		558 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
144	CN83S.1	Citb R						
145	CN83S.2	Citb F		553 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
146	CN83S.2	Citb R						
147	CN83S.3	Citb F		556 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
148	CN83S.3	Citb R						
149	CN83S.4	Citb F		552 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
150	CN83S.4	Citb R						
151	CN83S.5	Citb F		554 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
152	CN83S.5	Citb R						
153	CN83S.6	Citb F		556 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
154	CN83S.6	Citb R						
155	CN83S.9	Citb F		557 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
156	CN83S.9	Citb R						
157	CN83S.10*	Citb F		547 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
158	CN83S.10*	Citb R						
159	CN83S.10*	Citb F		559 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
160	CN83S.10*	Citb R						
161	CN83S.11	Citb F		553 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>

162 CN83S.11 Citb R

Ponto de coleta CN84P

163	CN84P.1	Citb F		558 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
164	CN84P.1	Citb R						
165	CN84P.2	Citb F		553 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
166	CN84P.2	Citb R						
167	CN84P.3	Citb F		557 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
168	CN84P.3	Citb R						
169	CN84P.4	Citb F		553 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
170	CN84P.4	Citb R						
171	CN84P.5	Citb F		551 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
172	CN84P.5	Citb R						

Ponto de coleta CN86P

173	CN86P.1	Citb F		550 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
174	CN86P.1	Citb R						
175	CN86P.2	Citb F		552 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
176	CN86P.2	Citb R						
177	CN86P.3	Citb F		556 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
178	CN86P.3	Citb R						
179	CN86P.4	Citb F		555 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
180	CN86P.4	Citb R						
181	CN86P.5	Citb F		552 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
182	CN86P.5	Citb R						
183	CN86P.6	Citb F		553 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
184	CN86P.6	Citb R						
185	CN86P.8	Citb F		553 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
186	CN86P.8	Citb R						

187	CN86P.10	Citb F		548 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
188	CN86P.10	Citb R						
189	CN86P.11	Citb F		556 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
190	CN86P.11	Citb R						
191	CN86P.12	Citb F		554 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
192	CN86P.12	Citb R						

Ponto de coleta CN87S

193	CN87S.2	Citb F		541 pb	510 pb	99.41%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
194	CN87S.2	Citb R						
195	CN87S.3	Citb F		556 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
196	CN87S.3	Citb R						
197	CN87S.4	Citb F		549 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
198	CN87S.4	Citb R						
199	CN87S.5	Citb F		546 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
200	CN87S.5	Citb R						
201	CN87S.6	Citb F		551 pb	510 pb	99.80%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
202	CN87S.6	Citb R						
203	CN87S.7	Citb F		543 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
204	CN87S.7	Citb R						
205	CN87S.8	Citb F		550 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
206	CN87S.8	Citb R						
207	CN87S.9	Citb F		554 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
208	CN87S.9	Citb R						
209	CN87S.10	Citb F		550 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
210	CN87S.10	Citb R						
211	CN87S.11	Citb F		559 pb	510 pb	99.61%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
212	CN87S.11	Citb R						

Ponto de coleta CZ19P

213	CZ19P.2	Citb F	560 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
214	CZ19P.2	Citb R					
215	CZ19P.6	Citb F	555 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
216	CZ19P.6	Citb R					
217	CZ19P.14	Citb F	551 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
218	CZ19P.14	Citb R					
219	CZ19P.15	Citb F	556 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
220	CZ19P.15	Citb R					
221	CZ19P.16	Citb F	557 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
222	CZ19P.16	Citb R					
223	CZ19P.25	Citb F	555 pb	510 pb	99.28%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
224	CZ19P.25	Citb R					
225	CZ19P.27	Citb F	560 pb	510 pb	100%	100%	<i>T. brasiliensis</i>
226	CZ19P.27	Citb R					

APÊNDICE E – TABELA 4. Sítios variáveis entre as sequências de MT-CYB de *Triatoma brasiliensis*, considerando a sequência H01 como referência. Para lista de haplótipos, ver Tabela 7.

H	n	Acesso GenBank	SÍTIOS VARIÁVEIS																																					
			3	11	21	26	27	36	72	75	81	87	108	117	138	165	187	231	249	273	324	330	339	342	352	387	390	396	407	429	430	448	450	459	489	498				
H01	9	AY336524 PP315985	G	T	A	T	G	C	A	A	G	A	T	C	G	C	A	T	T	A	T	T	T	G	G	T	C	G	T	T	A	G	A	T	C	C				
H02	5	PP315986	A	A	
H03	31	PP315987	A	
H04	1	PP315988	A	G		
H05	2	PP315989	A	
H06	6	PP315990	.	.	.	A	A	.	.	C	C	C	.	.	
H07	8	PP315991	G	.	.	.	T	G	.	C	.	
H08	1	PP315992	C	.	A	.	.	.	G	C	
H09	3	PP315993	G	A	.	.	G	G	.	.	.	
H10	1	PP315994	.	.	.	A	A	C	
H11	3	PP315995	A	A	
H12	6	PP315996	A	C	
H13	1	PP315997	A	A	
H14	1	PP315998	A	.	.	.	G	C	.	.	.	T	
H15	1	PP315999	.	C	A	T	
H16	11	PP316000	.	C	G	C	.	A	
H17	10	PP316001	A	.	A	C
H18	4	PP316002	A	.	A	C	A
H19	1	PP316003	C	.	A
H20	1	PP316004	.	.	.	C	A	T	.
H21	1	PP316005	G	C	A
H22	2	PP316006	T	A	C
H23	1	PP316007	G	C	T	.

APÊNDICE F – TABELA 5. Agrupamentos da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para populações de *Triatoma brasiliensis* com base em sequências MT-CYB, indicando os locais de coleta e as variações percentuais (%) em diversos níveis hierárquicos: entre grupos (Φ_{ct}), entre populações dentro de grupos (Φ_{sc}) e dentro de populações (Φ_{st}), considerando os índices de maior valor com intervalo de confiança significativo ($p > 0,05$) como indicador de agrupamentos geneticamente viáveis. Os grupos aninhados indicaram agrupamento intuitivo e testes cegos, mostrando o valor mais significativo para a variação entre grupos de populações em negrito. (*) Valores de p significativos.

Teste	Agrupamentos	Pontos de amostragem	Φ_{ct} Entre Grupos			Φ_{sc} Entre Populações Dentro de Grupos			Φ_{st} Dentro de Populações		
			%	Φ_{ct}	p	%	Φ_{sc}	p	%	Φ_{st}	p
1		Todos os pontos de coleta							60.44	0.395	< 10-5*
2	Por ecótopo	Peridomiciliar (CN69P + CN71P + CN74P + CN76P + CN81P + CN84P + CN86P) Selvagem (CN72S + CN77S + CN83S + CN87S)	-6.36	-0.06355	0.97673	44.05	0.41418	< 10-5*	62.31	0.37695	< 10-5*
3	Distribuição geográfica	Norte (CN71P + CN72S + CN81P) Central (CN69P + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S) Sul (CN86P)	14.25	0.14247	0.09693	28.80	0.33580	< 10-5*	56.96	0.43043	< 10-5*
4	Localidades de coleta	S. Malhada (CN71P + CN81P) Furna da Onça (CN72S) F. Cacimba da Pedra (CN74P) F. Barra da Areia (CN69P + CN83S + CN84P) S. Morada do Mocó (CN76P + CN77S) B. Paizinho Maria (CN87S) S. Areias de Baixo (CN86P)	60.40	0.00834	0.49059	0.83	0.39093	< 10-5*	38.77	0.39602	< 10-5*
5	2	Norte 1 (CN81P) Exceto Norte 1 (CN69P + CN71P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN86P + CN87S)	33.38	0.33383	0.09119	22.35	0.33548	< 10-5*	44.27	0.55731	< 10-5*
6	3	Norte 1 (CN81P)	35.51	0.35512	0.0361*	17.46	0.27079	< 10-5*	47.03	0.52975	< 10-5*

		Sul (CN86P) Exceto Norte 1 and Sul (CN69P + CN71P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)									
		Norte 1 (CN81P) Norte 2 (CN71P)									
7	4	Sul (CN86P) Central (CN69P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)	42.50	0.4250	0.00535*	9.15	0.15909	< 10 ⁻⁵ *	48.35	0.51648	< 10 ⁻⁵ *
		Norte 1 (CN81P) Norte 2 (CN71P) CN72S									
8	5	Sul (CN86P) Central (CN69P + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)	36.79	0.36787	0.01663*	10.29	0.16283	< 10 ⁻⁵ *	52.92	0.47080	< 10 ⁻⁵ *
		Norte 1 (CN81P) CN71P + CN72S									
9	5	Sul (CN86P) CN74P Central (CN69P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)	33.41	0.33405	0.00772*	11.58	0.17383	0.00327	55.02	0.44981	< 10 ⁻⁵ *
		Norte 1 (CN81P) Norte 2 (CN71P) CN72S									
10	6	Sul (CN86P) CN74P Central (CN69P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)	40.19	0.40189	0.00683*	5.36	0.08957	0.00040	54.45	0.45546	< 10 ⁻⁵ *
		Norte 1 (CN81P) North2 (CN71P) CN72S									
11	7	Sul (CN86P) CN74P CN87S Central (CN69P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P)	37.99	0.37992	0.00970*	5.1	0.08224	0.00525	56.91	0.43092	< 10 ⁻⁵ *
		Norte 1 (CN81P) Norte 2 (CN71P) CN72S									
12	7	Sul (CN86P)	36.47	0.36472	0.00436*	5.55	0.08728	0.00703	57.98	0.42017	< 10 ⁻⁵ *

APÊNDICE G – TABELA 6. Lista das 95 amostras (e controle) incluídas no pool de bibliotecas de GBS, indicando os resultados da análise de qualidade quanto o total de leituras (*reads*) por amostra, as leituras de baixa qualidade (filtradas e descartadas) e as leituras retidas. Também são identificadas as amostras utilizadas nas análises de seleção e diversidade, e as amostras retiradas das análises de seleção e diversidade (CN71P_1, CN71P_6, CN76P_2, CN76P_12, CN77S_8, CN83S_6, CN84P_2, CN85D_1, CN86P_3).

Amostra	Total de leituras	Leituras de baixa qualidade	Leituras retidas
<i>Amostras utilizadas nas análises de seleção e diversidade</i>			
CN87_8	2805542	1943	1170366
CN69_6	2664635	30836	1008376
CN84_1	2372790	18872	987709
CN74_1	2263063	18022	941383
CN84_3	2327790	18506	899006
CN69_9	2071641	16572	839813
CN72_12	2031047	9086	839565
CN83_5	1843280	14811	760643
CN71_4	1835671	21729	756896
CN81_7	1887456	22597	746936
CN76_8	1819966	13666	745404
CN84_4	1807550	14478	733124
CN81_4	1677627	1166	691955
CN69_10	1709359	19635	683087
CN77_4	2514001	16986	674687
CN72_9	1606458	12983	662393
CN86_4	1587778	12403	658623
CN86_6	1635254	1137	657603
CN86_2	1995610	1099	647583
CN71_2	1528724	990	628601
CN83_4	1572959	1030	614037
CN71_3	1526909	17638	610738
CN77_3	1470257	1024	598369
CN77_1	1568005	907	590865
CN72_3	1454216	16704	587302
CN77_7	1462148	1011	572153
CN86_5	1445730	16071	569391
CZ19_25	1309195	5625	547437
CN74_4	1341172	15693	545957
CN76_6	1345363	16057	536572
CZ19_6	1338967	5741	535382

CN72_14	1367954	953	532875
CN74_10	1312727	898	530154
CN87_9	1280559	5688	527519
CN71_9	1284483	10378	524843
CN83_2	1302103	15086	523457
CN71_10	1221077	5717	521223
CN87_6	1290284	14887	520558
CN72_6	1258432	14472	511238
CN74_13	1258129	9841	504116
CN73_2	1222923	5357	503033
CN81_2	1257123	10125	488275
CN75_1	1952022	962	486641
CN87_4	1460517	15783	477209
CN69_2	1121385	701	461650
CN81_3	1123282	12922	460341
CN81_6	1147966	4909	450757
CN76_10	1339034	10101	450227
CN76_1	1124046	13035	444221
CZ19_17	1076882	724	443295
CN69_11	1055963	8427	439125
CN87_5	992545	4496	396039
CN77_9	1007179	669	395166
CN76_15	1074593	659	387099
CN74_11	1185839	824	383872
CZ19_23	934281	576	375092
CN87_2	1008831	650	371441
CN72_13	880795	7102	365904
CN86_1	1290178	5306	347736
CN76_11	1057841	12004	346068
CN77_5	1084242	12223	345474
CN83_10	955451	567	333312
CN72_10	1141076	12699	332734
CN76_14	917653	526	332183
CN74_2	897591	494	312853
CN73_1	1150410	631	312769
CN74_7	689076	3215	296492
CN69_12	728970	449	293711
CN86_8	778424	456	277529
CN81_11	986051	443	273454
CN74_12	664950	439	265497
CN69_4	766703	5507	260800
CN83_3	639068	2652	252632
CN69_8	1135709	414	250949

CN84_5	923801	364	231473
CN72_2	739251	328	210945
CN81_8	816168	324	205036
CN86_10	485709	2023	191719
CZ19_14	809060	339	183941
CN77_2	942058	367	168472
CN83_9	912210	538	163496
CN71_5	636396	359	162118
CN72_8	440618	1787	156569
CN81_5	309247	1360	124627
CN87_3	426074	178	117541
CN87_11	309148	187	114633

Amostras retiradas das análises de seleção e diversidade

CN76_12	9264663	6156	2645343
CN86_3	3560890	19976	1570654
CN83_6	2181024	32362	651471
CN71_1	1397557	2998	97461
CN84_2	193698	699	41746
CN77_8	394638	139	37870
CN71_6	290332	83	36176
CN76_2	461428	86	15914
CN85_1	239110	40	15223

Controle sem DNA

branco	979	2	123
--------	-----	---	-----

APÊNDICE H – TABELA 7. *Loci* putativamente sob seleção, identificando o número sequencial do SNP, o número e a identidade (ID) atribuída a cada *locus*, a posição da base na TAG, a base putativamente referência (REF), a variação, e os valores de heterozigotidade (Ht) e diferenciação genética (Fst) de cada *locus*.

SNP	Locus	ID	Posição da base na TAG	REF	Varição	Ht	Fst
82	>CLocus_1007	1007_41	41	A	G	0,076215671	0,433057851
83	>CLocus_1013	1013_68	68	G	A	0,047699219	0,046115948
231	>CLocus_2975	2975_14	14	A	C	0,251715254	0,053658196
381	>CLocus_4708	4708_34	34	T	C	0,335127258	0,052634797
461	>CLocus_5592	5592_42	42	G	A	0,308390023	0,368040966
1113	>CLocus_11602	11602_32	32	C	T	0,217153353	0,267065772
1317	>CLocus_13423	13423_21	21	A	G	0,059217214	0,043488259
1384	>CLocus_13996	13996_99	99	G	A	0,063332625	0,234405594
1594	>CLocus_15649	15649_46	46	T	G	0,057352315	0,041455554
1635	>CLocus_15983	15983_100	100	A	T	0,450576605	0,273605274
2605	>CLocus_25592	25592_37	37	G	T	0,122599781	0,034633421

APÊNDICE I – TABELA 8. Resultados da busca no programa Blas2Go para identificação dos *loci* putativamente sob seleção, considerando a descrição dos resultados com maior score de similaridade.

Locus	Hits	Similaridade	Identificação taxonômica	Nome popular
CLocus 1007	5	Proteína de transporte de tricarboxilato, mitocondrial - putativa	<i>Nilaparvata lugens</i>	Gafanhoto marrom
		Proteína C0J52_25750 - hipotética	<i>Blattella germanica</i>	Baratinha ou Barata-germânica
		Proteína C0J52_13350 - hipotética	<i>Blattella germanica</i>	Baratinha ou Barata-germânica
		Proteína C0J52_05052, parcial - hipotética	<i>Blattella germanica</i>	Baratinha ou Barata-germânica
		Proteína C0J52_10764 - hipotética	<i>Blattella germanica</i>	Baratinha ou Barata-germânica
CLocus 4708	18	Proteína LOC105387281 não caracterizada - predita	<i>Plutella xylostella</i>	Traça-das-crucíferas
		Proteína LOC108253832 não caracterizada	<i>Diaphorina citri</i>	Psílídeo cítrico
		Proteína LOC109030848 não caracterizada - predita	<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca branca
		Proteína Lian-Aa1 retrotransposon	<i>Aedes aegypti</i>	Mosquito
		Produto não nomeado	<i>Callosobruchus maculatus</i>	Caruncho-do-feijão
		Proteína LOC105456897 não caracterizada - predita	<i>Wasmannia auropunctata</i>	Formiga Pixixica
		Proteína LOC105202882 não caracterizada	<i>Solenopsis invicta</i>	Formiga-de-fogo
		Proteína LOC105206999 não caracterizada	<i>Solenopsis invicta</i>	Formiga-de-fogo
		Dna polimerase RNA-directed; elemento móvel jockey-like - predita *	<i>Linepithema humile</i>	Formiga-argentina
		Proteína evm_014244 - hipotética	<i>Chilo suppressalis</i>	Perfuradora de arroz
		Dna polimerase RNA-directed; elemento móvel jockey-like - predita *	<i>Linepithema humile</i>	Formiga-argentina

		Proteína LOC105679230 não caracterizada - predita	<i>Linepithema humile</i>	Formiga-argentina
		Proteína evm_002549 - hipotética	<i>Chilo suppressalis</i>	Perfuradora de arroz
		Proteína TSAR_009273 - hipotética	<i>Trichomalopsis sarcophagae</i>	Vespa
		Caderina, parcial	<i>Operophtera brumata</i>	Traça de inverno
		Proteína evm_013751 - hipotética	<i>Chilo suppressalis</i>	Perfuradora de arroz
		Proteína LOC114352107 não caracterizada	<i>Ostrinia furnacalis</i>	Traça da grama
		Proteína LOC105669871 não caracterizada - predita	<i>Linepithema humile</i>	Formiga-argentina
Clocus	19	Proteína LOC113520032 não caracterizada, parcial	<i>Galleria mellonella</i>	Grande traça da cera
13996		Proteína LOC113005101 não caracterizada	<i>Solenopsis invicta</i>	Formiga-de-fogo
		Proteína LOC105197317 não caracterizada	<i>Solenopsis invicta</i>	Formiga-de-fogo
		Proteína PPYR_03764 - hipotética	<i>Photinus pyralis</i>	Vagalume oriental
		Proteína LOC105197509 não caracterizada	<i>Solenopsis invicta</i>	Formiga-de-fogo
		Proteína LOC111693302 não caracterizada	<i>Trichogramma pretiosum</i>	Vespa
		Proteína LOC112589069 não caracterizada	<i>Harpegnathos saltator</i>	Formiga-saltadora
		Proteína LOC108763993 não caracterizada - predita	<i>Trachymyrmex cornetzi</i> (<i>Paratrachymyrmex cornetzi</i>)	Formigas criadoras de fungo e cortadeiras
		Proteína LOC100876067 não caracterizada - predita	<i>Megachile rotundata</i>	Abelha cortadora de folhas de alfafa
		Proteína LOC114350993 isoforma X1 e X2 não caracterizada	<i>Ostrinia furnacalis</i>	Traça da grama
		Proteína LOC113002971 não caracterizada	<i>Solenopsis invicta</i>	Formiga-de-fogo
		Proteína LOC106652395 não caracterizada	<i>Trichogramma pretiosum</i>	Vespa
		Proteína LOC108780532 não caracterizada - predita	<i>Cyphomyrmex costatus</i>	Formiga

		Proteína LOC108777245 não caracterizada - predita	<i>Cyphomyrmex costatus</i>	Formiga
		Proteína LOC113005960 não caracterizada, parcial	<i>Solenopsis invicta</i>	Formiga-de-fogo
		Proteína LOC114344320 não caracterizada, parcial	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	Besouro
		Proteína LOC107042772 não caracterizada	<i>Diachasma alloeum</i>	Vespa
		Proteína LOC110373622 não caracterizada	<i>Helicoverpa armigera</i>	Lagarta-do-algodão
		Proteína LOC108769714 não caracterizada - predita	<i>Trachymyrmex cornetzi</i> (<i>Paratrachymyrmex cornetzi</i>)	Formigas criadoras de fungo e cortadeiras
Clocus	3	Proteína C0J52_14372 - hipotética	<i>Blattella germanica</i>	Baratinha ou Barata-germânica
15649		Proteína LSTR_LSTR013990 - hipotética	<i>Laodelphax striatellus</i>	Pequeno bicho-folha marrom
		Proteína LOC108914683 não caracterizada	<i>Anoplophora glabripennis</i>	Besouro asiático de chifres longos

APÊNDICE J – TABELA 9. Resultados da Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), indicando os cinco agrupamentos (clusters), indicando cada amostra atribuída com o número 1.

AMOSTRAS	CLUSTER1	CLUSTER2	CLUSTER3	CLUSTER4	CLUSTER5
CN69_10	1	1,22E-42	1,28E-70	4,27E-140	6,43E-48
CN69_11	1,17E-33	2,82E-90	1	2,31E-242	1,74E-74
CN69_12	1	3,59E-38	2,26E-72	4,85E-153	6,31E-42
CN69_2	9,07E-59	3,36E-97	6,19E-127	3,31E-240	1
CN69_4	9,93E-28	2,59E-67	5,97E-100	7,42E-190	1
CN69_6	6,38E-130	4,65E-176	4,76E-265	1	2,05E-203
CN69_8	1	3,63E-38	4,58E-87	7,98E-150	7,13E-47
CN69_9	1	3,30E-48	4,15E-69	3,08E-154	1,66E-45
CN71_10	3,04E-84	1,53E-139	1	4,78E-292	1,03E-123
CN71_2	1,52E-46	1	1,51E-133	2,92E-198	2,20E-90
CN71_3	1,57E-17	5,73E-58	1,03E-82	2,36E-193	1
CN71_4	1	1,00E-45	1,59E-83	1,77E-141	9,57E-40
CN71_5	1	1,34E-43	1,08E-66	1,38E-129	4,52E-43
CN71_9	1	9,26E-41	6,67E-72	8,48E-135	6,84E-42
CN73_1	1	1,12E-43	6,89E-64	1,95E-141	7,88E-55
CN73_2	1	1,35E-43	2,17E-86	5,62E-150	1,00E-41
CN74_1	8,79E-83	2,80E-137	1	3,20E-296	1,37E-123
CN74_10	1	5,28E-55	2,11E-69	4,81E-134	6,17E-42
CN74_11	1	5,69E-48	6,96E-60	2,61E-167	2,98E-49
CN74_12	1	3,15E-47	1,44E-74	2,06E-151	3,11E-50
CN74_13	8,59E-49	1	4,74E-139	1,11E-194	2,47E-86
CN74_2	1	2,46E-39	3,66E-71	2,86E-146	3,06E-42
CN74_4	8,58E-155	2,49E-205	1,05E-290	1	3,97E-229
CN74_7	1	2,31E-41	2,62E-81	3,52E-135	5,49E-44
CN75_1	1	4,87E-48	3,28E-78	8,10E-154	2,83E-44
CN76_1	1	3,06E-50	9,69E-65	1,31E-154	1,09E-46
CN76_10	1	2,98E-35	3,16E-82	3,00E-136	1,78E-50
CN76_11	1	2,96E-48	4,30E-66	9,02E-132	5,45E-52
CN76_14	1	1,82E-46	2,35E-70	3,37E-150	7,05E-49
CN76_15	1	2,35E-43	3,18E-72	1,64E-144	6,81E-45
CN76_6	1,42E-142	9,07E-193	2,35E-275	1	1,53E-211
CN76_8	1,77E-58	1,31E-93	9,03E-126	2,50E-231	1
CN81_11	1	2,55E-41	2,24E-78	3,43E-140	2,43E-50
CN81_2	1	1,01E-50	2,89E-77	8,45E-137	2,19E-41
CN81_3	4,66E-137	2,43E-182	9,23E-278	1	1,74E-207
CN81_4	5,89E-78	6,23E-137	1	8,47E-292	1,88E-114
CN81_5	1	4,87E-43	3,30E-71	2,53E-163	1,43E-35
CN81_6	1,27E-37	1	2,41E-117	7,65E-208	2,39E-73
CN81_7	1	5,79E-48	6,42E-75	3,07E-126	4,99E-45

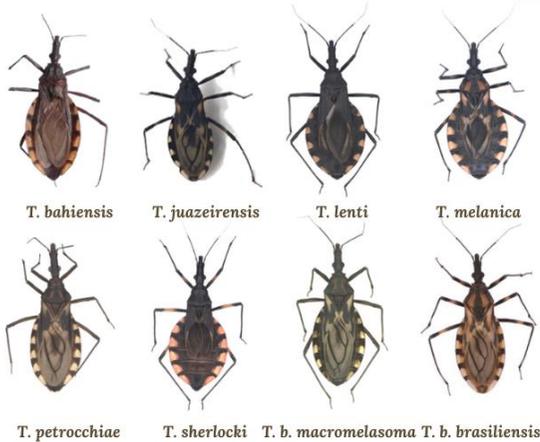
CN81_8	1	3,07E-41	1,57E-74	3,04E-135	1,75E-38
CN84_1	1,07E-56	1,07E-95	5,82E-121	9,60E-237	1
CN84_3	1,58E-135	1,88E-182	2,22E-272	1	6,99E-205
CN84_4	6,16E-166	1,90E-219	3,47E-304	1	1,87E-238
CN84_5	1	1,21E-47	5,06E-67	9,97E-151	1,18E-42
CN86_1	1	3,28E-46	1,40E-75	3,31E-153	4,15E-41
CN86_10	1	8,78E-45	1,88E-68	1,38E-141	3,32E-48
CN86_2	5,45E-43	1	3,05E-135	1,15E-185	4,14E-83
CN86_4	5,10E-52	5,06E-90	3,24E-110	2,72E-223	1
CN86_5	1	7,56E-44	3,08E-70	7,03E-152	3,85E-45
CN86_6	1,71E-22	1	3,01E-105	7,81E-164	3,69E-58
CN86_8	1	3,79E-46	1,31E-67	4,82E-174	1,83E-41
CZ19_14	1	5,37E-42	1,73E-70	1,10E-159	3,66E-43
CZ19_17	1	7,27E-40	2,65E-77	1,85E-149	2,38E-41
CZ19_23	1	3,14E-40	1,38E-68	1,20E-162	1,20E-43
CZ19_25	1	9,81E-40	8,52E-70	3,87E-155	3,21E-45
CZ19_6	5,43E-59	1	1,36E-140	2,13E-215	7,69E-101
CN72_10	1	3,48E-45	1,87E-76	3,70E-142	3,72E-47
CN72_12	2,18E-144	1,95E-194	3,21E-282	1	7,09E-215
CN72_13	1	5,27E-41	4,08E-50	1,85E-163	4,15E-40
CN72_14	1	4,72E-51	3,10E-78	5,17E-132	4,19E-48
CN72_2	1	4,92E-44	8,81E-79	2,85E-140	2,95E-41
CN72_3	1	8,72E-48	2,92E-69	5,88E-147	1,26E-45
CN72_6	1	2,90E-48	1,87E-75	2,14E-138	5,37E-51
CN72_8	1	1,77E-47	1,74E-58	1,14E-145	7,86E-51
CN72_9	1	4,70E-40	7,14E-74	6,33E-153	6,12E-45
CN77_1	1	6,68E-50	2,22E-75	1,72E-136	4,07E-44
CN77_2	1	3,14E-45	2,95E-61	2,58E-152	4,15E-39
CN77_3	1	7,01E-48	6,06E-68	9,98E-156	2,91E-47
CN77_4	1	2,19E-41	1,26E-76	6,97E-144	1,04E-40
CN77_5	1	1,47E-43	3,09E-70	1,05E-152	1,45E-50
CN77_7	1	9,42E-44	8,01E-76	1,16E-107	1,38E-44
CN77_9	1	2,64E-44	2,49E-82	8,41E-145	7,58E-43
CN83_10	1	8,87E-43	6,79E-73	1,86E-152	5,30E-36
CN83_2	1	7,87E-38	1,50E-74	1,88E-151	8,45E-42
CN83_3	1	3,27E-36	1,43E-64	9,65E-157	1,62E-46
CN83_4	1	2,15E-42	1,07E-78	3,02E-154	2,37E-47
CN83_5	1,48E-33	1	1,97E-114	3,73E-187	2,97E-70
CN83_9	1	2,09E-40	3,87E-73	6,91E-132	5,33E-47
CN87_11	1	1,92E-37	1,50E-72	2,27E-134	2,78E-44
CN87_2	1	3,66E-46	2,01E-66	3,11E-164	8,33E-37
CN87_3	1	1,11E-38	9,45E-78	2,41E-122	1,12E-43
CN87_4	1	2,68E-44	7,54E-61	1,47E-159	4,76E-42

APÊNDICE K – PROPOSTA DE FOLHETO: Versão de folheto para vinculação local, em atendimento às políticas de controle vetorial, enfatizando o complexo *brasiliensis*. O material inclui informações visuais sobre o comportamento do bafeiro, bem como características da doença de Chagas, suas manifestações agudas e crônicas, o agente etiológico, as formas de transmissão e os ciclos envolvendo vetores, homem, animais silvestres e domésticos. Ainda, é possível identificar nominalmente as imagens de cada membro do complexo *brasiliensis*, os estados e áreas de ocorrência. Na parte posterior do folheto, são fornecidas informações de ação caso algum inseto seja encontrado. O folheto foi confeccionado utilizando a ferramenta Canva, cujas figuras foram produzidas e editadas nos programas CorelDraw X7 versão 17.1.0.572 e Power Point Office Microsoft 365, utilizando imagens vetoriais gratuitas de bancos de dados online, imagens de paisagens geradas por ferramentas de inteligência artificial do Microsoft Designer (IA creator) e outras imagens de Chagas (1909); Costa *et al.* (2013); Pérez-Molina; Molina (2018), Dale *et al.* (2018), e da Coleção de Triatominae FCFAR - Unesp Araraquara, devidamente creditadas. As instituições de apoio e fomento também foram creditadas, sendo Ministério da Saúde, Sistema Único de Saúde (SUS), Governo do Rio Grande do Norte, Prefeitura de Currais Novos, Fundação de Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo (FAPESP) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ).

SOMOS PARENTES!!!

Pertencemos a um grupo que habita florações rochosas em ambientes silvestres da caatinga e nos distribuímos por toda a região semiárida do Nordeste do Brasil nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte e também no cerrado de Minas Gerais.

COMPLEXO TRIATOMA BRASILIENSIS



E SE VOCÊ NOS ENCONTRAR...

- Informe as autoridades de saúde da sua região.
- Autorize a inspeção e aplicação de inseticidas pelos profissionais de saúde coletiva.
- Não tente tocar nos insetos sem proteção individual.
- Não tente matar o inseto, pois isso aumenta o risco de disseminação da infecção.
- Realize limpeza minuciosa e periódica da sua casa, reparando em frestas, buracos e outros possíveis esconderijos.
- Higienize bem os alimentos.
- Se possível, planeje a instalação de telas de proteção nas suas janelas.

Em caso de emergência, entre em contato com a Secretária de Saúde local.

VOCÊ ME
VIU POR
AÍ?





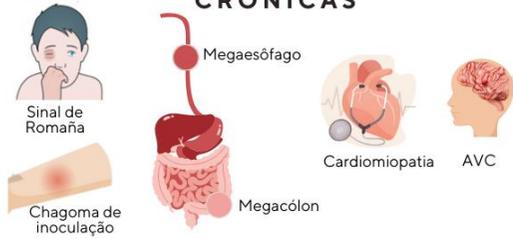
T. b. brasiliensis

DOENÇA DE CHAGAS

- Apelido: **BARBEIRO**
- Profissão: **VETOR**
- Hobby: **INVADIR CASAS**
- Meio de transporte: **CARONA NA PREÁ**



MANIFESTAÇÕES AGUDAS E CRÔNICAS



AGENTE ETIOLÓGICO

Trypanosoma cruzi



FORMAS DE TRANSMISSÃO

REPASTO SANGUÍNEO



Hábito do vetor de se alimentar de sangue do hospedeiro

Infecção pelo *T. cruzi* presente das fezes do vetor, através do local de inoculação

CONTAMINAÇÃO ORAL

Ingestão acidental do inseto ou fezes contaminadas

CONTAMINAÇÃO ORAL OU MANIPULAÇÃO DE ANIMAIS INFECTADOS OU INFESTADOS



Consumo de carne crua de animais infectados ou contato com animais infestados de vetores (adultos e ninfas)

Contato com o *T. cruzi* eliminado pelas glândulas odoríferas anais de marsupiais

TRANSMISSÃO VERTICAL

Contato com o parasito via placentária ou pelo canal de parto



CICLOS E SUAS SOBREPOSIÇÕES



TEXTO E DESIGN: Maria Carolina Viana

Prefeitura de Currais Novos

SUS

FapesQ-PB

RIO GRANDE DO NORTE

MINISTÉRIO DA SAÚDE

GOVERNO FEDERAL

FAPESP

Referências imagens: Bancos de imagens gratuitas (Freeipk); Microsoft Designer (IA creator); Canva; Coleção de Triatominae FCFAR - Unesp Araraquara; Chagas, 1909; Costa et al., 2013; Mendonça et al., 2016; Perez-Molina; Molina, 2018; Dale et al. 2018.

APÊNDICE L – ARTIGO DA TESE

MANUSCRITO

* Sem o item REFERÊNCIAS.

Population genetics and genomics of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil

Maria Carolina Viana^{a,b,c}, Alessandro Alves-Pereira^d, Marcelo A P Oliveira^e, Carolina Valença-Barbosa^{a,f}, Elaine Folly-Ramos^g, Anete P Souza^d, Daniela M Takiya^h, Carlos E Almeida^{a,b,h}

^aInstituto de Biologia (IB), Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil; ^bPrograma de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, IB, UNICAMP; ^cCoordenação de Prevenção e Vigilância do Câncer (CONPREV), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil;

^dDepartamento de Biologia Vegetal, IB, UNICAMP; ^ePrograma de Pós-Graduação em Genética–IB, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil; ^fGrupo Triatomíneos, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Fiocruz, Brazil; ^gUniversidade Federal da Paraíba, Campus IV, Rio Tinto, Brazil, ^hLaboratório de Entomologia, Instituto de Biologia, UFRJ.

Abstract

Understanding the population dynamics of vectors is crucial for effective control of vector-borne diseases. In the Northeastern Brazilian semi-arid region, *Triatoma brasiliensis* persists as the most significant Chagas disease vector, frequently displaying persistent domiciliary infestation. This situation raises relevant public health concerns in the municipality of Currais Novos in the state of Rio Grande do Norte. This area has experienced a high prevalence of peri-domiciliary re-infestations by *T. brasiliensis*, coupled with elevated rates of *Trypanosoma cruzi* infection. Therefore, we assessed the distribution of genetic variation via mitochondrial *Cytochrome b* gene (MT-CYB) sequencing ($n=109$) and single nucleotide polymorphisms (SNPs, $n=86$) to assess the gene flow among distinct populations distributed in varied geographic spots and environments, mainly sylvatic and peridomiciliary. Insects were collected from rural communities at Currais Novos, enclosed within a 16 km radius. Sampling included 13 populations: one intradomiciliary, eight peridomiciliary, and four sylvatic. Furthermore, an external population located 220 km from Currais Novos was also included in the study. The method employed to obtain SNP information relied on ddRAD-seq genotyping-by-sequencing (GBS), enabling a genome-wide analysis to infer genetic variation. Through AMOVA analysis of MT-CYB gene variation, we identified four distinct population groups with statistical significance ($F_{CT}= 0.42$; $p<0.05$). We identified a total of 3,013 SNPs through GBS, with 11 loci

showing putative signs of being under selection. The variation based on 3,002 neutral loci evidenced low genetic structuration based on low F_{ST} values ($p > 0.05$), indicating local panmixia. However, Monte Carlo resampling algorithms pointed out that three samples from the external population were assigned (>98%) in a cluster contrasting from the ones putatively under local panmixia – validating the newly applied genome-wide marker for studies on the population genetics at finer-scale resolution for *T. brasiliensis*. The presence of population structuring in some of the sampled points, as suggested by the mitochondrial marker, leads us to assume that infestations were probably initiated by small populations of females – demographic event poses a risk for rapid re-infestations. The local panmictic pattern revealed by the GBS marker poses a challenge for vector control measures, as re-infestation foci may be distributed over a wide geographical and ecological range. In our dataset, the results demonstrated that the genetic signals from both markers were complementary. Therefore, it is essential to consider the nature and inheritance pattern of each marker when inferring the pattern of re-infestations.

Keywords: Vector-borne disease; Chagas disease; ecoepidemiology; vector dispersal; genotyping.

Corresponding authors: almeida_ce@hotmail.com and mcarolviana@gmail.com. ¹Carlos Eduardo Almeida, Laboratório de Entomologia – UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia, Departamento de Zoologia, Rio de Janeiro – RJ, Cidade Universitária, 373 Sala A1-107, CEP 21941-902. ²Maria Carolina Viana, Coordenação de Prevenção e Vigilância do Câncer (CONPREV), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro – RJ, Rua Marquês de Pombal, 125 CEP 20230-240.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107144C>



Population genetics and genomics of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil

Maria Carolina Viana^{a,b,c}, Alessandro Alves-Pereira^d, Marcelo A P Oliveira^e, Carolina Valença-Barbosa^{a,f}, Elaine Folly-Ramos^g, Anete P Souza^d, Daniela M Takiya^h, Carlos E Almeida^{a,b,h,*}

^a Instituto de Biologia (IB), Universidade de Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, IB, UNICAMP

^c Coordenação de Prevenção e Vigilância do Câncer (CONPREV), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

^d Departamento de Biologia Vegetal, IB, UNICAMP

^e Programa de Pós-Graduação em Genética – IB, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

^f Grupo Triatomíneo, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas, Brazil

^g Universidade Federal da Paraíba, Campus IV, Rio Tinto, Brazil

^h Laboratório de Entomologia, Instituto de Biologia, UFRJ

ARTICLE INFO

Keywords:

Vector-borne disease
Chagas disease
Ecoepidemiology
Vector dispersal
Genotyping

ABSTRACT

Understanding the population dynamics of vectors is crucial for effective control of vector-borne diseases. In the Northeastern Brazilian semi-arid region, *Triatoma brasiliensis* persists as the most significant Chagas disease vector, frequently displaying recurrent domiciliary infestations. This situation raises relevant public health concerns in the municipality of Currais Novos in the state of Rio Grande do Norte. This area has experienced a high prevalence of peridomiciliary re-infestations by *T. brasiliensis*, coupled with elevated rates of *Trypanosoma cruzi* infection. Therefore, we assessed the distribution of genetic variation via mitochondrial Cytochrome b gene (MT-CYB) sequencing ($n = 109$) and single nucleotide polymorphisms (SNPs, $n = 86$) to assess the gene flow among distinct populations distributed in varied geographic spots and environments, mainly sylvatic and peridomiciliary. Insects were collected from rural communities at Currais Novos, enclosed within a 16 km radius. Sampling included 13 populations: one intradomiciliary, eight peridomiciliary, and four sylvatic. Furthermore, an external population located 220 km from Currais Novos was also included in the study. The method employed to obtain SNP information relied on ddRAD-seq genotyping-by-sequencing (GBS), enabling a genome-wide analysis to infer genetic variation. Through AMOVA analysis of MT-CYB gene variation, we identified four distinct population groups with statistical significance ($F_{CT} = 0.42$; $p < 0.05$). We identified a total of 3,013 SNPs through GBS, with 11 loci showing putative signs of being under selection. The variation based on 3,002 neutral loci evidenced low genetic structuration based on low F_{ST} values ($p > 0.05$), indicating local panmixia. However, resampling algorithms pointed out that three samples from the external population were assigned (>98 %) in a cluster contrasting from the ones putatively under local panmixia – validating the newly applied genome-wide

Abbreviations: CN, Currais Novos municipality; MT-CYB, mitochondrial Cytochrome b gene; SNPs, single nucleotide polymorphisms; n, sample number; km, kilometer; RADseq, restriction-site associated DNA sequencing; GBS, genotyping-by-sequencing; CD, Chagas disease; RN, Rio Grande do Norte state; CZ, Cajazeiras municipality; PB, Paraíba state; S, sylvatic ecotope; P, peridomiciliary ecotope; D, domiciliary ecotope; PCR, Polymerase chain reaction; GB, GenBank; MJ, median-joining reconstruction; AMOVA, Analysis of hierarchical distribution of the genetic variation; F_{ST} , genetic differentiation; R_{ST} , F_{ST} derived; IBD, isolation by distance; MAF, minor allele frequency; PCA, Principal Component Analysis; A, total number of alleles; A_{ik} , allelic richness; H_{ik} , observed heterozygosity; H_{ek} , expected heterozygosity; F_{is} , inbreeding coefficients; K, number of genetic clusters; BIC, Bayesian Information Criterion; DAPC, Discriminant Analysis of Principal Components; HW, Hardy-Weinberg; LD, linkage disequilibrium; H, haplotypes; Hd, haplotypic diversity; F_{CT} , variation among groups of populations; r, correlation between genetic and geographic distances; Φ_{st} , Pairwise estimates of genetic divergence among populations; Φ_{sc} , variation among individuals within populations; d.f., degree of freedom; TE, Transposable Elements.

* Corresponding authors: ¹Carlos Eduardo Almeida, Laboratório de Entomologia – UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biologia, Departamento de Zoologia, Rio de Janeiro – RJ, Cidade Universitária, 373 Sala A1-107, CEP 21941-902. ²Maria Carolina Viana, Coordenação de Prevenção e Vigilância do Câncer (CONPREV), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro – RJ, Rua Marquês de Pombal, 125 CEP 20230-240.

E-mail address: almeida.ce@hotmail.com (C.E. Almeida).

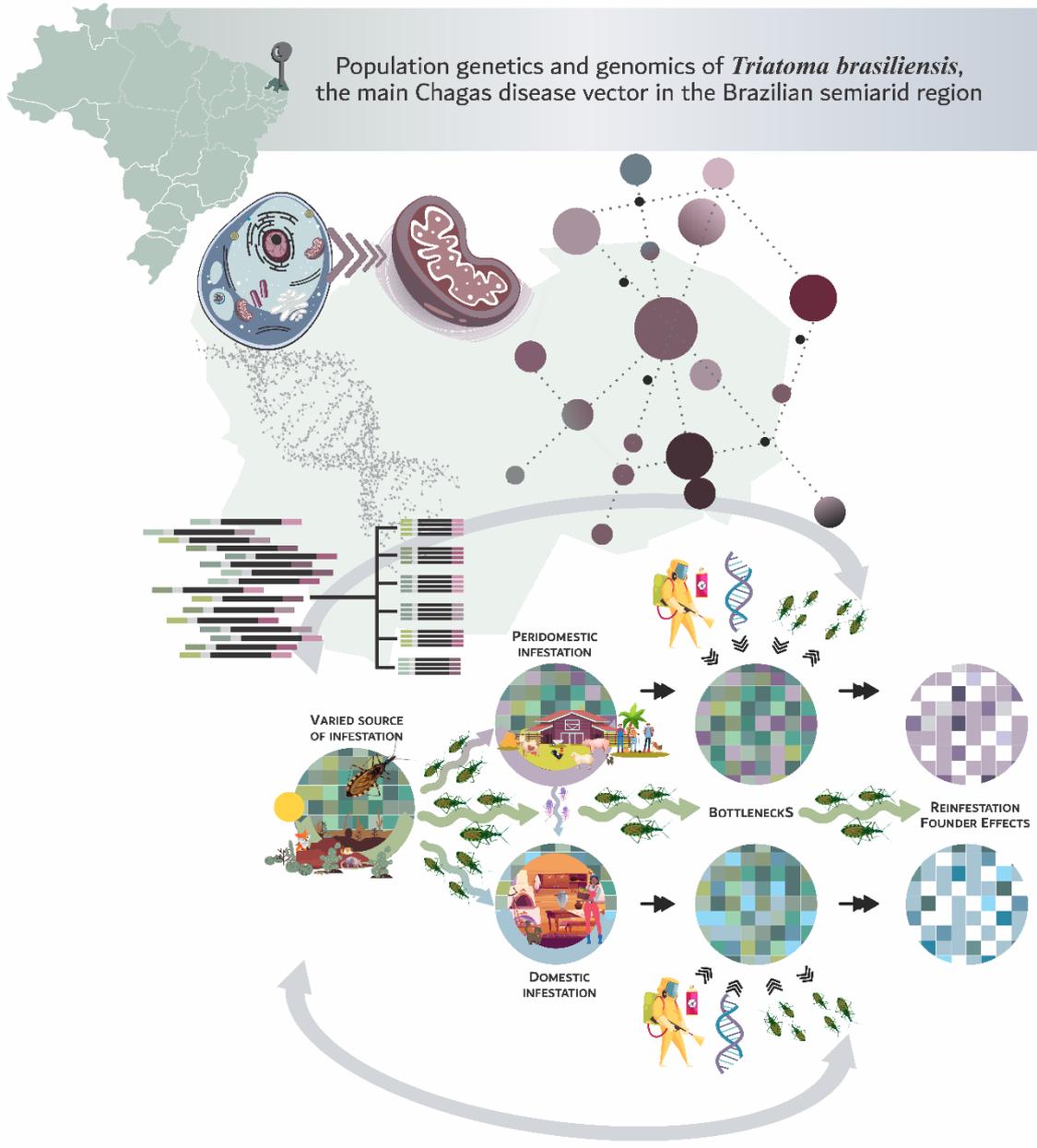
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107144>

Received 28 November 2023; Received in revised form 5 February 2024; Accepted 6 February 2024

Available online 7 February 2024

0001-706X/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

Graphical Abstract



1. Introduction

Chagas disease (CD), also known as American Trypanosomiasis, is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* and results in an estimated annual death toll of around 14,000 individuals (Schmunis & Yadon, 2010; Groom et al., 2017; World Health Organization, 2018). Vectors CD are blood-feeding insects belonging to the Triatominae subfamily (Hemiptera: Reduviidae) Lent & Wygodzinsky (1979). Over 155 triatomine species have been described, with only a dozen of them carrying epidemiologic significance (Costa et al., 2021; Gorla et al., 2022) due to their capacity to infest domiciles in rural communities. However, the epidemiological scenario is continually changing, and 10 triatomine species have already been recorded in urban settings in Brazil (Carbajal-de-la-Fuente et al., 2022). The epidemiological significance of triatomines varies and depends on their roles in both sylvatic and peridomestic transmission cycles (Fernandes et al., 1994; Zingales et al., 1998; Miles, 2003; Lima et al., 2008; Gurgel-Gonçalves et al., 2012; Costa et al., 2021). These insects feed on the blood of various vertebrates and are typically associated with their host's habitats, which can include nests, tree trunks, rocky outcrops, palm trees, cacti, and other environments (Sarquis et al., 2004, 2010; Valença-Barbosa et al., 2014; Galvão and Justi, 2015; Gorla and Noireau, 2017; Lima-Neiva et al., 2021).

According to many authors (Romaña et al., 2003; Coura et al., 2014; Galvão & Justi, 2015), anthropic environmental changes often result in peridomestic vector invasion and infestation. However, for others (Schofield et al., 1999; Leite et al., 2011; Waleckx et al., 2015), various factors could contribute to triatomine adaptation or even invasions into anthropic habitats. In either scenario, the proximity between insect vectors and humans poses a significant threat of *T. cruzi* infections (Lilioso et al., 2017).

In the semi-arid region of Northeastern Brazil, species belonging to the *Triatoma brasiliensis* species complex serve as primary vectors of CD (Costa et al., 2003; 2014; Bezerra et al., 2014, 2018,

2020; Lilio et al., 2017; Lima-Neiva et al., 2021; Ribeiro-Jr et al., 2021). This group comprises eight taxa (*T. bahiensis*, *T. brasiliensis brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. melanica*, *T. petrocchia*, and *T. sherlocki*) that inhabit rocky outcrops in sylvatic or peridomiciliary environments throughout the entire semi-arid region of Northeastern Brazil (Costa et al., 2006, 2013; Costa & Félix, 2007; Mendonça et al., 2016; Oliveira et al., 2017; Dale et al., 2018; Ribeiro-Jr et al., 2021). The nominal species within the *Triatoma brasiliensis* species complex (*T. brasiliensis* ssp.) are known to occur in the states of Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Paraíba, and Rio Grande do Norte, all situated north of the São Francisco River. This known occurrence data covers an area of approximately 1.6×10^6 km² within the ecoregion referred to as the "Depressão Sertaneja Setentrional" in the Caatinga biome (Costa et al., 2003, 2014). Within the members of this species complex, *T. b. brasiliensis* (referred to here as *T. brasiliensis* for simplicity) stands out as the most significant vector. This is due to its combination of the highest rates of *T. cruzi* prevalence and the broadest distribution across various geographic and ecotypic scales (Barbosa-Silva et al., 2016; Lilio et al., 2017; Costa et al., 2020; Lima-Neiva et al., 2021; Ribeiro-Jr et al., 2021). Monsalve-Lara et al. (2021) proposed that *T. brasiliensis* played a crucial role in a CD outbreak that transpired in Marcelino Vieira, located at Rio Grande do Norte (RN) state of Brazil in 2016 (Vargas et al., 2018).

The dynamics and maintenance of infectious disease endemicity are influenced by the distributional pattern and population densities of vectors, hosts, and pathogens (Magori & Drake, 2013; Cator et al., 2020), as already addressed for *T. brasiliensis* (Carbajal-de-la Fuente et al., 2007). The use of molecular markers raises essential questions that are critical for improving vector control measures (Almeida et al., 2024). These inquiries depend on our capacity to enhance our understanding of the source for infestation through population genetics approaches. Specifically, researchers seek to determine whether these invaders originate from small, highly adapted domiciliary populations within human-made environments, or if sylvatic populations also possess the capacity to infest

artificial settings. Almeida et al. (2008, 2016) documented gene flow between wild and domiciliary populations of *T. brasiliensis* in the municipalities of Lagoa Tapada (Paraíba state; PB) and Caicó (RN). This was achieved by analyzing mitochondrial *Cytochrome b* gene variation (MT-CYB) in combination with microsatellites (eight loci). The results suggested that *T. brasiliensis* exhibits genetic structuring at a small geographic scale, pointing to a certain level of differentiation among ecotypic populations from anthropic habitats. Instead, Bezerra et al. (2020) conducted a study on the dynamics of domiciliary infestation and re-infestation over time in Tauá municipality, Ceará, Northeastern Brazil, focusing on a microgeographic scale. These researchers employed microsatellite analyses (utilizing five loci) and revealed weak genetic structuring over time and across different ecotopes among all populations analyzed in the study area.

In the state of RN, a concerning epidemiological scenario has been observed, characterized by persistent peri-domiciliary infestation by *T. brasiliensis* populations. These populations often exhibit a high prevalence (up to 100%) of natural *T. cruzi* infection (Barbosa-Silva et al., 2016; Lilioso et al., 2017; Araújo-Neto et al., 2019; Honorato et al., 2021; Monsalve-Lara et al., 2021). The situation is of particular concern in Currais Novos (CN) municipality, where there have been observed persistent and rapid reinfestations shortly after insecticide spray treatments (Lilioso et al., 2017, 2020; Kamimura et al., 2020). Despite some progress in understanding the genetic structure of *T. brasiliensis* using markers, such as MT-CYB and microsatellites, it is worth noting that these markers offer limited resolution (Allendorf, 2017) when employed in small geographic areas due to their reliance on often fewer than eight loci (Almeida et al., 2016, Bezerra et al. 2020). Hence, genotype-by-sequencing is the preferred method for studying gene flow in vectors, thanks to its capacity to simultaneously analyze thousands of loci, with valuable applications in assessing gene flow for mosquitoes (Neafsey et al., 2010; Campos et al., 2017), ticks (Van Zee et al., 2015), phlebotomines (Pathirage et al., 2021), triatomines (Hernandez-Castro et al., 2017), among others. We analyzed the

distribution pattern of genetic variation within the municipality of Currais Novos, which is known for its high peri- domiciliary *T. brasiliensis* reinfestation pressure in RN, Brazil (Lilioso et al., 2017), by using SNPs in combination with variations of the *Cytochrome b* gene. In this study, we conducted research on a micro-geographic scale to examine the influence of geographical and ecotypic forces in shaping the distribution of genetic variation of *T. brasiliensis*. Additionally, we have established a genome-wide resource for population genetics analysis for this taxon at a finer scale resolution.

2. Material and methods

2.1. Sampling and study area

Samples were collected in the semiarid northeastern region of Brazil, specifically within the Caatinga biome, Seridó Oriental microregion, RN state. Our study focused on Currais Novos, a municipality where *T. brasiliensis* persistently re-infests human dwellings despite extensive insecticide efforts. For example, about two years prior to our 2015 field expedition, there was a comprehensive insecticide house spraying campaign, followed by re-inspection for re-infestation (with houses re-treated when reinfestation was detected; personal communication with Lucia A Aguiar, Health Department). Our sampling included 13 populations within a 16 km radius, comprising one intradomiciliary, eight peridomiciliary, and four sylvatic populations. Additionally, for comparison, we included nine samples from Cajazeiras (CZ) municipality in PB state, located over 220 km away from Currais Novos, serving as an external reference population. Triatominae collections were conducted manually during a single field expedition in March and April 2015. We targeted artificial ecotopes, including indoor areas (inside households) and peridomiciliary structures (such as chicken coops, goat and pig corrals, as well as piles of timber and bricks). Additionally, we collected specimens from rocky outcrops representing the sylvatic ecotope. The field team consisted of six trained collectors, including local vector control surveillance personnel from Currais Novos (CN, RN) and Cajazeiras (CZ, PB). Domiciliary environments refer to the indoor spaces of typical

houses. Peridomiciliary ecotopes are the areas surrounding domiciles, where triatomines were found in structures built for local people's subsistence, such as chicken coops, goat/pig/cattle corrals, and similar areas. Sylvatic ecotopes consist of natural structures like rocky outcrops, located over 200 meters away from peridomiciliary environments, where native animals like sylvatic rodents, snakes, and lizards are often observed. Sylvatic ecotopes were represented by natural structures composed of rocky outcrops (>200m apart from peridomiciliary environments). Each collection point was selected based on both geographic (collection location) and environmental (ecotypic) criteria.

Health Department trained personnel supported us during our visits, encompassing all inhabited houses to search for triatomines. Likewise, we systematically surveyed all visible rocky outcrops to ensure a comprehensive sampling across the municipality, under both ecotypic and spatial grounds. The collected insects were preserved in 100% ethanol and later identified based on their external morphological characteristics, utilizing taxonomic keys (Costa et al., 2013; Dale et al., 2018). Molecular confirmation is explained in the following sections.

Population definition –We utilized fifth-stage nymphs (N5) to prioritize residents over potential invaders, as N5 represents the older stage that is unable to fly (Jurberg et al., 1986). Populations were distinguished using acronyms: (i) the initial two letters denoted the cities, Currais Novos-RN (CN), and Cajazeiras-PB (CZ); (ii) numerical values differentiated the specific sampling locations; (iii) the final letter indicated the ecotope category: sylvatic (S), peridomiciliary (P), and domiciliary (D). Further details, including collection sites geocoordinates, sample sizes for each marker, can be found in Table 1 and Additional Table S1.

Table 1. Collection sites, samples (*n*) analyzed for MT-CYB, samples (*n*) analyzed for GBS, ecotope, localities, sample number of nymphs (N) and adults (A).

Population ID	Samples used for the analysis			Locality	Collected samples		
	MT-CYB (<i>n</i>)	GBS (<i>n</i>)	Ecotope		N	A	Total
CN75D	1	1	Domiciliary	Cacimba da Pedra	13	1	14
Total of nymphs and adults individually at domiciliary ecotope					13	1	14
Total for domiciliary ecotope					14		14
CN69P	10	8	Peridomiciliary	B. da Areia	458	61	519
CN71P	10	6		Malhada	47	5	52
CN73P	1	2		F. da Onça	2	2	4
CN74P	8	8		C. da Pedra	1	15	16
CN76P	10	7		M. do Mocó	77	17	94
CN81P	10	8		Malhada	91	5	96
CN84P	5	4		B. da Areia	7	4	11
CN86P	10	7		A. de Baixo	418	45	463
Total of nymphs and adults individually at peridomiciliary ecotope					1,101	154	
Total for peridomiciliary ecotope					1,255		
CN72S*	10	9	Sylvatic	F. da Onça	40	5	45
CN77S*	8	7		M. do Mocó	16	7	23
CN83S*	9	6		B. da Areia	147	73	220
CN87S	10	8		P. Maria	44	14	58
Total of nymphs and adults individually at sylvatic ecotope					247	99	
Total for sylvatic ecotope					346		
CZ19P	7	5	Peridomiciliary	Lagoa do Bé	4	3	7
Total of nymphs and adults individually of external population					4	3	
Total for external population					7		
TOTAL OF SAMPLED INDIVIDUALS					1,622		

*Rocky outcrops. To access the geographical coordinates and additional information for each population, refer to Additional Table S1.

2.2. DNA Isolation, Amplification and Sanger Sequencing of MT-CYB

Genomic DNA (gDNA) was extracted from freeze-dried and doubly washed triatomine legs using the DNeasy Qiagen® kit, following the manufacturer's instructions. The extracted gDNA was subsequently assessed for integrity via electrophoresis on 0.8% agarose gels and quantified using a Qubit® Fluorometer from ThermoFisher Scientific. To aid in taxonomic confirmation and for population genetic studies, a segment of the mitochondrial gene *Cytochrome b* (MT-CYB) was selected based on available online databases. Polymerase Chain Reaction (PCR) was employed for gene fragment amplification, utilizing the CYTB7432F (Monteiro et al., 2003) and CYTBR primers (Lyman et al., 1999), following recommendations for amplification (Lyman et al., 1999). Sequencing reactions were performed with both PCR primers, labeled with XL and BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), and loaded to an ABI Prism™ 3130 platform. Sequences were analyzed and edited with Chromas (MacCarthy, 1998), and assembled with CodonCode demo version (Copyright 2002-2019). Assembled sequences were manually aligned with Clustalx (Larkin et al., 2007) implemented in MEGA7 (Kumar et al., 2016) and subjected to BLASTn – NCBI to confirm taxonomic identification (>98% of BLAST identity).

2.3. Variation in MT-CYB gene

The total sampling comprised 109 MT-CYB sequences (CN=102; CZ=7), in addition to the reference *T. brasiliensis* haplotype ($n=1$) downloaded from GenBank (AY336524). A median-joining (MJ) network (Bandelt et al., 1999) was built to observe the genetic and haplotypic distribution according to the collection sites. Standard indicators of molecular variance (nucleotide and haplotype diversity) were calculated using the software DNAsp v. 6.12.3 (Rozas et al., 2017).

To run population genetic analysis, we excluded collection sites with (i) a single specimen besides (ii) the GenBank sequences and the samples from Cajazeiras, resulting in 100 MT-CYB sequences from 11 natural populations collected in a micro-geographic scale. Here, the R_{ST} coefficient

of genetic variation refers to the dominant and uniparental inherited marker (MT-CYB), whereas the F_{ST} refers to the co-dominant (following topics). We estimated R_{ST} among all pairs of populations with 10,000 permutations. The Analysis of hierarchical distribution of the genetic variation (AMOVA) was computed using Arlequin v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). We performed a nested Analysis of Molecular Variance (AMOVA) to investigate the hypothesis that various factors are responsible for driving genetic variation, with a specific focus on the potential influence of ecotypic versus geographic influences. This analysis allowed us to assess contributions of these factors to the observed genetic variation (see Pizarro et al., 2008). We applied additional tests of genetic summary statistics, specifically Tajima's D, Fu, and Li (Tajima, 1989; Fu and Li, 1993; Fu, 1997), to evaluate differentiated populations and infer potential demographic effects associated with the observed genetic variation. To categorize population groups, we incorporated landscape observations, specifically assessing the presence or absence of rocky outcrops in the vicinity of the peridomiciliary sampled populations. This landscape feature was factored into our analysis to explore its potential role as a source of population immigration.

Linear geographic distances between collection sites were calculated with the software Geographic Distance Matrix Generator version 1.2.3 (Ersts, 2022) and corrected with the 3D tool of Google Earth Pro 7.3.3.7786 to consider soil elevations. Mantel tests were conducted to evaluate isolation by distance (IBD) based on the correlation between pairwise linearized genetic differentiation coefficient R_{ST} ($R_{ST} / (1 - R_{ST})$) and geographical distances through the correlation between matrices using Arlequin v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). All additional analyses of summary genetic statistics were conducted using Arlequin v. 3, with statistical significance set at $p < 0.05$.

2.4. Preparation and Sequencing of GBS genomic library

To prepare the genotyping-by-sequencing (GBS) library (Davey et al. 2011), 95 gDNA samples from individuals identified by morphology and molecular data as *T. brasiliensis* were selected. Genetic material was isolated as previously indicated; however, we used muscle tissue that adheres to the legs when it is pulled off to avoid contamination. The 95 gDNAs used came from the same 14 samplings used to analyze the variation in the MT-CYB. We built GBS libraries following established protocols (Poland et al., 2012). All gDNA samples were normalized to 15 ng/uL and placed in a 96-well plate for a double-digestion using the restriction endonucleases *PstI* (adapter 1 binder; barcoded) and *MspI* (adapter 2 binder; Y adapter).

The ligation reaction was carried out using the digested samples, adapters (both adapter 1 and adapter 2), and a ligation mastermix (NEB Buffer, ATP and T4 DNA ligase). The GBS library was multiplexed by combining 95 samples along with a blank sample, followed by PCR amplification to enrich the fragments, and subsequently, a purification step. To ensure accurate quantification, the library was assessed using qPCR with the KAPA Quantification Kit. Additionally, the library's integrity and size distribution were validated by observing it in a 1% agarose gel.

2.5. Identification of SNPs

A high-performance Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach was employed to create a reduced representation of the genome, enabling the identification of SNP markers. The methodology followed Poland's (2012) double digestion protocol, which utilized a combination of rare-cutting and frequent-cutting enzymes with cohesion regions corresponding to the specially designed adapters. Typically, fragments with both a *PstI* restriction site and another *MspI* restriction site were deliberately generated as part of the design of the Y Adapters. This design aimed to render the amplification from the *MspI* cut site unfeasible. Consequently, the resulting fragments were largely uniform in their composition, following the guidelines outlined by Poland et al. (2012) which

specified a minimum tag size of approximately 125 bases. These fragments consisted of a sequence that included the following components: sense adapter 1 (sense), barcode, genomic DNA, and adapter 2 (Y; reverse), constituting a ddRAD-seq approach.

The identification of SNP markers was performed using the *de novo* pipeline of STACKS (Catchen et al., 2011, 2013) using the *R* package and RStudio version 3.6.1 (R Core Team, 2013; R Studio Team, 2015) as suitable. Sequences were demultiplexed, filtered and trimmed to 130 bp using the *process_radtags* function. We used the *ustacks* pipeline (-m 3, -M 2, -N 2) to assemble loci for each sample and the *cstacks* (-n 2) to create a catalog of loci across sampling. Then, the *sstacks* was used to compare the individual loci to the catalog. The *rxstacks* correction module was employed to remove loci with low probability values (--lnl_lim -10). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified using the populations module. Specifically, SNPs meeting the following criteria were considered: a sequence depth of $\geq 5X$, a minor allele frequency (MAF) of ≥ 0.01 , presence in at least 75% of individuals from a minimum of 12 locations, and only one SNP per tag was retained for analysis.

2.6. Tests of selection and genetic diversity analyses

We employed two distinct approaches to investigate potential selective signs among the SNP loci identified using STACKS. First, we conducted Principal Component Analysis (PCA) and identified loci with divergent allele frequencies using the *pcadapt* (Luu et al., 2017) and *fsthet* (Flanagan & Jones, 2017) packages. Then, we pinpointed outlier markers, which showed significant deviations from neutral behavior and were potentially under selection, as indicated by both analyses. Subsequently, we examined the similarity between the sequences associated with these outlier SNPs and proteins from GenBank using the BLATX tool in Blast2GO (Gotz et al., 2008). Additionally, we used *Rebase* (Jurka et al., 2005) and the *RepeatMasker* database version open-4.0.9

(<http://www.repeatmasker.org>) to screen and classify DNA sequences, with a focus on identifying interspersed repeats and low complexity DNA sequences in the dataset.

Genetic diversity and structure analyses were performed based on the neutral *loci* (i.e., those that were not identified as outliers). We used the package *diversity* (Keenan et al., 2013) to estimate the total number of alleles (A), allelic richness (A_R), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_E), and the inbreeding coefficients (F_{IS}). We estimated the genetic differentiation through the overall and pairwise coefficient of genetic differentiation (F_{ST}) with *diveRsity*.

We initially determined the number of genetic clusters (K) using the K-means method, based on the Bayesian Information Criterion (BIC). This analysis assumed the admixture model and correlated allele frequencies between populations. To further investigate population structure, we performed a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using the *adegenet* package (Jombart & Ahmed, 2011). Groups were predefined to guide this analysis. Next, we employed a resampling algorithm for genetic assignment, which is based on a Bayesian model and implemented through Markov Chain Monte Carlo computations. This approach considered the geographical origin of individuals to calculate the probability of each sample belonging to its reference population or being a resident (i.e., not a first-generation immigrant) in the population from which it was sampled. The Bayesian cluster analysis, as defined by the *assignPOP* and *poppr* R packages (Kamvar et al., 2014; Chen et al., 2018), assumes specific allele distribution models among populations. We conducted independent runs for each K value, with a burn-in of 100,000 and 1,000,000 generations. Additionally, we calculated genetic diversity indices (e.g., pairwise F_{ST} , Hardy-Weinberg, linkage disequilibrium, and AMOVA) for the SNPs using the *poppr* package, with statistical significance set at $p < 0.05$.

3. Results

Sampling. We collected a total of 1,622 insects, which included 1,365 nymphs and 257 adults. Additionally, we included seven samples from an external group in Cajazeiras for analysis. Notably, 77% of the collected insects were sourced from the peridomiciliary environment, while 21% originated from the sylvatic environment in rocky outcrops. Only 1% of the sampled insects came from a domiciliary environment. It is noteworthy that in the context of peridomiciliary infestations, we collected substantial numbers of insects in five distinct locations, with the following counts: CN69P ($n=519$), CN71 ($n=52$), CN76P ($n=94$), CN81P ($n=96$), and CN86P ($n=463$), as detailed in Table 1.

3.1.MT-CYB Analysis

We obtained MT-CYB sequences from a dataset comprising 109 N5 samples of *T. brasiliensis*. These sequences were 553 base pairs in length, achieving 100% coverage and sharing an identity of over 99% with the GenBank reference (AY336524). In total, the dataset consisted of 109 sequences, plus one from GenBank, each with a length of 510 base pairs. These sequences exhibited 34 variable sites, from which 23 unique haplotypes (H) were identified. Among these haplotypes, there were 10 singletons and 13 haplotypes shared among multiple samples, resulting in high a haplotypic diversity (H_d) of 0.8861. Additional details regarding the variable sites in each sample can be found in Additional Tables S1 and S2.

The Median-Joining network we constructed revealed a starlike structure, which suggests that the H03 haplotype serves as the ancestral haplotype (Figure 1). This structure hints at a population expansion within our dataset. Notably, the H03 haplotype exhibited the highest frequency and was shared by 31 individuals originating from the three sampled ecotopes. This included even the sole intradomiciliary sample (CN75D.1), emphasizing its prevalence and significance within the dataset. The haplotype H01 was shared by a GenBank sequence (GenBank AY336524 from Monteiro et al.,

2004; $n=1$), all individuals from the peridomestic ecotope in Cajazeiras ($n=7$), and one individual from the sylvatic environment in Currais Novos (CN87S.7). Notably, the haplotypic network did not reveal any discernible geographic or ecotypic structure, suggesting that this haplotype was widely distributed. Conversely, H17 was found to be exclusive to all ten individuals from a peridomestic population (CN81P), indicating its unique presence within this specific population.

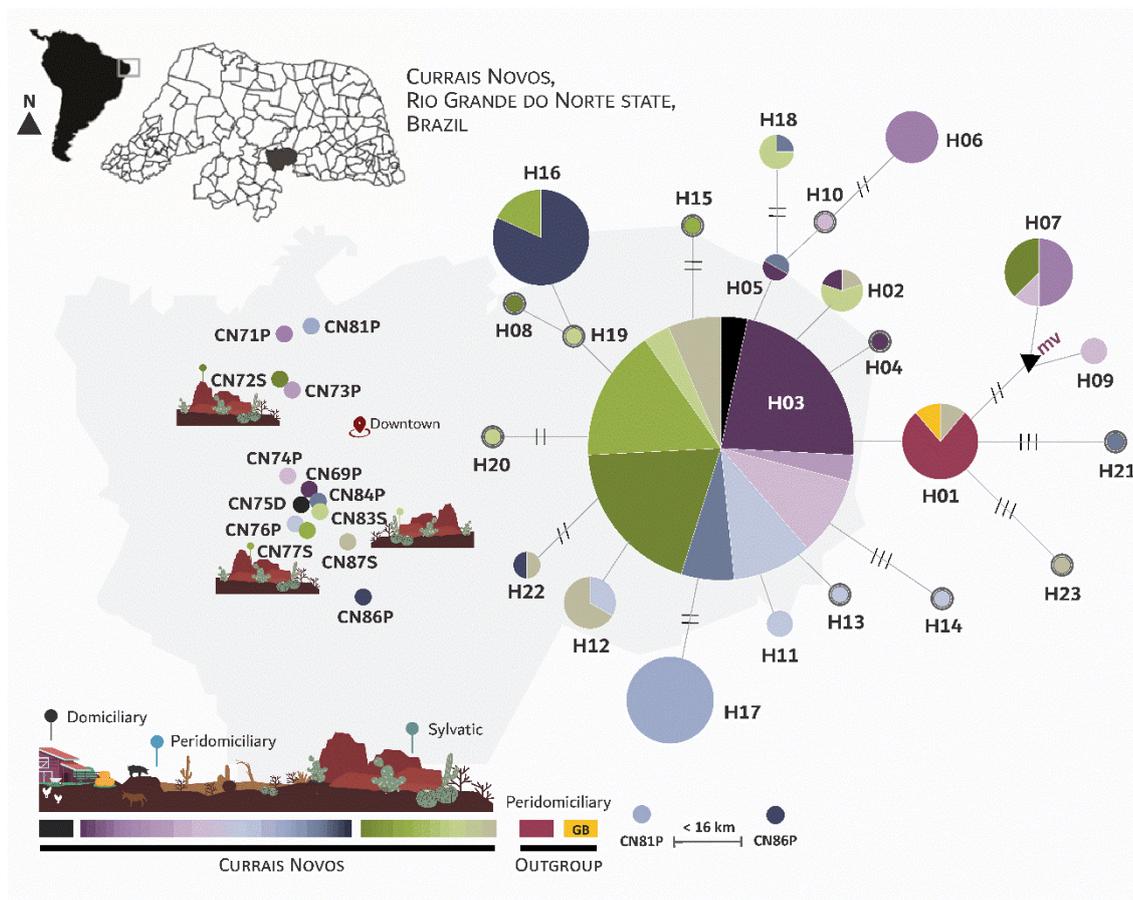


Figure 1: Median-Joining network generated from 110 MT-CYB sequences of *Triatoma brasiliensis*. The sizes of the circles in the network correspond to the number of samples associated with each haplotype (H). The pie chart colors represent different collection sites, including Currais Novos (CN), Cajazeiras (CZ), and sequences from GenBank (GB), which are detailed in the legend located in the lower corner of the figure. Branch lengths are relative to haplotype distances, and dashes indicate mutational steps greater than one. The scale provided in the figure denotes the distance between the two endpoints of the collection transect, and the median vector (Mv) is also depicted. For details, consult Additional Table S1-S2.

3.1.1 Genetic structure

We calculated pairwise R_{ST} values between all sample groups from 11 natural populations (see Table 2). Notably, populations CN81P and CN86P displayed notably high R_{ST} values with significant p -values (CN81P: 0.57 to 0.90; CN86P: 0.42 to 0.90). When conducting AMOVA, the majority of scenarios we tested did not yield significant values for the variation among groups of populations (Additional Tables S2-S3). However, in one specific geographical nesting analysis, we observed a significant value for the variation among groups ($F_{CT} = 0.4250$, $p = 0.005$). This specific grouping was established based on the observation that a significant number of rocky outcrops surrounded the downtown (Central) area. As a result, we categorized the populations into three groups: North1 (CN81P), North2 (CN71P), Central (CN69P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S), and South (CN86P) (as detailed in Table 3). Mantel test demonstrated that there were moderate (but significant) correlations between genetic and geographic distance matrices (across all sites: $r=0.521052$, $p<0.001$), as illustrated in Figure 2.

Table 2. Pairwise estimates of genetic divergence (R_{ST}) based on MT-CYB sequences of *Triatoma brasiliensis* from 11 collect sites of Currais Novos municipality. The top rows indicate p -values based on 10,000 permutations; the bottom rows indicate F_{ST} .

Pops	CN69P	CN71P	CN72S	CN74P	CN76P	CN77S	CN81P	CN83S	CN84P	CN86P	CN87S
CN69P		0.00188	0.20483	0.01772	0.09880	0.10732	10^{-5}	0.09791	0.07385	10^{-4}	0.06900
CN71P	0.41786		0.03109	0.05613	10^{-5}	0.00267	10^{-5}	0.00307	0.05396	10^{-5}	0.00149
CN72S	0.15686	0.26426		0.22780	0.02782	0.10544	10^{-5}	0.00683	0.11712	10^{-5}	0.04920
CN74P	0.31446	0.21218	0.01948		0.00257	0.03782	0.00010	0.00802	0.11514	10^{-4}	0.01307
CN76P	0.07407	0.39909	0.15459	0.27811		0.03911	10^{-5}	0.00079	0.08504	0.00030	0.19018
CN77S	0.08046	0.38818	0.12869	0.27381	0.09428		10^{-5}	0.06346	0.07405	0.01307	0.02505
CN81P	0.86957	0.64444	0.66667	0.68006	0.72031	0.77872		10^{-5}	0.00059	10^{-5}	10^{-5}
CN83S	0.11887	0.33757	0.19114	0.26210	0.16851	0.14175	0.57276		0.46609	10^{-5}	0.00376
CN84P	0.10031	0.24506	0.10299	0.15493	0.09831	0.10881	0.66851	0		0.00089	0.07791
CN86P	0.69565	0.57778	0.52381	0.57445	0.58238	0.42732	0.90000	0.50962	0.55182		10^{-5}
CN87S	0.09159	0.36949	0.12186	0.22391	0.04353	0.10940	0.67361	0.15275	0.08660	0.54290	

Significant ($p<0.05$) values are in bold.

Table 3. AMOVA variance components, percentage variation (%) explained at varied hierarchical levels, and fixation indices for populations of *Triatoma brasiliensis* based on MT-CYB sequences grouped according to the ecotope, locality and distance from downtown.

Nested groups	Collecting sites / Populations	Variation among groups			Among populations within groups			Variation within populations		
		%	F _{CT}	d.f.	%	F _{SC}	d.f.	%	F _{ST}	d.f.
(i) Ecotypic	Peridomiliary Sylvatic	-6.36	-0.06355	1	44.05	0.41418	9	62.31	0.37695	89
(iii) Localities (local scale)	S. Malhada	60.40	0.00834	7	0.83	0.39093	3	38.77	0.39602	89
	Furna da Onça									
	F. Cacimba da Pedra									
	S. Morada do Mocó									
	B. Paizinho Maria									
S. Areias de Baixo										
(iv) Position according to the downtown / presence of rocky outcrops	North-1 (CN81P)	42.50	0.4250	3	9.15	0.15909	7	48.35	0.51648	89
	North-2 (CN71P)									
	South (CN86P)									
	Central-downtown (CN69P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)									

Populations were nested according to hypotheses to explain the distribution of genetic variation. For a complete list of AMOVA tests see Additional Tables S2-S3. Significant ($p < 0.05$) values are in bold.

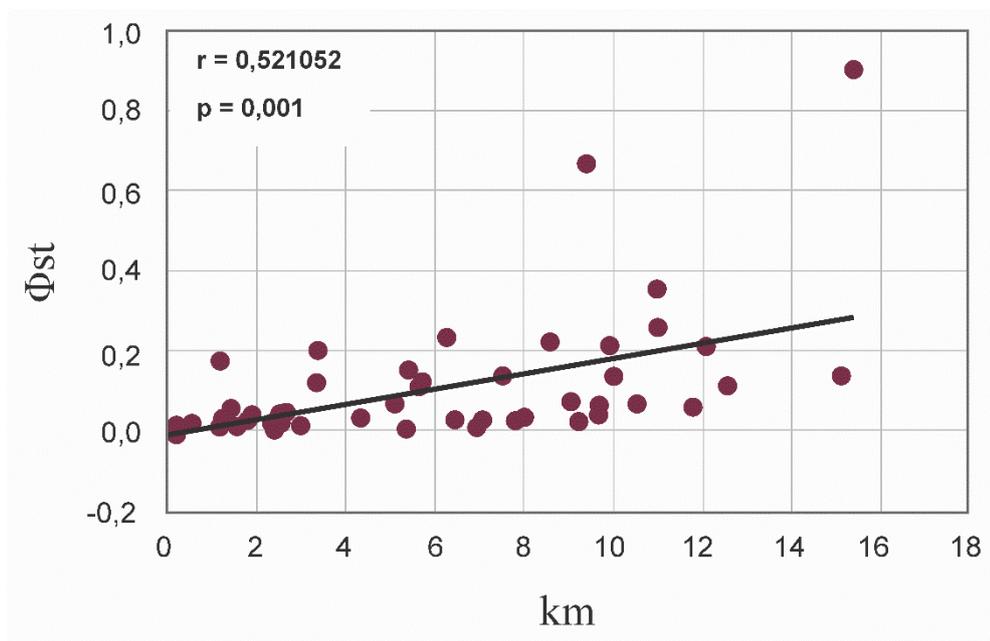


Figure 2. Mantel tests considering all collection sites of *Triatoma brasiliensis*.

The neutrality tests (Tajima's D and Fu's FS) were applied for groups of populations evidenced by AMOVA ($p < 0.05$). Negative and significant neutrality tests of AMOVA indicated expansion of the sampled lineage of Central group, with Tajima's $D = -2.052$ ($p = 0.003$) and Fu's $FS = -11.215$ ($p = 0.001$) and in the South population with Tajima's $D = -2.109$ ($p = 0.003$) and Fu's $FS = -12.16600$ ($p < 0.001$) (Table 4). Mismatch distribution analyses were not statistically significant ($p > 0.05$; Additional Table S4) for groups of populations.

[Table 4]

Table 4. Neutrality tests of AMOVA given group of *Triatoma brasiliensis* populations based on MT-CYB sequences. Significant values ($p > 0.05$) are in bold.

Neutrality and demography		Group of populations			
		North1 (CN81P)	North2 (CN71P)	Central-downtown (CN69P + CN72S + CN74P + CN76P + CN77S + CN83S + CN84P + CN87S)	South (CN86P)
Tajima's D test	Sample size	10	10	70	10
	Tajima's D	0	2.19508	-2.05189	-1.66706
Fu's FS test	Real no. of alleles	1	2	21	2
	Fu's FS	0	6.85861	-12.16600	1.74414

3.2.GBS Analysis

We initially obtained approximately 132 million reads, with read lengths ranging from 35 to 150 bases, for a total of 95 samples. Following data processing, we discarded low-quality reads as well as the sequences from nine samples due to either a low number of reads ($< 100,000$) or a high number of sequences containing adapters. Consequently, genetic analyses were conducted using 86 samples, from which we identified a total of 3,013 SNPs.

3.2.1. Loci putatively under selection

Our analysis revealed 11 outlier loci, constituting approximately 0.37% of the total loci, which are putatively under selection. Among these, four loci showed similarity to known proteins, while the remaining seven did not exhibit such similarity. Upon database search, we found that these loci displayed similarity with 45 other proteins classified as uncharacterized, hypothetical, or putative, and originating from various species. It is worth noting that none of these proteins had been previously described in triatomine species. Among the four loci exhibiting BLAST similarities, only one sequence containing an outlier locus (locus 4708) was subjected to a BLAST search, mapped, and annotated to an RNA-directed DNA polymerase jockey-like mobile element, which was originally predicted in the Argentine ant, *Linepithema humile* (Hymenoptera, Formicidae). The BLASTx search returned eight results, with 96% query cover and identity ranging from 42.86% to 45.24% with *L. humile*. Despite the observed similarity to a retrotransposon sequence, our search for screening DNA sequences of jockey-like mobile elements in *Rebase* and *RepeatMasker* did not yield any repetitive sequences that displayed similarity with triatomines.

3.2.2. Neutral loci

Genetic diversity analyses were carried out using the 3,002 neutral loci that were not identified as outliers. Out of the 516,344 genotypes obtained, 63,410 were missing (12.28%). The analysis revealed genetic admixture among nearly all samples within the microgeographic distribution (Figure 3A). The K-means procedure for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) identified the most likely number of genetic clusters as K5. The DAPC results displayed five genetic profiles without clear ecotypic or geographic structure (see Supplementary material 5). Samples assigned to CLUSTER 1 (C1) accounted for 71% of the samples ($n=61$), which included the unique domiciliary sample (CN75D.1) and all peridomiciliary samples from CN73P ($n=2$) and CN77S ($n=7$). Clusters

C2, C4, and C5 each contained seven samples, while C3 grouped four samples (Additional Table S5; Figs. SA-B). In the genetic assignment resampling algorithm, considering the probability of each sample belonging to its reference population, three out of the five samples from the external population were classified with a probability exceeding 98% for their respective reference groups. Similarly, the domiciliary sample demonstrated a 100% probability of belonging to its designated cluster, as did one sylvatic sample from CN77S.5, as illustrated in Figure 3A. Nevertheless, for the remaining populations, all samples showed a high probability (>10%) of being first-generation migrants, a trend that was corroborated by low and statistically nonsignificant ($p>0.05$) F_{ST} values. (Figure 3B).

[Figure 3]

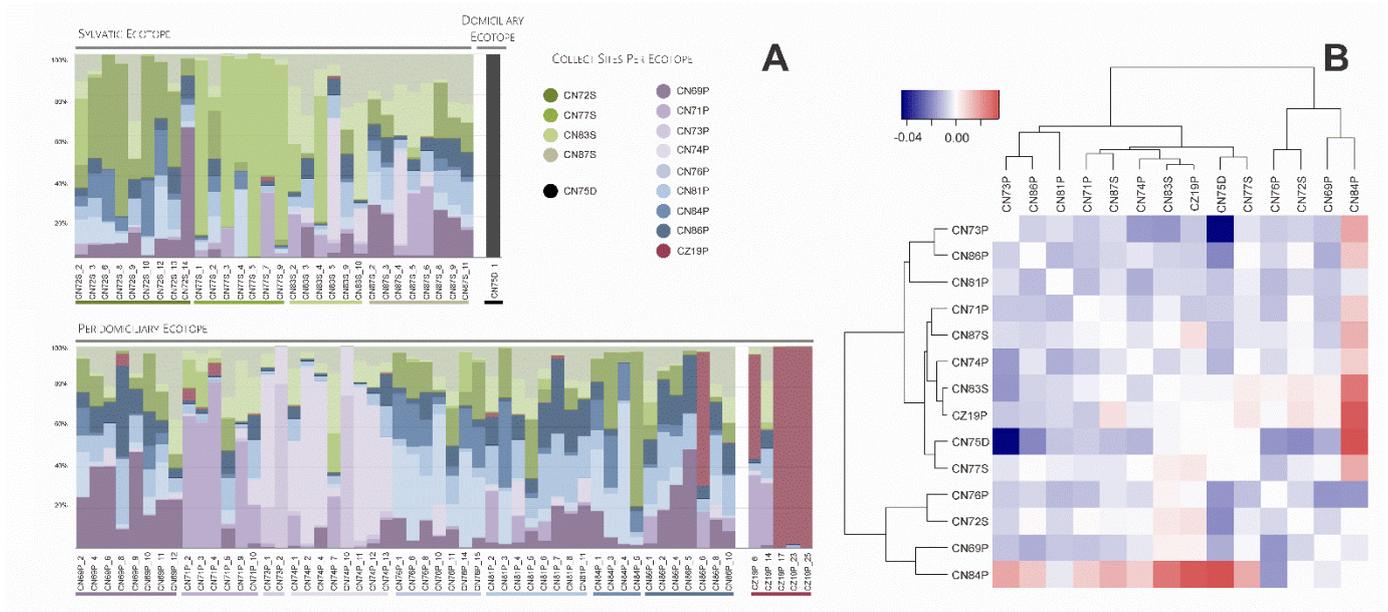


Figure 3. A) Structure analysis of 86 samples based on 3,002 neutral SNPs. Colors were coded according to each collection site of Currais Novos (CN) and Cajazeiras (CZ) identified in the legend of Figure 1. For better visualization of bar graph labels, see Supplementary Material (Additional Table S6; Figures SC and SD). B) Heatmap indicating the F_{ST} estimates between collection sites, based on the neutral SNP markers.

The Analysis of Molecular Variance conducted on neutral loci, considering either the collection sites or the ecotope, did not reveal any significant structuring between populations or

among groups of populations. The average values of genetic diversity and inbreeding were also estimated (Table 5). Observed heterozygosity ranged from 0.1434 to 0.1659, with an average value of $H_O=0.1505$, while expected heterozygosity varied from 0.1561 to 0.1683, with an average value of $H_E=0.1625$, all indicating relatively high values. The average of inbreeding coefficients ($F_{IS}=0.0739$) also suggested random crosses between related individuals.

Table 5. Estimates of genetic diversity and inbreeding of *Triatoma brasiliensis* from each collection site and the average estimates. Mean inbreeding coefficients (F_{IS}), mean observed heterozygosity (H_O) and mean expected heterozygosity (H_E). n.a. = non analyzed.

Collection site	Alleles	F_{IS}	H_O	H_E
CN69P	4619	0.0500	0.1548	0.1654
CN71P	4370	0.0261	0.1585	0.1660
CN73P	3568	-0.0191	0.1442	0.1627
CN74P	4634	0.0618	0.1492	0.1621
CN75D	3404	n.a.	0.1434	n.a.
CN76P	4485	0.0628	0.1507	0.1637
CN81P	4446	0.0564	0.1495	0.1615
CN84P	4214	-0.0159	0.1659	0.1683
CN86P	4114	0.0879	0.1450	0.1639
CZ19P	4093	0.0360	0.1459	0.1565
CN72S	4518	0.0736	0.1470	0.1617
CN77S	4246	0.0499	0.1461	0.1561
CN83S	3876	0.0430	0.1474	0.1575
CN87S	3586	0.0397	0.1512	0.1593
Average		0.0739	0.1505	0.1625

4. DISCUSSION

In this study, we presented results regarding the genetic structure of *T. brasiliensis* populations collected from intradomiciliary, peridomiciliary, and natural environments within a region characterized by high pressure of re-infestation after treatment with insecticides (Lilioso et al., 2017). The genetic variation in MT-CYB was primarily analyzed to infer demographic events, while next-generation sequencing allowed for a more detailed understanding of the genetic structure. This is the first study measuring gene flow among different ecotopes using a genome-wide marker for a Brazilian triatomine species. While techniques based on High-Throughput Sequencing (HTS) have been

applied to *T. brasiliensis*, they were primarily focused on understanding differential gene expression in insect populations from distinct environments (Marchant et al., 2015, 2016).

Oca-Aguilar et al. (2022) have provided insights into morpho-functional traits and adaptation in Chagas disease vectors along nature-urban gradients, shedding light on the dynamic interactions between environmental change and vector phenotypes. The authors emphasize that micro-evolutionary mechanisms observed in insect vector populations adapted to human environments differ from those in non-synanthropic insect populations. This is primarily because humans create favorable environments for vectors to reproduce, also facilitating their dispersion through passive carriage. Furthermore, domiciliary insect populations are subject to vector control measures and frequently experience severe bottleneck events, leading to local elimination from anthropic habitats, at least temporarily (Monteiro et al., 2018). For *T. infestans* from Bolivian Andean areas, Brenière et al. (2013) conducted a study to explore the genetic structure and identify the source of reinfesting bugs across various geographical scales. Their investigation, which employed microsatellite analyses, unveiled significant genetic variations, even at relatively small geographic scales. Fitzpatrick et al. (2008) proposed that the colonization of houses by Venezuelan *Rhodnius prolixus* populations originating from nearby sylvatic habitats does occur, albeit infrequently, as indicated by MT-CYB variation. *Triatoma brasiliensis* stands apart from these models due to the unique characteristics of infestation. This species is known for forming large colonies in all ranges of ecotopes, from wild to domiciliary and peridomiciliary environments (Lima-Neiva et al., 2021). Besides complete adaptation to anthropic habitats and displaying eclectic dietary habits, this species feeds on domiciliary and sylvatic animals, in addition to humans (Bezerra et al., 2020; Lilio et al., 2017).

4.1.MT-CYB analysis

The genealogy based on MT-CYB revealed a starlike haplotype network, indicative of a classical population expansion scenario, which aligns with previous findings for *T. brasiliensis*

(Monteiro et al., 2004; Almeida et al., 2008, 2016). This pattern was corroborated by neutrality tests employing Tajima's D and Fu's FS, which indicated an expansion within the overall sampled *T. brasiliensis*. AMOVA results demonstrated significance in structuring populations based on their proximity to the downtown area, particularly where most sylvatic populations are located. The observed lack of genetic diversity in populations that are more distant from the downtown area could be attributed to colony foundation by small populations of females with a single maternal lineage. This is particularly notable in the CN81P population, but it may also apply to CN71P and CN81P. However, Mantel tests indicated that the observed differentiation was not explained by geographic distances alone. The positive Tajima's D values in the peridomiciliary populations indicate a scarcity of rare alleles. This observation aligns with the occurrence of abrupt population contractions, possibly attributed to insecticide spraying control measures, and suggests the potential influence of balancing selection (Tajima, 1989). This selective force may have been followed by population growth, especially given the substantial size of these populations ($n > 51$ samples). Considering the past use of Tajima D estimates to assess insecticide resistance in mosquitoes (Fouet et al., 2018), ongoing investigation is essential to monitor the potential emergence of insecticide resistance, as highlighted by Sonoda et al. (2010).

4.2.GBS Loci putatively under selection

We identified one annotated locus that is potentially under selection, resembling an RNA-directed DNA polymerase jockey-like mobile element that was initially predicted in the Argentine ant, *L. humile*. The jockey element belongs to the LINE order of non-LTR retrotransposons and is part of the younger superfamily/group of Transposable Elements (TE). Importantly, jockey elements are exclusively found in Arthropoda (Priimägi et al., 1988; Lynch, 2006; Metcalfe & Casane, 2014; Tambones et al., 2019). Transposable Elements (TEs) are indeed ubiquitous in all eukaryotic genomes and represent a major contributor to genome size variation. They can account for a substantial portion

of a genome, ranging from 4% to as much as 85%. TEs are considered valuable in phylogenetic studies because of their ability to transpose and their presence across diverse lineages, making them useful indicators for understanding evolutionary relationships (Lynch, 2006; Fablet & Vieira, 2011; Metcalfe & Casane, 2014; Castro et al., 2020). Our efforts to classify the sequence using *Rebase* (Jurka et al., 2005) and *RepeatMasker* did not yield robust identities. Nevertheless, a specific search for jockey elements within the Triatominae family on *Rebase* provided eight results described in *R. prolixus*, denoted as TE Jockey-1_RPr through Jockey-8_RPr (Bao & Jurka, 2015). The jockey elements mentioned above have more recently been identified in three *Rhodnius* species (Castro et al., 2020). The region that appears to be under selection likely pertains to a Transposable Element (TE) that has not been previously identified in *Triatoma* species.

4.3.GBS Neutral loci

Populations from Currais Novos displayed an admixture pattern, which contradicts the genetic differentiation pattern based on MT-*CYB*. In the case of this gene, significant structure was observed for CN81P, CN71P, and CN86P populations. For example, samples collected from the CN81P population shared the same MT-*CYB* haplotype, yet no signs of inbreeding were observed through F_{IS} . As a result, we hypothesize that females from these peridomiciliary populations may be mating with multiple males from various sources of invaders. The global inbreeding coefficient ($F_{IS} = 0.0739$) and fixation index ($F_{ST} = -0.0037$) are consistent with the low genetic structure and similarity between individuals from different ecotopes and sites. This pattern contrasts with what has been observed for *T. infestans* in the Bolivian Andes (Brenière et al., 2013; Monteiro et al., 2018) using microsatellites.

The K-means analysis did not effectively differentiate populations from CN (Currais Novos) from the external group in terms of clustering. It is important to note that this parameter has its limitations in robustly evaluating the dataset's power to distinguish local populations and is also subject to the influence of linkage disequilibrium (Paetkau et al., 2004; Chen et al., 2018). The

genome size of *T. brasiliensis* is approximately 1 gigabase (1 Gb), and it contains several duplicated regions (M Harry, personal communication), which can potentially complicate the analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Indirect methods like K-means often rely on simplified and, in many cases, unrealistic population models. These models may have limited value for comprehending complex demographic processes in real populations, especially those with related populations (Whitlock & McCauley, 1999). Given that we conducted sampling on a small geographic scale, it is essential for our dataset to utilize functions that take into account source population classifications (Kamvar et al., 2014). This approach tends to yield more realistic results as it calculates the probability of each sample belonging to its reference population. We intentionally used fifth-stage nymphs, as they are expected to have limited mobility capacity (i.e., they cannot fly), which allows us to prioritize residents over potential invaders. As a result, three samples from the external populations, which are 220 km apart, were confidently assigned to their own cluster with over 97% probability, clearly distinguishing them from all others. These findings validate our SNP protocol for assessing gene flow in gamma systematics. Surprisingly, the domiciliary population was also assigned to a separate cluster from all others, and this observation warrants further investigation with a larger dataset. For the remaining samples collected within a small geographic range (within 16 km), there were consistent signs of panmixia, regardless of the clustering parameter used.

Implications for vector control measures - Our investigation was succeeded by systematic vector control campaigns, involving the re-treatment of houses upon detecting infestations. In light of our observations, indicating the potential evasion of control measures by small female populations in peridomiciliary areas, we recommend implementing more sensitive approaches for vector detection, which can significantly improve the accuracy of surveillance and re-treatment efforts, facilitating sustained monitoring — especially in the context of potential incipient insecticide resistance. Regarding this concern, it is crucial to incorporate evaluations of resistance levels into routine vector

control assessments. The higher genetic diversity observed in peridomiciliary populations around rocky outcrops suggests an increased potential for infestation. Tailoring intervention strategies with focal modes of action for these areas may prove instrumental in preventing resurgence. Moreover, fostering community engagement and education can empower residents to promptly report and address infestations. Integrating these strategies into the existing control framework holds the potential to create a more resilient and adaptive vector control program. Our findings underscore that the challenges for vector control, as highlighted in Currais Novos, must be extended to remaining areas that share this threatening pattern.

5. CONCLUSIONS

We believe that the differentiation observed in the *MT-CYB* gene is likely an artifact resulting from field sampling, compounded by demographic events triggered by control measures directed at *T. brasiliensis*, rather than reflecting natural differentiation. The low haplotypic diversity observed in some peridomiciliary populations should be taken into consideration when assessing population recoveries following insecticide spraying as alerted by Bezerra et al. (2020). The evidence of local panmixia identified through the GBS approach is supported by the low and non-significant F_{ST} values at both ecotypic and local scales. In the context of our chosen site, our results align with Almeida et al. (2008, 2016) and Bezerra et al. (2020) in highlighting the epidemiological concern posed by this panmictic pattern, particularly since sylvatic populations remain beyond the reach of available control measures. Previous studies have also suggested signals of panmixia in *T. brasiliensis* populations from Currais Novos, based on morphometric analyses of wings (Kamimura et al., 2020). Although there is no apparent geographic or ecotypic structure at the microgeographic scale, we validated our GBS protocol by successfully distinguishing samples collected at a significant distance from our target area. In our dataset, results indicate that genetic signals from both markers are complementary,

emphasizing the importance of considering the nature and inheritance pattern of each marker in understanding the population dynamics of *T. brasiliensis*.

Abbreviations

CN: Currais Novos municipality; MT-CYB: mitochondrial *Cytochrome b* gene; SNPs: single nucleotide polymorphisms; *n*: sample number; km: kilometer; RADseq: restriction-site associated DNA sequencing; GBS: genotyping-by-sequencing; CD: Chagas disease; RN: Rio Grande do Norte state; CZ: Cajazeiras municipality; PB: Paraíba state; S: sylvatic ecotope; P: peridomiciliary ecotope; D: domiciliary ecotope; PCR: Polymerase chain reaction; GB: GenBank; MJ: median-joining reconstruction; AMOVA: Analysis of hierarchical distribution of the genetic variation; F_{ST} : genetic differentiation; R_{ST} : F_{ST} derived; IBD: isolation by distance; MAF: minor allele frequency; PCA: Principal Component Analysis; A: total number of alleles; A_R : allelic richness; H_O : observed heterozygosity; H_E : expected heterozygosity; F_{IS} : inbreeding coefficients; K: number of genetic clusters; BIC: Bayesian Information Criterion; DAPC: Discriminant Analysis of Principal Components; HW: Hardy-Weinberg; LD: linkage disequilibrium; H: haplotypes; Hd: haplotypic diversity; F_{CT}/Φ_{ct} : variation among groups of populations; r: correlation between genetic and geographic distances; Φ_{st} : Pairwise estimates of genetic divergence among populations; Φ_{sc} : variation among individuals within populations; d.f.: degree of freedom; TE: Transposable Elements.

Additional files

Additional Table S1. List of specimens sampled in this study, indicating locality of collection, collecting sites, ecotope, coordinates and individual sample sequential number. Acronyms CN is related to Currais Novos municipality, RN to Rio Grande do Norte state, CZ to Cajazeiras municipality, PB to Paraíba state and BR to Brazil. Between parentheses we inform which analyzes

were performed; mitochondrial gene *Cytochrome b* (MT-CYB) and/or single nucleotide polymorphism (SNP) approaches. At the end of the each collecting site, we inform total number of samples per locality (N) and analyzed samples.

Additional Table S2. Complete haplotype list, showing the haplotype number (H), sample size (n), samples representing each haplotype and variable sites compared with canonical reference from GenBank AY336524.

Additional Table S3. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) by hierarchical distribution of the genetic variation, observing variation among individuals (Φ_{ct}), among individuals within populations (Φ_{sc}) and among populations (Φ_{st}). Nested groups indicated intuitive grouping and blind tests, showing the most significant value for the variation among groups of populations in bold. (*) Significant p values.

Additional Table S4. Mismatch distribution analyses of CENTRAL-DOWNTOWN population.

Additional Table S5, Figure SA and SB. Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) of the most-likely number of genetic clusters calculation, showing five genetic profiles.

Additional Table S6, Figure SC and SD. Structure analysis of 86 samples based on 3,002 neutral SNPs, showing indices, bar graph, and an edited figure.

Author contributions

Maria Carolina Viana: Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. **Alessandro Alves-Pereira:** Conceptualization, Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. **Marcelo de Assis Passos Oliveira:** Conceptualization, Methodology, Software, Formal analysis, Writing - Original

Draft. **Carolina Valença-Barbosa**: Conceptualization, Formal analysis, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. **Elaine Folly Ramos**: Conceptualization, Methodology, Resources, Project administration, Funding acquisition. **Anete Pereira de Souza**: Methodology, Resources, Formal analysis. **Daniela Maeda Takiya**: Writing - Review & Editing. **Carlos Eduardo Almeida**: Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. All authors approved the final version submitted to this journal.

Acknowledgments

We are thankful to Dra. Lúcia Maria Abrantes Aguiar (Secretaria de Estado da Saúde Pública do Rio Grande do Norte, Natal, Brasil) for arranging for all fieldwork, such as field monitors from Currais Novos, Elaine Folly-Ramos and Maurício Liliuso for field work design and collection; to Aline Moraes, Ana Luiza Araújo and Edgard Kamimura for laboratory technical support. We kindly thank Genomic Platform from the Genetics Department/ National Institute of Cancer for sequencing support, especially to Dr. Hector Seuanez Abreu (*in memoriam*) for providing facilities and laboratory technical support; to Dr. Salvatore Siciliano for manuscript language review. MCV and AA-P thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP 2018/04594-6 and 2018/00036-9) for a PhD and post-doctoral fellowship, respectively.

Funding

This work was supported by The São Paulo Research Foundation (FAPESP process 2016/08176-9, 2017/15210-1, 2017/09088-9, 2017/21359-8, 2018/04594-6), by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Paraíba (Demanda Universal FAPESQ 2021, Processo 3128/2021)

and by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq Process number 434260/2018-5). Fieldwork was carried out with authorization from Sisbio/Ibama (License number 32579-1 to C.E. Almeida).

Author contributions

All authors approved the final version submitted to this journal.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

APÊNDICE M –Artigos correlatos

ARTIGO I – Drivers of molecular and morphometric variation in *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Triatominae): the resolution of geometric morphometrics for populational structuring on a microgeographical scale

Edgard H. Kamimura, Maria Carolina Viana, Maurício Liliuso, Fernanda H. M. Fontes, Dayane Pires-Silva, Carolina Valença-Barbosa, Ana L. Carbajal-de-la-Fuente, Elaine Folly-Ramos, Vera N. Solferin, Patricia J. Thyssen, Jane Costa & Carlos E. Almeida

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04340-7>

ARTIGO II – Genotypic *Trypanosoma cruzi* distribution and parasite load differ ecotypically and according to parasite genotypes in *Triatoma brasiliensis* from endemic and outbreak areas in Northeastern Brazil

Carolina Valença-Barbosa, Paula Finamore-Araujo, Otacilio C. Moreira, Jose Gabriel Vergara-Meza, Marcus Vinicius Niz Alvarez, Juliana R. Nascimento, André Borges-Veloso, Maria Carolina Viana, Maurício Liliuso, Danilo Ciccone Miguel, Fernanda Ramos Gadelha, Marta Maria Geraldtes Teixeira, Carlos Eduardo Almeida

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106054>

ARTIGO III – From molecules to ecosystems: Insights into a network of interactions for a Chagas disease outbreak using *Triatoma brasiliensis* as natural samplers

Carlos E. Almeida, Milena M. Máximo, Dayane Pires-Silva, Daniela M. Takiya, Carolina Valença-Barbosa, Maria C. Viana, Carolina Reigada, Alena M. Iñiguez, Myriam Harry, Elaine Folly-Ramos

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.107107>

X. ANEXOS

ANEXO A – QUADRO 1. Óbitos e coeficiente de mortalidade (CM) tendo como causa básica doença de Chagas, segundo UF de residência. Brasil, 2010 a 2019 (Ministério da Saúde, 2022).

UF de residência	2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019	
	Nº óbitos	CM*																		
Acre	0	0,00	0	0,00	2	0,25	1	0,12	0	0,00	1	0,12	1	0,12	2	0,23	1	0,12	1	0,11
Alagoas	91	2,85	103	3,21	88	2,72	84	2,59	100	3,06	73	2,23	107	3,25	98	2,96	79	2,38	101	3,03
Amapá	0	0,00	2	0,28	0	0,00	1	0,13	3	0,39	1	0,13	0	0,00	3	0,37	0	0,00	0	0,00
Amazonas	2	0,06	3	0,08	1	0,03	1	0,03	0	0,00	3	0,08	0	0,00	2	0,05	2	0,05	2	0,05
Bahia	682	4,77	661	4,60	660	4,57	628	4,33	603	4,14	578	3,95	573	3,90	603	4,09	613	4,14	611	4,11
Ceará	50	0,58	46	0,53	64	0,73	43	0,49	45	0,51	47	0,53	54	0,60	53	0,59	58	0,64	65	0,71
Distrito Federal	204	7,73	188	7,01	209	7,68	221	8,00	187	6,66	191	6,70	192	6,64	220	7,51	259	8,71	217	7,20
Espírito Santo	7	0,19	3	0,08	4	0,11	6	0,16	5	0,13	4	0,10	4	0,10	4	0,10	5	0,13	7	0,17
Goias	754	12,34	729	11,73	751	11,89	763	11,89	712	10,92	760	11,47	715	10,63	840	12,31	763	11,02	754	10,74
Maranhão	4	0,06	5	0,07	6	0,09	12	0,18	9	0,13	7	0,10	9	0,13	6	0,09	10	0,14	10	0,14
Mato Grosso	68	2,19	56	1,78	48	1,51	50	1,55	47	1,44	49	1,48	50	1,49	61	1,79	57	1,66	51	1,46
Mato Grosso do Sul	35	1,40	48	1,90	48	1,88	43	1,66	46	1,75	45	1,70	40	1,49	46	1,69	46	1,67	34	1,22
Minas Gerais	1.256	6,29	1.162	5,78	1.135	5,61	1.142	5,61	1.116	5,44	1.116	5,40	1.120	5,39	1.062	5,08	1.005	4,78	1.006	4,75
Pará	14	0,18	17	0,22	19	0,24	9	0,11	11	0,13	16	0,19	21	0,25	21	0,25	24	0,28	19	0,22
Paraíba	34	0,89	34	0,88	29	0,75	23	0,59	22	0,56	43	1,09	26	0,66	30	0,75	33	0,83	25	0,62
Paraná	231	2,17	178	1,66	185	1,71	201	1,84	185	1,68	179	1,61	166	1,49	169	1,50	173	1,52	160	1,40
Pernambuco	128	1,42	109	1,20	117	1,28	113	1,23	119	1,29	113	1,21	136	1,45	111	1,18	112	1,18	109	1,14
Piauí	70	2,19	91	2,84	72	2,24	77	2,39	60	1,86	52	1,61	60	1,85	50	1,54	69	2,11	53	1,62
Rio de Janeiro	26	0,16	27	0,16	24	0,15	28	0,17	22	0,13	30	0,18	35	0,21	26	0,15	26	0,15	28	0,16
Rio Grande do Norte	19	0,59	17	0,52	14	0,42	18	0,54	13	0,39	20	0,59	17	0,50	16	0,46	25	0,72	26	0,74
Rio Grande do Sul	30	0,27	26	0,24	24	0,22	22	0,20	29	0,26	31	0,28	37	0,33	31	0,27	29	0,26	34	0,30
Rondônia	18	1,13	17	1,05	22	1,34	22	1,33	19	1,13	14	0,82	15	0,87	20	1,15	16	0,91	12	0,68
Roraima	1	0,22	1	0,21	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,19	0	0,00	1	0,18	0	0,00	0	0,00
Santa Catarina	4	0,06	3	0,05	3	0,05	5	0,08	2	0,03	2	0,03	11	0,16	4	0,06	6	0,08	1	0,01
São Paulo	1.070	2,53	1.079	2,53	1.054	2,44	1.041	2,39	1.008	2,29	1.025	2,31	982	2,19	985	2,18	910	2,00	900	1,96
Sergipe	21	1,00	17	0,80	20	0,93	17	0,78	17	0,77	22	0,99	24	1,07	17	0,75	23	1,01	22	0,96
Tocantins	57	4,03	51	3,56	51	3,52	57	3,88	48	3,23	49	3,26	66	4,34	62	4,03	47	3,02	39	2,48
Brasil	4.876	2,50	4.673	2,38	4.650	2,34	4.628	2,31	4.428	2,20	4.472	2,20	4.461	2,17	4.543	2,20	4.391	2,11	4.287	2,04

*Por 100.000 habitantes. Fonte: Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). População Residente - Estimativas preliminares elaboradas pelo Ministério da Saúde/SVS/DASNT/CGIAE

ANEXO B - FIGURA 1. Transmissão clássica do *Trypanosoma cruzi* com participação do inseto vetor, identificando os estágios infectante e diagnóstico. (I) repasto e ingestão de sangue do hospedeiro primário contaminado com a forma evolutiva tripomastigota do *T. cruzi*; (II) transformação do parasito em epimastigota; (III) multiplicação no intestino médio do inseto; (IV) diferenciação para a forma tripomastigota metacíclica no intestino posterior; (V) liberação de fezes de barbeiro contaminadas com a forma tripomastigota metacíclica através do local de inoculação; (VI) forma tripomastigota metacíclica invade diferentes células e se diferenciam em amastigota intracelular; (VII) multiplicação por fissão binária; (VIII) amastigota intracelular se transforma em tripomastigota metacíclica e pode ou se transformar em amastigota e se dividir novamente, ou (IX) cair na corrente sanguínea (IX). Imagem confeccionada com imagens de vetor utilizando os programas CorelDraw X7 e Microsoft PowerPoint; *T. brasiliensis* retirado de Costa e colaboradores (2013); ciclo do parasito confeccionado com ferramenta BioRender; manifestações e características de Pérez-Molina; Molina (2018).

ANEXO C –Classificação da Subfamília Triatominae de acordo com GALVÃO e colaboradores (2003), com atualizações de distribuição do gênero *Triatoma* Laporte, 1832 no Brasil (Goncalves *et al.*, 2013; Galvão, 2014; Pita *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016, 2019; Alevi *et al.*, 2017; De Oliveira; Da Rosa; Alevi, 2021; Jurberg *et al.*, 2008, 2014; Ramos *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019; Mendes-Sousa *et al.*, 2020; Pinotti *et al.*, 2021; Vendrami *et al.*, 2021; Oliveira Correia *et al.*, 2022a, 2022b; 2024; Florêncio *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2024)

**ORDEM HEMIPTERA
SUBORDEM HETEROPTERA
FAMILIA REDUVIIDAE
SUBFAMILIA TRIATOMINAE**

Tribo Alberproseniini Martínez & Carcavallo, 1977

Gênero *Alberprosenia* Martínez & Carcavallo, 1977

Alberprosenia malheiroi Serra, Atzingen & Serra, 1980 - **Brasil:** Pará.

Tribo Bolboderini Usinger, 1944

Gênero *Belminus* Stål, 1859

Belminus laportei Lent, Jurberg & Carcavallo, 1995 - **Brasil:** Pará.

Gênero *Microtriatoma* Prosen & Martínez, 1952

Microtriatoma borbai Lent & Wygodzinsky, 1979 - **Brasil:** Goiás, Mato Grosso, Paraná, Rio de Janeiro.

M. trinidadensis (Lent, 1951) - **Brasil:** Mato Grosso, Pará, Tocantins.

Gênero *Parabelminus* Lent, 1943

Parabelminus carioca Lent, 1943 - **Brasil:** Rio de Janeiro.

P. yurupucu Lent & Wygodzinsky, 1979 - **Brasil:** Bahia.

Tribo Cavernicolini Usinger, 1944

Gênero *Cavernicola* Barber, 1937

Cavernicola lenti Barrett & Arias, 1985 - **Brasil:** Amazonas.

C. pilosa Barber, 1937 - **Brasil:** Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraná, Tocantins.

Tribo Rhodniini Pinto, 1926

Gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911

Psammolestes coreodes Bergroth, 1911 - **Brasil:** Mato Grosso, Mato Grosso do Sul.

P. tertius Lent & Jurberg, 1965 - **Brasil:** Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, São Paulo, Tocantins.

Gênero *Rhodnius* Stål, 1859

Rhodnius amazonicus Almeida, Santos & Sposina, 1973 - **Brasil:** Amazonas.

R. brethesi Matta, 1919 - **Brasil:** Amazonas.

R. domesticus Neiva & Pinto, 1923 - **Brasil:** Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Sergipe.

R. zeledoni Jurberg, Rocha & Galvão, 2009, syn. nov.

R. montenegrense - **Brasil:** Acre, Rondônia.

R. nasutus Stål, 1859 - **Brasil:** Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte.

R. neglectus Lent, 1954 - **Brasil:** Bahia, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, São Paulo.

R. milesi Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001 (in: Valente et al. 2001), syn. nov.

R. taquarussuensis da Rosa et al., 2017 (syn. *R. neglectus*)

R. paraensis Sherlock, Guitton & Miles, 1977 - **Brasil:** Amazonas, Pará.

R. pictipes Stål, 1872 - **Brasil:** Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Pará, Piauí, Rondônia, Roraima, Tocantins.

R. robustus Larrousse, 1927 - **Brasil:** Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Pará, Piauí, Rondônia, Roraima, Tocantins.

R. stali Lent, Jurberg & Galvão, 1993 - **Brasil:** Acre, Mato Grosso do Sul.

Tribo Triatomini Jeannel, 1919

Gênero *Eratyrus* Stål, 1859

Eratyrus mucronatus Stål, 1859 - **Brasil:** Amazonas, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Tocantins.

Gênero *Panstrongylus* Berg, 1879

Panstrongylus diasii Pinto & Lent, 1946 - **Brasil:** Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Maranhão, Minas Gerais, São Paulo, Tocantins.

P. geniculatus (Latreille, 1811) - **Brasil:** Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, Roraima, São Paulo, Tocantins.

P. guentheri Berg, 1879 - **Brasil:** Mato Grosso do Sul.

P. lenti Galvão & Palma, 1968 - **Brasil:** Goiás, Minas Gerais.

P. lignarius (Walker, 1873) - **Brasil:** Amazonas, Maranhão, Pará, Tocantins.

P. lutzii (Neiva & Pinto, 1923) - **Brasil:** Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe.

P. megistus (Burmeister, 1835) - **Brasil:** Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins.

P. rufotuberculatus (Champion, 1899) - **Brasil:** Amazonas, Mato Grosso, Pará.

P. tupyngambai Lent, 1942 - **Brasil:** Rio Grande do Sul.

Gênero *Triatoma* Laporte, 1832

Triatoma arthurneivai Lent & Martins, 1940 - **Brasil:** Minas Gerais.

T. bahiensis Sherlock & Serafim, 1967 - **Brasil:** Bahia.

T. baratai Carcavallo & Jurberg, 2000 - **Brasil:** Mato Grosso do Sul.

T. brasiliensis Neiva, 1911 - **Brasil:** Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte.

T. carcavalloi Jurberg, Rocha & Lent, 1998 - **Brasil:** Rio Grande do Sul.

- T. circummaculata* (Stål, 1859) - **Brasil:** Rio Grande do Sul.
- T. costalimai* Verano & Galvão, 1958 - **Brasil:** Bahia, Goiás, Minas Gerais, Tocantins.
- T. deaneorum* Galvão, Souza & Lima, 1967 - **Brasil:** Goiás, Mato Grosso.
- T. delpontei* Romaña & Abalos, 1947 - **Brasil:** Rio Grande do Sul.
- T. infestans* (Klug, 1834) - **Brasil:** Bahia, Espírito Santo, Pernambuco, Rio Grande do Sul.
- T. jatai* Gonçalves *et al.*, 2013 - **Brasil:** Ceará, Tocantins.
- T. juazeirensis* Costa & Felix, 2007 - **Brasil:** Bahia.
- T. jurbergi* Carcavallo, Galvão & Lent, 1998 - **Brasil:** Mato Grosso.
- T. klugi* Carcavallo, Jurberg, Lent & Galvão, 2001 - **Brasil:** Rio Grande do Sul.
- T. lenti* Sherlock & Serafim, 1967 - **Brasil:** Bahia, Goiás.
- T. maculata* (Erichson, 1848) - **Brasil:** Roraima.
- T. matogrossensis* Leite & Barbosa, 1953 - **Brasil:** Mato Grosso, Mato Grosso do Sul.
- T. melanica* Neiva & Lent, 1941 - **Brasil:** Bahia, Minas Gerais.
- T. melanocephala* Neiva & Pinto, 1923 - **Brasil:** Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe.
- T. oliveirai* (Neiva, Pinto & Lent, 1939) - **Brasil:** Rio Grande do Sul.
- T. petrochiae* Pinto & Barreto, 1925 - **Brasil:** Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte.
- T. pintodiasi* Jurberg, Cunha, and Rocha, 2013 - **Brasil:** Rio Grande do Sul.
- T. platensis* Neiva, 1913 - **Brasil:** Rio Grande do Sul.
- T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 - **Brasil:** Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Tocantins.
- T. rubrofasciata* (De Geer, 1773) - **Brasil:** Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, São Paulo, Sergipe.
- T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) - **Brasil:** Paraná e Rio Grande do Sul.
- T. sherlocki* - Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002 - **Brasil:** Bahia.
- T. sordida* Stål, 1859 - **Brasil:** Acre, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Tocantins.
- T. tibiamaculata* (Pinto, 1926) - **Brasil:** Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe.
- T. vandae* Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau & Lent, 2002 - **Brasil:** Mato Grosso, Mato Grosso do Sul.
- T. vitticeps* (Stål, 1859) - **Brasil:** Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro.
- T. williami* Galvão, Souza & Lima, 1965 - **Brasil:** Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul.*
- **T. guazu* Lent & Wygodzinsky, 1979 **syn. nov.**
- T. wygodzinskyi* Lent 1951 - **Brasil:** Minas Gerais.

ANEXO D – Licença permanente para coleta de material zoológico concedida a Dra. Elaine Folly Ramos – Sisbio/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio 32579-1.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 32579-1	Data da Emissão: 02/02/2012 13:56
Dados do titular	
Nome: Elaine Folly Ramos	CPF: 026.685.037-52
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais ou esportivos ou para realização de atividades integrantes do processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Este documento NÃO exige o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo ICMBio, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	CLASSE	Insecta, Arachnida
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA	colecção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 88242251



Página 1/2

ANEXO E – Cadastro de acesso ao patrimônio genético (SISGEN) de número AF53F3B.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A5C8D0D

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A5C8D0D**
 Usuário: **Carlos Eduardo de Almeida**
 CPF/CNPJ: **046.486.817-38**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Triatoma brasiliensis

Título da Atividade: **Abordagem integrada de parâmetros morfo-moleculares para Triatoma brasiliensis, o principal vetor da Doença de Chagas no semiárido brasileiro: a elucidação de elos da cadeia ecoepidemiológica**

Equipe

Carlos Eduardo de Almeida UNICAMP

Parceiras no Exterior

CNRS

Data do Cadastro: **22/05/2018 21:59:15**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 17:49 de 27/05/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO F –Relatório final da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, e resultados publicados por Vargas e colaboradores (2018).

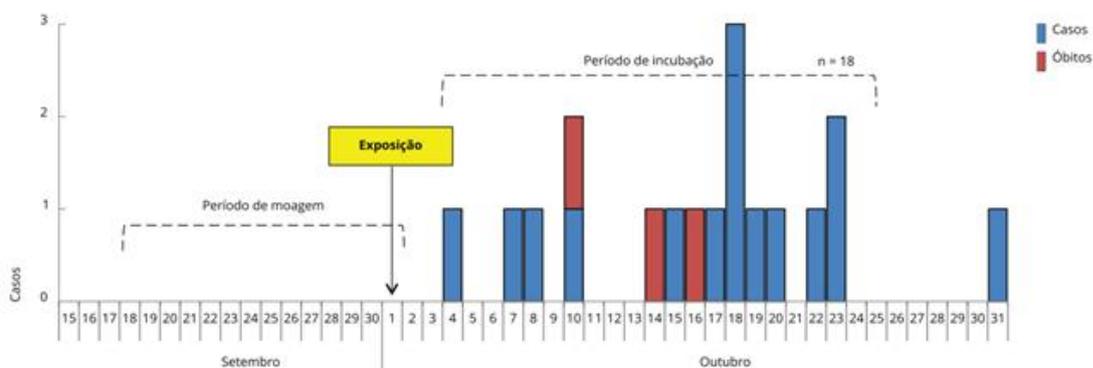


RELATÓRIO FINAL
Investigação de surto de doença de Chagas aguda de transmissão alimentar, Rio
Grande do Norte, 2016



Figura 1

Casos confirmados de doença de Chagas aguda segundo data de início de sintomas e provável dia de exposição nos municípios de Marcelino Vieira, Tenente Ananias, Alexandria e Pilões, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, 2016.



ANEXO G – Protocolo de precipitação com PEG 20% (Polietileno Glicol 6000, NaCl 5M, H₂O deionizada), de acordo com as especificações dispostas na apostila do Curso de Diagnóstico Molecular e Aconselhamento Genético no Câncer Hereditário do I Curso de Verão em Oncologia Experimental (2010) do Instituto Nacional de Câncer.

Purificação de DNA amplificado com PEG/NaCl

Protocolo alternativo de purificação de produtos de PCR para reação de sequenciamento

- 1) Transferir os produtos de PCR para tubos de 1,5 mL.
 - 2) Adicionar o mesmo volume de solução de PEG/NaCl[#] e vortexar bem.
 - 3) Deixar os tubos em banho-maria a 37 °C por 15 minutos (no mínimo, mas pode ser mais do que isso).
 - 4) Centrifugar por 15 min a 13.000 rpm.
 - 5) Retirar cuidadosamente o sobrenadante com pipeta (não dá pra ver o pellet).
 - 6) Adicionar 200 µL de etanol 80% gelado
 - 7) Centrifugar por 5 min a 13.000 rpm.
 - 8) Verter o tubo para retirar o sobrenadante.
 - 9) Repetir mais uma vez passos 6, 7 e 8, tentando descartar o máximo possível do etanol restante.
 - 10) Deixar secar em temperatura ambiente até não restarem vestígios de etanol no tubo (deixar o tubo sobre papel absorvente, com a abertura voltada para baixo, aproximadamente 15 minutos).
 - 11) Ressuspender o DNA em água milliQ em volume igual ao volume inicial da PCR.
 - 12) Para garantir a total ressuspensão do DNA, deixar os tubos incubando por
 - 15 minutos a 37 °C **ou**
 - 30 minutos a temperatura ambiente **ou**
 - 2 horas na geladeira
-

Usar a solução de **PEG 10%** para fragmentos **maiores** que 500 pb

Usar a solução de **PEG 20%** para fragmentos **menores** que 500 pb

Obs: Em caso de amostras de tamanhos variados, usar o **PEG 20%** em todas as amostras

PEG/NaCl 20% - (20% Polyethylene Glycol 6000 / NaCl 2,5 M)

Polyethylene Glycol 6000-----10 g

NaCl 5M-----25 ml

ddH₂O -----q.s.p. 50 ml

Autoclavar e estocar a 4°C.

PEG/NaCl 10% - (10% Polyethylene Glycol 6000 / NaCl 2,5 M)

Polyethylene Glycol 6000-----5 g

NaCl 5M-----25 ml

ddH₂O -----q.s.p. 50 ml

Autoclavar e estocar a 4°C.

ANEXO H – Recomendações para o preparo das amostras para sequenciamento na Plataforma Genômica ABI 3130xl – Programa de Genética e Virologia Tumoral do Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Câncer – Coordenação de Pesquisa – Programa de Genética

RECOMENDAÇÕES PARA O PREPARO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO NA PLATAFORMA ABI 3130xl

I - Quantificar o *template* com base nos valores recomendados pela Applied Biosystems:

Template	Quantidade
Produto de PCR: 100-200bp	1-3ng
200-500bp	3-10ng
500-1000bp	5-20ng
1000-2000bp	10-40ng
>2000bp	40-100ng
DNA fita simples	50-100ng
DNA dupla fita	200-500ng
Cosmídeo/BAC	0,5-1µg
DNA genômico bacteriano	2-3µg

Quadro 1 - Quantidade de *template* recomendada para reação de sequenciamento no ABI 3130 xl

II - Montar as reações de sequenciamento, totalizando o volume final de 10 µL, utilizando como referência o seguinte protocolo:

Reagente	Quantidade (por reação)
Ready Reaction Kit	1 µL
BigDye Sequencing Buffer (5X)	1,0 µL
Primer (senso ou antisenso)	3,2 pmol
<i>Template</i>	Ver Quadro 1
Água deionizada	q.s.p.
Volume final	10 µL

Quadro 3 – Quantidades recomendadas para montagem da reação de sequenciamento com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1

IMPORTANTE: Para o preparo da reação controle (pGEM), utilizar os seguintes volumes:

Reagente	Quantidade (por reação)
Ready Reaction Kit	1 µL
BigDye Sequencing Buffer (5X)	1,5 µL
<i>Primer</i> M13	4,0 µL
pGEM	1,5 µL
Água deionizada	2 µL
Volume final	10 µL

OBSERVAÇÕES: (1) Montar a reação controle (pGEM) preferencialmente no poço H12; (2) O *primer* M13 e o pGEM são fornecidos juntamente com o kit de sequenciamento (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1).

III – Preparar as reações utilizando a seguinte ciclagem básica:

Protocolo Básico:	
Inicial	96°C 1 min
Denaturação	96°C 15 seg
Anelamento	50°C 15 seg
Extensão	60°C 4 min
	} 25-40 ciclos
Final	4-8 °C Infinito
<p>•Importante configurar o termociclador para uma rampa de 1 °/seg para facilitar o anelamento do primer.</p>	

Quadro 3 – Ciclagem básica para reação de sequenciamento com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1

IV – Precipitar as reações de sequenciamento seguindo um dos protocolos (Precipitação por Etanol/EDTA; Purificação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio; BigDye X Terminator Purification Kit) descritos no "DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis. Applied Biosystems Chemistry Guide. Second Edition" (Part Number 4305080 Rev. C 05/2009).

Alternativamente, pode ser realizada a precipitação por Etanol/Isopropanol, seguindo o protocolo utilizado na Plataforma de Sequenciamento e Análise de Fragmentos PDTIS/Fiocruz, descrito abaixo.

ETAPA	Precipitação da Reação de Sequenciamento (Etanol/Isopropanol)
1	Centrifugar a 700 rpm por 1 minuto ("Spin").
2	Adicionar 30 µL de Isopropanol 75% (Merck).
3	Ressuspender as amostras, com a pipeta, 3 a 4 vezes, para homogeneizá-las. Alternativamente, pode ser utilizado o vórtex.
4	Incubar a placa, por 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
5	Centrifugar, a 4°C, por 45 minutos, a 4.000 rpm.
6	Descartar o sobrenadante vertendo a placa sobre papel-toalha, através de movimentos circulares, apoiada sobre uma bancada.
7	Centrifugar a placa invertida sobre papel-toalha ("spin down"), a 800 rpm, por 1 minuto.
8	Adicionar 50 µL de Etanol 75% (Merck).
9	Centrifugar, a 4°C, por 15 minutos, a 4.000 rpm.
10	Descartar o sobrenadante usando papel-toalha, de acordo como descrito anteriormente.
11	Centrifugar a placa invertida sobre papel-toalha ("spin down"), a 800 rpm, por 1 minuto.
12	Colocar a placa em um bloco aquecido a 60 °C, por 10 minutos, ao abrigo da luz.

IMPORTANTE: Quando mantidas a -20 °C, devidamente seladas e protegidas da luz, as placas precipitadas poderão ser armazenadas por até 30 dias.

ANEXO I – Biblioteca genômica GBS (Poland *et al.* 2012) adaptada segundo protocolo do Laboratório de Análise Genética e Molecular (LAGM) da Universidade Estadual de Campinas.

LAGM

Protocolo – biblioteca genômica GBS (Poland *et al.* 2012)

Preparação de biblioteca GBS para plataforma Illumina – PstI + MspI

Jesse Poland (*USDA-ARS / Kansas State University*)

Patrick Brown (*University of Illinois*)

Adaptadores

Os adaptadores são oligonucleotídeos comuns (e.g. IDT, com dessalinização padrão, escala de síntese 25 μ M). Para cada adaptador, um par de oligos complementares é comprado e devem ser anelados para formar o adaptador dupla-fita antes de iniciar o protocolo. Após o anelamento, estes adaptadores são bastante estáveis e podem ser estocados a -20° C indefinidamente. Para o anelamento os adaptadores são submetidos a 95° C e resfriados lentamente (1° C por minuto) a 30° C. Este procedimento foi realizado em um termociclador comum com o seguinte programa de PCR: 1 ciclo de 95° C por 1 minuto; e 65 ciclos diminuindo a temperatura em 1° C por 1 minuto, iniciando em 95° C e terminando em 30° C. Os adaptadores contendo *barcodes* podem ser encomendados em placa e todo o procedimento de anelamento pode ser realizado em formato de placa. Os adaptadores (*barcodes* e comuns) devem ser quantificados após o anelamento para garantir que DNA dupla-fita tenha sido completamente formado e que eles estejam na concentração correta. Uma concentração uniforme de adaptadores é essencial para que o número de *reads* obtidos para cada indivíduo após o sequenciamento da biblioteca multiplex seja uniforme.

Quantificação e normalização do DNA

A concentração do DNA é crítica para produzir um número uniforme de *tags* e *reads* para cada amostra. É recomendado que o DNA seja quantificado usando um método baseado em fluorescência, tal como PicoGreen ou Qubit.

Digestão por restrição

O protocolo descrito por Poland *et al.* (2012) emprega digestão dupla com as enzimas de restrição *PstI* e *MspI*. A extremidade coesiva gerada por *PstI* corresponde ao Adaptador1 (que contém o *barcode*), enquanto a extremidade coesiva de *MspI* corresponde ao adaptador comum Adaptador2 (Adaptador-Y). A reação de sequenciamento acontece a partir do Adaptador1 e segue em sentido *downstream* incluindo a sequência *barcode*. As bibliotecas produzidas podem ser sequenciadas também a partir das duas extremidades na configuração *pair-end*.

Enzimas NEB são utilizadas neste protocolo uma vez que elas foram otimizadas para funcionarem com a mesma solução tampão (*PstI* e outras endonucleases podem ser utilizadas com o tampão “NEB Buffer4”).

Ligação

O processo de ligação dos adaptadores é realizado no mesmo tubo (ou placa) no qual foi realizada a reação de digestão. A reação de ligação é realizada com o tampão NEB Buffer4 com adição de ATP (NEB T4 DNA Ligase #M0202). Uma concentração muito elevada de enzima T4 é utilizada para garantir que a ligação de todos os fragmentos ocorra de maneira adequada. A concentração do Adaptador1 precisa ser ajustada dependendo da espécie. Por exemplo, para trigo e cevada, em torno de 0,1 pmol é adequado para ~200 ng de DNA genômico. O Adaptador2 pode ser adicionado em excesso, uma vez que ele não será amplificado a menos que a PCR tenha estendido o fragmento a partir do Adaptador1 na outra extremidade do fragmento. É importante que a enzima ligase seja inativada antes que seja feito o *pool* das amostras (65° C por 20 minutos após a reação de ligação).

Nota: Os autores do protocolo original sugerem a utilização de 50-100x mais Adaptador2 do que Adaptador1.

Multiplex

Os produtos da reação de ligação são misturados e submetidos à amplificação por PCR em microtubos

Protocolo – biblioteca genômica GBS (Poland *et al.* 2012)

individuais. Este passo produz uma biblioteca contendo 96 amostras, que será sequenciada em uma linha (ou *flowcell*) única em equipamento Illumina.

Amplificação por PCR

A biblioteca multiplex é amplificada por meio de PCR utilizando períodos de extensão curtos. Este procedimento visa o enriquecimento de fragmentos que contêm entre 200 e 500 bases, e que são mais apropriados à amplificação por ponte (*bridge PCR*). Apenas os fragmentos que contiverem um sítio de restrição *PstI* e outro sítio de restrição *MspI* serão amplificados. Os fragmentos com sítios de restrição *MspI-MspI* podem ser comuns, mas não serão amplificados devido aos Adaptadores Y. Os fragmentos com sítios de restrição *PstI-PstI* devem ser bastante raros.

PCRs múltiplas são realizadas para cada biblioteca na tentativa de reduzir a ocorrência de amplificação preferencial de fragmentos que podem ocorrer durante uma única reação de amplificação. As diferentes reações são então misturadas para compor a biblioteca final.

Anelamento dos adaptadores

Tampão de eluição (EB) 1X – 10 mM Tris-HCl, pH 8,0-8,5

Tampão do Adaptador (AB) 10X – 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl

Para os Adaptadores 1 (com *barcodes*), o procedimento é realizado em placas:

1. Suspender com EB 1X os oligos simples-fita para a concentração de 100 μM
2. Fazer alíquotas de 100 μL do Adaptador 1 dupla-fita com concentração de 10 μM :
 - 10 μL de cada adaptador simples-fita (com concentração de 100 μM)
 - 10 μL de AB 10X
 - 70 μL de água Milli-Q
 Aquecer a 95° C e resfriar a 30° C (diminuindo 1° C por minuto), Hold 4° C.
3. Diluir os adaptadores para aproximadamente 3 μM (3 adaptador : 10 água Milli-Q) e quantificar usando PicoGreen (~50 ng/ μL).
4. Normalizar a 1,6 ng/ μL (= 0,1 μM). Obs.: Esta é a concentração em ng/ μL da versão “curta” do Adaptador 1 (Veja abaixo). Adaptadores na versão “completa” deverão ter uma concentração em ng/ μL maior para atingirem a mesma molaridade.

Para os adaptadores comuns *MspI* (Adaptador 2), o procedimento é realizado em microtubos individuais, seguindo os mesmos passos, mas deixando as alíquotas de trabalho do Adaptador 2 com concentração de 10 μM .

Estoque de adaptadores:

Cada poço na placa de trabalho contendo os adaptadores terá 0,02 μM de Adaptador 1 e 3 μM de Adaptador 2.

Para fazer a placa de adaptadores adicionar em placas de 96 poços:

- 20 μL de Adaptador 1 (0,1 μM)
- 30 μL de Adaptador 2 (10 μM)
- 50 μL de AB 1X

Misturar bem, e aplicar um *spin* na placa.

Normalização do DNA

Normalizar a concentração das amostras de DNA para 20 ng/ μL , e distribuir 10 μL em placas de 96 poços.

Protocolo – biblioteca genômica GBS (Poland *et al.* 2012)

Protocolo

1. Reação de restrição (volume final = 20 µL)

7 µL de DNA (30 ng/µL = ~200 ng de DNA total)
13 µL de *mix* da reação de restrição

*Pst*I-HF – NEB #R3140 (20.000 U/mL)

*Msp*I – NEB #R0106 (20.000 U/mL)

Preparação do *mix* da reação de restrição:

	Por reação	1 placa (x100 + 10%)
NEB Buffer 4 (10X)	2,0 µL	220 µL
<i>Pst</i> I-HF [corte raro] (20 U/µL)	0,4 µL	44 µL
<i>Msp</i> I [corte frequente] (20 U/µL)	0,4 µL	44 µL
Água Milli-Q	10,2 µL	1122 µL

Normalizar as amostras de DNA para 30 ng/µL e distribuir 7 µL em uma placa de 96 poços;

Adicionar e misturar 13 µL do *mix* da reação de restrição aos 7 µL de DNA;

Realizar a reação de restrição seguindo os ciclos: 37° C por 12 h; 65° C por 20 min; 10° C indefinidamente.

Nota: Realizar a reação de ligação imediatamente.

2. Reação de ligação (volume final = 40 µL)

20 µL da reação de restrição

5 µL de adaptadores (Adaptador1 [0,02 µM] = ~0,1 pmol + Adaptador2 [3 µM] = ~15 pmol)

15 µL de *mix* da reação de ligação

	Por reação	1 placa (x100 + 10%)
NEB Buffer 4 (10X)	2,0 µL	220 µL
ATP (10 mM)	1,0 µL	110 µL
T4 DNA Ligase (200 U/µL)	0,5 µL	55 µL
Água Milli-Q	11,5 µL	1265 µL

Adicionar 5 µL de adaptador aos 20 µL da reação de restrição;

Adicionar e misturar 15 µL do *mix* da reação de ligação;

Realizar a reação de ligação seguindo os ciclos: 22° C por 2 h; 65° C por 20 min; 10° C indefinidamente.

Nota: Após a reação de ligação a placa pode ser armazenada a -20° C.

3. Multiplex (*Pool* de amostras)

Em uma *8-well strip* (ou 8 microtubos individuais) misturar 6 µL dos produtos de ligação de cada

Protocolo – biblioteca genômica GBS (Poland *et al.* 2012)

uma das colunas (1 a 12);

Misturar 5 µL da mistura de reações de ligação de cada poço da *strip* em um único microtubo de 1,5 mL (previamente adicionar 20 µL ao microtubo, volume total = 500 µL);

Purificar o multiplex utilizando colunas Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit).

Observações:

Realizar duas purificações para cada biblioteca;

Combinar 200 µL do multiplex das reações de ligação e 1000 µL do tampão PB (QIAquick PCR Purification Kit – protocolo abaixo) em um microtubo novo;

Adicionar 600 µL à coluna, centrifugar;

Adicionar os outros 600 µL, centrifugar;

Seguir as recomendações do fabricante e **ressuspender em 60 µL**. Combinar as duas purificações em um único microtubo (volume final = 120 µL).

4. Amplificação das bibliotecas: 8 PCRs para cada biblioteca (volume final = 25 µL)

10 µL da reação de ligação purificada

12,5 µL NEB Master Mix 2X

2,0 µL Iniciadores *forward* e *reverse* Illumina (10 µM)

0,5 µL de água Milli-Q

Programa (16 ciclos): 95° C por 30 s; 16 ciclos de (95° C por 10 s, 62° C por 20 s, 72° C por 30 s); 72° C por 5 min; 4° C indefinidamente.

Para cada biblioteca, misturar os produtos das 8 PCRs e purificar utilizando colunas Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit). Seguir as recomendações do fabricante e **ressuspender em 30 µL**.

* o tempo de extensão na PCR pode ser aumentado ou diminuído para otimizar a distribuição dos tamanhos dos fragmentos amplificados.

Verificar a qualidade das bibliotecas em gel de Agarose 1% (p/v) ou em equipamento BioRad Experion.

Protocolo de purificação – QIAquick PCR Purification Kit

1. Adicionar 5 volumes do Tampão PB a 1 volume de reação de PCR e misturar (se a cor da mistura for laranja ou violeta, adicionar 10 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,0) e misturar – a cor deve ser amarela);
2. Colocar uma coluna QIAquick em um tubo de 2 mL (*collection tube*);
3. Adicionar a mistura na coluna e centrifugar (13000 rpm) por 60 s, descartar o líquido e posicionar a coluna no mesmo *collection tube*;
4. Lavar adicionando 750 µL de Tampão PE à coluna e centrifugar (13000 rpm) por 60 s, descartar o líquido e posicionar a coluna no mesmo *collection tube*;
5. Centrifugar novamente (13000 rpm) por 60 s para remover tampão residual;
6. Adicionar a coluna num microtubo de 1,5 mL novo;
7. Eluir o DNA com o Tampão EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5), ou água (pH 7,0 – 8,5). Dispensar o tampão no centro da coluna, aguardar 1 min e centrifugar (13000 rpm) por 60 s.

Protocolo – biblioteca genômica GBS (Poland *et al.* 2012)

Adaptadores

ADAPTADOR1

Adaptadores com *barcode* (Adaptador1)

Este é o adaptador com sequências *barcode* de comprimento variável. Um exemplo de Adaptador1 com a sequência *barcode* XXXXX:

```
5' CACGACGCTCTCCGATCTXXXXTGCA      GNNNNNNN 3'
3' GTGCTGCGAGAAGGCTAGAXXXXX      ACGTCNNNNNN 5'
```

Esta é a versão "curta" dos adaptadores com sequência *barcode* (XXXXX) (Tm = 57)

```
_bot   XXXXXagatcggagagcgctcgtg
_top   cacgacgctctccgatctXXXXtgca
```

ADAPTADOR2

Adaptadores comuns (Adaptador2)

Estes adaptadores são desenhados respectivamente para a segunda enzima usada no protocolo de digestão dupla. Eles são desenhados para sequenciamento *pair-end*. O Adaptador2 possui forma de Y, uma vez que o iniciador *reverse* (A2Rprimer) só poderá ser anelado caso o iniciador *forward* (A1Fprimer) tenha sido estendido a partir da outra extremidade do fragmento (um sítio de restrição *Pst*I com o Adaptador1). O Adaptador2 possui uma extremidade coesiva 5'-CG para o sítio de restrição *Msp*I. (Caso uma enzima deixar uma extremidade coesiva 3' (i.e. *Pst*I) uma combinação diferente de adaptadores deve ser desenhada).

Adaptador2 (PE) para *Msp*I (C | CGG)

```
5' nnnnnnnC   CGAGATCGGAAGAGCGGGGACTTTAAGC
3' nnnnnnnGGC   TCTAGCCTTCTCGCCAAGTCGTCCTTACGGCTCTGGCTAG
```

```
>Adpt2PE_top_cg
cgAGATCGGAAGAGCGGGGACTTTAAGC
```

```
>Adpt2PE_bot
GATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTCCGATCT
```

Adaptador2 (PE) para *Ava*II (G | GWCC)

```
>Adpt2PE_top_gtc
gtcAGATCGGAAGAGCGGGGACTTTAAGC
```

```
>Adpt2PE_top_gac
gacAGATCGGAAGAGCGGGGACTTTAAGC
```

Iniciadores

Os iniciadores Illumina são idênticos aos oligos existentes nas *flowcells*, com a adição de sequências adaptadoras complementares ao Adaptador1 (*forward*) e, no caso de sequenciamento *pair-end* ao Adaptador2 (*reverse*).

```
>IlluminaF_PE (Tm=70) 58 pb (Tm=57)
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT
```

```
>IlluminaR_PE (Tm=70) 46 pb (Tm=62)
CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAA
```

Adaptador1 + iniciador + *barcode* = 62 - 68 pb

Adaptador2 + iniciador = 61 pb

Tamanho mínimo do fragmento = ~125 pb

ANEXO J – Declaração de Bioética e Biossegurança



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



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Genética e genômica populacional de Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae) em uma área de alta pressão de infestação domiciliar no Nordeste do Brasil - Population genetics and genomics of Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Maria Carolina Viana Alves

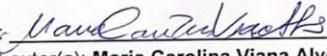
Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): Carlos Eduardo de Almeida

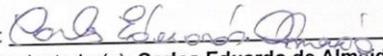
Data: 24 de Junho de 2024

ANEXO K – Declaração de Direitos Autorais.**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Genética e genômica populacional de *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) em uma área de alta pressão de infestação domiciliar no Nordeste do Brasil - Population genetics and genomics of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae) in an area of high pressure of domiciliary infestation in Northeastern Brazil**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 24 de Junho de 2024

Assinatura: 
Nome do(a) autor(a): **Maria Carolina Viana Alves**
RG n.º 12438500-6

Assinatura: 
Nome do(a) orientador(a): **Carlos Eduardo de Almeida**
RG n.º 090191297