

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**



Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana em comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil, e riscos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* às populações humanas da região

**por
Fernando Braga Stehling Dias**

**Belo Horizonte
Fevereiro/2011**

TESE DDIP-CPqRR F.B.S. DIAS 2011

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana em comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil, e riscos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* às populações humanas da região

por
Fernando Braga Stehling Dias

**Tese apresentada com vistas à
obtenção do Título de Doutor em
Ciências na área de concentração
Doenças Infecciosas e Parasitárias.**

Orientação: Dra. Líléia Diotaiuti

Belo Horizonte
Fevereiro/2011

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

D541a Dias, Fernando Braga Stehling.
2011

Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana em comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil, e riscos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* às populações humanas da região / Fernando Braga Stehling Dias. – Belo Horizonte, 2011.

xxx, 185 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 198 - 215

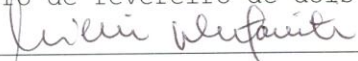
Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

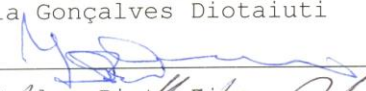
1. Doença de Chagas/transmissão 2.
Trypanosoma cruzi/parasitologia 3.
Rhodnius/parasitologia 4. Ecossistema
amazônico/prevenção & controle I. Título. II.
Diotaiuti, Líléia (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3


Ata da quadragésima segunda defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno Fernando Braga Stehling Dias, sob a orientação da Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti.


Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e onze, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da quadragésima segunda defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A tese do aluno Fernando Braga Stehling Dias intitula-se "Aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana em comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil, e os riscos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* às populações humanas da região". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti - CPqRR/FIOCRUZ (orientadora/Presidente), Dr. João Carlos Pinto Dias - CPqRR/FIOCRUZ (Titular), Dr. Herton Helder Rocha Pires - UFVJM (Titular), Dra. Angela Cristina Veríssimo Junqueira - IOC/FIOCRUZ (Titular) e Dr. Marcos Takashi Obara - CGLAB/Brasília (titular). Após argüir o aluno e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o aluno foi considerado APROVADO. Uma vez encerrado o exame, eu, Liléia Gonçalves Diotaiuti, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e quatro de fevereiro de dois mil e onze.


Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti


Dr. João Carlos Pinto Dias


Dr. Herton Helder Rocha Pires


Dra. Angela Cristina Veríssimo Junqueira


Dr. Marcos Takashi Obara

"Ninguém sabe tudo, assim como ninguém ignora tudo. O saber começa com a consciência do saber pouco. É sabendo que se sabe pouco que uma pessoa se prepara para saber mais....o homem como ser histórico, inserido num permanente movimento de procura, faz e refaz constantemente o seu saber."

Paulo Freire

"Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-fazer-se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo, educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade".

Paulo Freire

A presente tese foi desenvolvida no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Liléia Diotaiuti e no *Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation* do *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) com a colaboração da Dra. Myriam Harry, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

Dedico esta tese

Aos meus pais,
Marco Aurélio e Maria Helena

Às populações ribeirinhas amazônicas....

Agradecimentos

Agradeço

À minha orientadora, Dra. Liléia Diotaiuti, especialmente pela dedicação e confiança! O agradável convívio e seus ensinamentos SEMPRE estarão presentes em minha memória. Te agradeço pelo apoio constante e por estar sempre ao meu lado, tanto nos momentos felizes, mas também nos momentos difíceis.

À Dra. Christine Agueda Romaña, primeiramente pelo convite para participar do projeto PLUPH. Agradeço pela receptividade e hospitalidade em me receber em sua casa; pelas sugestões, empenho e dedicação para a concretização deste trabalho, e por permitir o desenvolvimento de parte desta tese na França.

À Dra. Myriam Harry, pessoa muito querida e com quem eu tive grandes aprendizados.

Ao Dr. Carlos Eduardo de Almeida, pelos bons momentos que compartilhamos e vivemos juntos em Paris. Sou muito grato por permitir a finalização dos meus experimentos no *Laboratoire Evolution Génomes et Spéciation* (LEGS)

Ao Dr. Ricardo José de Paula Souza e Guimarães, pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, pela colaboração análises cartográficas.

À Dra. Alessandra Guarneri, pesquisadora do Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, pela doação dos triatomíneos infectados em laboratório.

À Marion Quartier, doutoranda do projeto PLUPH, uma pessoa encantadora e alegre. Admito que é difícil expressar minha gratidão por você. *Merci beaucoup, ma chérie!!*

Ao Guy Mejía, colaborador do projeto PLUPH e professor da Universidad de Magdalena, Colômbia, pela amizade, belas discussões e, sobretudo, pela grande ajuda nos trabalhos de campo.

À Dra. Maria Victoria Periago pela amizade e disponibilidade para tradução e revisão de textos em inglês.

Ao Fábio Sidônio pelo companheirismo nos trabalhos de campo.

Aos demais estudantes e pesquisadores do PLUPH.

A todos os colaboradores do LATEC pela amizade e agradável convivência de muitos anos.

À equipe IRD (*Institut de Recherche pour le Développement*) do *Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation* (LEGS), especialmente à Amandine Fossoud, Annie Amirault, Claire Capdevielle-Dulac, François Rebaudo, Jean-François Silvain, Laure Kaiser-Arnauld, Lise Pingault, Mariangela Arca, Maud Lecomte e Paul-André Calatayud, pela harmoniosa convivência e, sobretudo, pela paciência.

Aos moradores das comunidades de Araipá, Nova Estrela e São Tomé por permitir o desenvolvimento desta tese e pelas ajudas nos trabalhos de campo.

À toda tripulação dos barcos Dona Zizi e Gênese, pelo esforço, pela garra e, sobretudo, pelo auxílio na logística das atividades de campo.

À Maria Inês Mascarenhas, pela ajuda constante e serviços prestados de secretaria.

À Mme. Simone Ménager et Mme. Denise, pessoas muito queridas com quem tive a oportunidade de conviver. Além da agradável companhia, vocês foram as minhas grandes professoras...*Merci à vous!*

À Anna Carolina Lustosa pelas ajudas nas análises estatísticas

Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Angela Cristina Verissimo Junqueira, Dr. Herton Helder Rocha Pires e Dr. João Carlos Pinto Dias, pelas valiosas sugestões que contribuíram muito para o enriquecimento desta tese.

Ao Centro de Pesquisa René Rachou, em nome do atual diretor, Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,

pela oportunidade.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma.

À minha família pelo apoio e amor incondicional.

Muito obrigado!

Às diversas instituições de financiamento e fomento envolvidas nesta tese: Projeto *Poor Land Use, Poor Health* (PLUPH), *International Development Research Centre* (IDRC), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)-*Centre Nationale de la Recherche Scientifique* (CNRS).

Sumário

Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xxi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xxiv
Resumo.....	xxvii
Abstract.....	xxix
1 INTRODUÇÃO.....	31
1.1 PLUPH - “Poor Land Use, Poor Health”: Primary prevention of human health through sound land-use for small-scale farmers of the humid tropics.....	32
1.2 A doença de Chagas.....	33
1.3 Triatomíneos: os vetores da doença de Chagas.....	34
1.4 <i>Trypanosoma cruzi</i> : o agente etiológico da doença de Chagas.....	37
1.5 <i>Trypanosoma rangeli</i>	41
1.6 Amazônia, a doença de Chagas e seus vetores.....	43
2 OBJETIVOS.....	51
2.1 Objetivo Geral.....	52
2.2 Objetivos específicos.....	52
3 METODOLOGIA.....	53
3.1 Área de Estudo.....	54
3.2 Coleta dos Triatomíneos.....	57
3.3 Identificação morfológica e molecular dos insetos coletados.....	60
3.4 Exame parasitológico das fezes e exame de hemolinfa.....	61
3.5 Isolamento de Tripanosomatídeos e cultivo.....	61
3.6 Extração de DNA dos triatomíneos.....	62

3 METODOLOGIA (continuação...)

3.7	Caracterização molecular de tripanosomatídeos.....	64
3.7.1	Identificação da infecção natural por <i>Trypanosoma rangeli</i> nos insetos coletados.....	64
3.7.2	Identificação da infecção natural por <i>Trypanosoma cruzi</i> nos insetos coletados.....	65
3.8	Controles positivo e negativo das reações de <i>Trypanosoma rangeli</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
3.9	Caracterização molecular de cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> de acordo com o novo consenso.....	67
3.9.1	Espaçador intergênico não transcrito do gene do Mini exon.....	68
3.9.2	Domínio divergente D7 do locus 24Sα rRNA (LSU rDNA).....	69
3.9.2.1	Clonagem dos fragmentos amplificados do domínio divergente D7 do locus 24Sα rRNA (LSU rDNA).....	69
3.9.3	Glucose-6-fostato isomerase – PCR/RFLP (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>).....	72
3.9.4	Gene HSP60 - <i>Heat Shock Protein</i> PCR/RFLP (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>).....	73
3.10	Identificação das fontes alimentares dos triatomíneos: amplificação de fragmento do gene Citocromo B mtDNA.....	74
3.11	Purificação do produto de PCR.....	75
3.12	Sequenciamento.....	75
3.13	Reação de sequência e precipitação de DNA.....	75
3.14	Tratamento das sequências das fontes alimentares.....	76
3.15	Cartografia das áreas de estudo a partir de imagens de satélites como indicadores ecológicos de risco.....	77
3.16	Análises estatísticas.....	79
4	RESULTADOS.....	80
4.1	Coleta dos triatomíneos e infestação das palmeiras.....	81

4 RESULTADOS (Continuação...)

4.2	Densidade populacional.....	85
4.3	Infecção por Tripanossomatídeos.....	91
4.3.1	Exame parasitológico direto e exame da hemolinfa.....	91
4.3.2	Identificação da infecção natural de <i>Rhodnius</i> spp por <i>Trypanosoma cruzi</i> empregando método molecular.....	93
4.3.3	Identificação da infecção natural de <i>Rhodnius</i> spp por <i>Trypanosoma rangeli</i> empregando método molecular.....	98
4.3.4	Infecção Mista.....	104
4.4	Caracterização molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> de acordo com o novo consenso.....	105
4.4.1	Espaçador intergênico não transcrito do gene do mini exon.....	105
4.4.2	Domínio divergente D7 do locus 24 α rRNA (LSU rDNA) e clonagem dos fragmentos.....	106
4.4.3	Glucose 6-fosfato Isomerase.....	108
4.4.3.1	PCR-RFLP: digestão do produto amplificado da Glucose-6-fosfato isomerase com enzima de restrição HhaI.....	108
4.4.4	Gene HSP60 - <i>Heat Shock Protein</i>	110
4.4.4.1	PCR-RFLP: digestão do produto amplificado do gene HSP60 (<i>Heat Shock Protein</i>) com enzima de restrição EcoRV.....	111
4.5	Fauna associada às palmeiras.....	112
4.6	Identificação das fontes alimentares dos triatomíneos.....	114
4.7	Cartografia da área de estudo.....	118
5	DISCUSSÃO.....	131
5.1	Área de estudo, infestação das palmeiras e densidade triatomínica.....;	132
5.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>	138
5.3	Fontes alimentares.....	143
5.4	Cartografia das áreas de risco.....	147

5	DISCUSSÃO (Continuação...)	
5.5	Considerações finais.....	148
6	CONCLUSÕES.....	150
7	ANEXOS.....	152
7.1	Autorização do IBAMA para coleta e transporte de triatomíneos.....	153
7.2	Ficha de campo utilizada nas coletas dos triatomíneos.....	157
7.3	Protocolo para preparação do meio de cultura SOC usado nas clonagens.....	158
7.4	Protocolo para preparação do meio de cultura LB usado nas clonagens.....	159
7.5	Autorização do IBAMA para exportação de material biológico.....	160
7.6	Publicação da Tese.....	162
7.7	Outras publicações	167
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	198

LISTA DE FIGURAS

Figura da capa	Amazônia Legal: o Brasil visto do espaço (Fonte: Embrapa)	I
Figura 1	Diferentes genótipos e distribuição geográfica de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Revista Nature, cortesia de Martin S. Llewellyn e Michael A. Miles).	40
Figura 2	Esquema do triplo ensaio proposto por LEWIS <i>et al</i> (2009) e adotado pelo novo consenso de nomenclatura intraespecífica de <i>Trypanosoma cruzi</i> (ZINGALES <i>et al.</i> , 2009).	41
Figura 3	Casas típicas das áreas de estudo	56
Figura 4	Cartografia da localização das três comunidades estudadas	57
Figura 5	Etapas de dissecação das palmeira para a coleta dos triatomíneos	58
Figura 6	Esquema metodológico empregado para a extração de DNA dos triatomíneos coletados	64
Figura 7	Local de anelamento dos iniciadores T7 e SP6 usados na clonagem dos fragmentos amplificados do domínio divergente D7 do <i>locus</i> 24Sa rRNA (LSU rDNA)	71
Figura 8	Espécies de palmeiras pesquisadas nas comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil	83
Figura 9	Espécies de triatomíneos encontradas nas palmeiras das comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil.	85
Figura 10	Box plot da densidade de triatomíneos coletados nas palmeiras das três comunidades pesquisadas no ano de 2008	86
Figura 11	Box plot da densidade de triatomíneos coletados nas três comunidades por espécie de palmeira no ano de 2008	86
Figura 12	Box plot da densidade de triatomíneos coletados nas palmeiras de Araiá e São Tomé no ano de 2009	87

LISTA DE FIGURAS (continuação...)

Figura 13	Box plot da densidade de triatomíneos coletados nas três comunidades por espécie de palmeira no ano de 2009	88
Figura 14	Densidade triatomínica encontrada nas palmeiras pesquisadas por comunidade e período de coleta	89
Figura 15	Amplificação via PCR do gene do mini exon de <i>Trypanosoma cruzi</i> em triatomíneos infectados	94
Figura 16	Porcentagem do número de triatomíneos infectados (I) e não infectados (NI) pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> , por espécie de palmeira em 2008 e 2009	95
Figura 17	Porcentagem do número de triatomíneos infectados (I) e não infectados (NI) pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> , por espécie de palmeira nas duas coletas de campo	95
Figura 18	Amplificação via PCR do gene repetitivo de ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) de triatomíneos infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i>	99
Figura 19	Porcentagem do número de triatomíneos infectados (I) e não infectados (NI) pelo <i>Trypanosoma rangeli</i> , por comunidade nas duas coletas de campo	99
Figura 20	Porcentagem do número de triatomíneos infectados (I) e não infectados (NI) pelo <i>Trypanosoma rangeli</i> , por espécie de palmeira em 2008 e 2009	100
Figura 21	Amplificação via PCR com a utilização dos iniciadores TC, TCI e TCII para a caracterização de <i>Trypanosoma cruzi</i> de acordo com o novo consenso	105
Figura 22	Amplificação do domínio divergente D7 do locus 24a rRNA (LSU rDNA) de <i>Trypanosoma cruzi</i> via PCR com os iniciadores D71/D72	107
Figura 23	Amplificação da enzima Glucose-6-fosfato Isomerase de <i>Trypanosoma cruzi</i> via PCR com os iniciadores GPI_R e GPI_F	108
Figura 24	Diferentes subgrupos de <i>Trypanosoma cruzi</i> após a digestão do iniciador GPI com a enzima de restrição HhaI	109

LISTA DE FIGURAS (continuação...)

Figura 25	Exemplo de diferentes padrões encontrados nos triatomíneos utilizados para caracterização molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> após a digestão do iniciador GPI com a enzima de restrição HhaI	110
Figura 26	Amplificação do gene HSP60 (Heat Shock Protein) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	110
Figura 27	Fauna de vertebrados associada às palmeiras na região do médio Tapajós, Amazônia brasileira.	113
Figura 28	Fauna de invertebrados associada às palmeiras na região do médio Tapajós, Amazônia brasileira	113
Figura 29	Mapa de distribuição de alguns mamíferos identificados pelo conteúdo intestinal dos triatomíneos na amplificação de fragmento do Citocromo B mitocondrial, segundo EISENBERG & REDFORD (1989)	115
Figura 30	Mapa da cobertura vegetal mostrando as florestas primárias e secundárias, e os desflorestamentos por ano de 2000-2009	122
Figura 31	Distribuição das espécies de palmeiras dissecadas nas três comunidades	123
Figura 32	Distribuição das espécies de palmeiras dissecadas nas três comunidades	124
Figura 33	Mapa da infestação das palmeiras pelos triatomíneos mostrando os "hotspots".	125
Figura 34	Mapa da infestação das palmeiras pelos triatomíneos mostrando dentro dos "hotspots" a densidade dos triatomíneos	126
Figura 35	Mapa da distribuição espacial de infecção dos triatomíneos pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> mostrando os "hotspot"	127
Figura 36	Mapa da distribuição espacial de infecção dos triatomíneos pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> mostrando dentro dos "hotspot" a densidade de triatomíneos infectados	128
Figura 37	Mapa da distribuição espacial da densidade de triatomíneos mostrando os "hotspot"	129

LISTA DE FIGURAS (continuação...)

- Figura 38 Mapa da distribuição espacial da densidade de triatomíneos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* mostrando os "hotspot" 130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos principais grupos de <i>Trypanosoma cruzi</i> de acordo com ANONYMOUS, 1999	39
Tabela 2	Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase nos estudos da caracterização molecular de <i>Trypanosoma rangeli</i> do gen repetitivo de RNA nucleolar C11 (sno-RNA-C11) (MORALES et al., 2002; PAVIA et al., 2007).	65
Tabela 3	Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase nos estudos da caracterização molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> de parte da região intergênica do gene do mini exon (SOUTO et al., 1996).	66
Tabela 4	Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase nos estudos da caracterização molecular de <i>Trypanosoma cruzi</i> da enzima Glucose-6-fostato isomerase e do gene Heat Shock Protein (modificado de LEWIS et al., 2009).	72
Tabela 5	Condições estabelecidas para as reações de sequências.	76
Tabela 6	Infestação das palmeiras pesquisadas por triatomíneos de acordo com comunidade, ano de coleta.	84
Tabela 7	Densidade de triatomíneos coletados por espécie de palmeira, por comunidade e por período	89
Tabela 8	Número de triatomíneos coletados em cada comunidade, em relação ao período de coleta, espécie de palmeira e estágio evolutivo dos insetos	90
Tabela 9	Número de triatomíneos capturados, examinados, infectados com tripanosomatídeos, por comunidade, espécie de palmeira e período de coleta	92
Tabela 10	Número de triatomíneos examinados/infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> através da PCR na comunidade de Agrovila-Araipá, por ano de coleta e estágio evolutivo.	96

LISTA DE TABELAS (continuação...)

Tabela 11	Número de triatomíneos examinados/infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> através da PCR na comunidade de Nova Estrela, 2008, por estágio evolutivo	96
Tabela 12	Número de triatomíneos examinados/infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> através da PCR na comunidade de São Tomé, por ano de coleta e estágio evolutivo	97
Tabela 13	Dados globais do número de triatomíneos examinados/infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i> através da PCR nas três comunidades pesquisadas, por ano de coleta e estágio evolutivo	97
Tabela 14	Número de triatomíneos examinados/infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> através da PCR na comunidade Agrovila-Araipá, por ano de coleta e estágio evolutivo	102
Tabela 15	Número de triatomíneos examinados/infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> através da PCR na comunidade Nova Estrela, 2008 e estágio evolutivo	102
Tabela 16	Número de triatomíneos examinados/infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> através da PCR na comunidade São Tomé, por ano de coleta e estágio evolutivo	103
Tabela 17	Dados globais do número de triatomíneos examinados/infectados com <i>Trypanosoma rangeli</i> através da PCR nas três comunidades pesquisadas, por ano de coleta e estágio evolutivo	103
Tabela 18	Número de triatomíneos com dupla infecção (presença de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma rangeli</i>) detectada via PCR, 2009	104
Tabela 19	Diferentes tamanhos de fragmentos obtidos da enzima Glucose-6-fostato Isomerase de <i>Trypanosoma cruzi</i> após digestão com a enzima de restrição HhaI (valores expressos em pares de base, de acordo com LEWIS <i>et al</i> , 2009).	109
Tabela 20	Diferentes padrões obtidos após digestão do gene HSP60 de <i>Trypanosoma cruzi</i> com a enzima de restrição EcoRV	111

LISTA DE TABELAS (continuação...)

Tabela 21	Relação das fontes de alimentação de vertebrados identificadas no conteúdo intestinal dos triatomíneos.	116
Tabela 22	Dados de infestação das palmeiras, infecção dos triatomíneos por <i>Trypanosoma cruzi</i> , densidade populacional, número de triatomíneos alimentados e estimativa do processo de antropização nas três comunidades estudadas	120
Tabela 23	Porcentagem de floresta primária e floresta secundária nas três comunidades, considerando uma área com um raio de 500m no entorno das palmeiras dissecadas	121
Tabela 24	Porcentagem de floresta primária e floresta secundária nas três comunidades, considerando uma área com um raio de 1km no entorno das palmeiras dissecadas	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
RNA	-	Ácido ribonucléico
α	-	Alfa
~	-	Aproximadamente
BSA	-	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BOD	-	Estufa incubadora
CytB	-	citocromo B
cl	-	clone
DTU	-	Discrete Typing Unit
FSC	-	<i>Forward Angle Light Scatter</i> (Tamanho celular)
MgCl ₂	-	cloreto de magnésio
dNTP	-	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	-	DL-Dithiothreitol
rDNA	-	DNA recombinante
°	-	grau
°C	-	grau celsius
GPS	-	<i>Global Positioning System</i>
H	-	Horas
kDNA	-	DNA de Cinetoplasto
LATEC	-	Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
LB	-	<i>Lysogeny Broth</i>
LSU	-	<i>Large Subunit</i>
LIT	-	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
m ²	-	metro quadrado
μL	-	Microlitro

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS (continuação...)

μM	-	Micromolar
MLEE	-	Eletroforese de enzima multi <i>locus</i>
mL	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
min	-	Minutos
nm	-	Nanometro
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OPAS	-	Organização Panamericana da Saúde
pb	-	pares de bases
PBS	-	Tampão Fosfato Salino
PLUPH	-	Poor Land Use, Poor Health
PNCDCh	-	Programa Nacional de Controle da doença de Chagas
%	-	porcentagem
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	-	Potencial hidrogeniônico
RAPD	-	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
PPFP	-	Percentual de parasitos fluorescentes
RFLP	-	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rRNA	-	RNA ribossomal
SBF	-	Soro Fetal Bovino
SVS	-	Secretaria de Vigilância em Saúde
seg	-	Segundos
SOC	-	<i>Super Optimal Broth</i>
SSC	-	<i>Side Angle Light Scatter</i> (Granulosidade celular)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS (continuação...)

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE - Tris Borato EDTA

TE - Tris-EDTA

UV - ultra violeta

U - Unidade

X - Vezes

O número crescente de casos agudos da doença de Chagas no estado do Pará, notificados nas últimas duas décadas, tem sido associados, em parte, a ingestão de suco de frutos de palmeiras locais, principalmente açaí e bacaba. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana em comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil, e riscos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* às populações humanas da região. Para isto, foram dissecadas 136 palmeiras, sendo 60 no final do período chuvoso e 76 no final do período de seca. Destas, 73 (53,7%) estavam infestadas por triatomíneos e foram encontradas três espécies, a saber: *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes* e *Panstrongylus lignarius*. Foram coletados 743 triatomíneos, sendo predominante a presença de *R. robustus* (n=739). A identificação da infecção natural dos insetos por tripanosomatídeos revelou que 125 triatomíneos estavam infectados pelo *T. cruzi*, 69 por *T. rangeli* e 14 apresentaram ambos os parasitas, indicando a presença de infecção mista no mesmo vetor. Foi realizada a tipagem molecular de *T. cruzi* de acordo com a nova nomenclatura e os resultados demonstraram predominância do grupo TCI (n=29). Além disso, foi constatada a ocorrência de TCII, a presença de TCI e TCII no mesmo triatomíneo e 12 isolados de TCI apresentaram uma variante, sugerindo a existência de um subgrupo dentro de TCI. A análise das fontes alimentares revelou que *R. robustus*, espécie predominante de triatomíneo coletada nas palmeiras investigadas, alimentou-se na sua grande maioria em mamíferos silvestres. Foram também identificados "sangue" de outras fontes alimentares, como aves e répteis no conteúdo digestivo dos espécies investigados. As análises cartográficas de Kernel e do Interpolador de Médias demonstraram que a comunidade São Tomé apresenta maiores aglomerados (*hotspots*) tanto em infestação das palmeiras, quanto na densidade triatomínica e número de insetos infectados. Desta forma, os resultados sugerem que São Tomé é a comunidade com maior risco de infecção à população e demonstram a existência de um ciclo silvestre intenso na região que demanda vigilância para prevenção da transmissão.

The increasing number of acute cases of Chagas Disease in the state of Pará, notified in the last two decades, were in part associated with the ingestion of juice from fruits of local palm trees, mainly açaí and babaca. The objective of this study was to evaluate the ecological aspects of American Trypanosomiasis in communities from the middle of Tapajós, Pará, Brazil, as well as the risks of transmission of *Trypanosoma cruzi* to the human populations of the region. In order to achieve this, 136 palm trees were dissected; 60 of them during the rainy season and 76 during the end of the dry season. Seventy-three (53.7%) of these were infested with three different species of triatomines: *Rhodnius robustus*, *Rhodnius pictipes* and *Panstrongylus lignarius*. In total, 743 triatomines were collected with *R. robustus* (n=739) as the most abundant. Through dissection of the collected insects, the presence of a natural infection by *T. cruzi* (n=125) and *T. rangeli* (n=69) was shown, while 14 insects had a mixed infection of both parasites. The molecular typing of *T. cruzi* according to the new nomenclature showed a predominance of the group TCI (n=29). The presence of TCII was also observed, as well as the presence of mixed infections of TCI and TCII, but most importantly, 12 isolates of TCI presented a variation, suggesting the presence of a subgroup within TCI. Analysis of the food sources revealed that *R. robustus*, the predominant triatomine species collected from the investigated palm trees, fed mainly from wild mammals. "Blood" from other food sources, like birds and reptiles, were also found in the digestive content of the species collected. The analysis of Kernel's cartography and of the Interpolation of Average showed that the community of São Tomé presents the largest hotspots with respect to the infestation of palm trees, the density of triatomines and the number of insects with natural infections. Therefore, the population of the community of São Tomé is considered to be the one with the greatest risk of infection and our results show the existence of an intense sylvatic cycle that demands surveillance in order to prevent transmission in the region.

1.1 PLUPH - “*Poor Land Use, Poor Health*”: Primary prevention of human health through sound land-use for small-scale farmers of the humid tropics

“Terras esgotadas, saúde precária”: prevenção primária em saúde humana por meio do uso sustentável das terras pelos pequenos agricultores das regiões tropicais úmidas.

A presente tese faz parte de um projeto de cooperação internacional denominado *PLUPH (Poor Land Use, Poor Health): Terras esgotadas, saúde precária - prevenção primária em saúde humana por meio do uso sustentável das terras pelos pequenos agricultores das regiões tropicais úmidas*. O projeto PLUPH tem como objetivo principal assegurar a saúde de pequenos agricultores dos trópicos úmidos, por meio da prevenção primária referente aos problemas emergentes e sinérgicos da contaminação mercurial e doença de Chagas, relacionados ao mau uso e ocupação do solo, por meio da execução de sistemas de cultivo adaptados ao mosaico das paisagens e das culturas, e tem financiamento do Programa Teasdale Corti, Iniciativa de Pesquisa em Saúde Global (IDRC - *International Development Research Centre*).

Este projeto foi concebido coletivamente e está sendo realizado por uma equipe interdisciplinar, composta por pesquisadores de universidades e centros de pesquisas do Brasil, Canadá e França, representantes do governo brasileiro no desenvolvimento de agro-práticas de colonização e de saúde pública, bem como líderes de opinião locais. As áreas de estudo foram selecionadas por pesquisadores do projeto PLUPH. Foram escolhidas três comunidades na região do médio rio Tapajós, Estado do Pará, por serem heterogêneas em relação à paisagem, cultura e hábitos alimentares de seus habitantes. O projeto é composto por sete estudantes de doutorado e 11 alunos de mestrado, que estão envolvidos na investigação sobre temas complementares, tais como a definição de áreas de risco de exposição ao mercúrio e infecção para a doença de Chagas; identificação da sinergia entre estas duas questões de saúde; a compreensão das redes de

comunicação social e as percepções com relação à saúde da terra; avaliação do impacto potencial das políticas públicas na região; avaliação dos resultados obtidos pelos sistemas agrícolas implementados em termos de redução da lixiviação, dentre outros temas.

1.2 A doença de Chagas

Pouco mais de 100 anos após a sua descoberta, a doença de Chagas ainda continua como um dos mais sérios problemas de saúde pública na América Latina. Segundo dados da Organização Panamericana da Saúde (OPAS) estima-se que esta enfermidade acomete cerca de oito milhões de pessoas, sendo que aproximadamente 102 milhões vivem em área de risco, podendo se infectar com o agente etiológico, o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. No Brasil, estima-se que cerca de um milhão e novecentas mil pessoas possuam o mal de Chagas (RASSI-JÚNIOR *et al.*, 2010).

A doença de Chagas é considerada uma doença tropical, endêmica em certas regiões do Brasil e em outros 20 países da América Latina, e incluída na lista das doenças negligenciadas da OMS. Na maioria dos casos está relacionada com populações de baixa renda, que vivem em habitações precárias, muitas vezes construídas de barro, madeira e teto de palha. Pelo fato da doença de Chagas estar associada com este cenário de pobreza, poucos (ou quase nenhum) investimentos têm sido empregados por indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento dos casos agudos e crônicos desta moléstia (CLAYTON, 2010).

A transmissão da doença de Chagas pode ocorrer de diversas maneiras, sendo a transmissão vetorial a principal forma de infecção aos humanos e responsável por aproximadamente 80% dos casos (DIAS, 1987; SCHOFIELD, 1994). Porém outros mecanismos de transmissão já foram descritos e merecem atenção, tais como a transmissão transfusional, oral, acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos e congênita. Países europeus onde não existe o vetor nem o parasita têm notificado novos casos da

doença de Chagas devido o intenso fluxo migratório de latinos americanos chagásicas (DEVELOUX *et al.*, 2010). COURA & VIÑAS (2010) apontam que os principais mecanismos de transmissão do *T. cruzi* nos países que não ocorrem a transmissão vetorial da doença estão ligados a transfusão sanguínea, transmissão vertical e transplantes de órgãos. Estima-se que o número de pessoas infectadas em países não endêmicos distribuídos entre quatro continentes (América do Norte, Europa, Ásia e Oceania) seja superior a 390 mil pessoas (COURA & VIÑAS, 2010; RASSI-JR *et al.*, 2010).

1.3 Triatomíneos: os vetores da doença de Chagas

Os vetores da doença de Chagas são insetos da ordem Hemiptera, subfamília Triatominae e conhecidos popularmente no Brasil como barbeiros, bicho de parede, bicimo, chupão, fincão, procootó e vum vum. Estes insetos possuem hábito alimentar hematófago, embora já tenha sido relatado na literatura o coprofagismo e a hemolinfagia (LENT & WYGODZINSKY, 1979; SANDOVAL *et al.*, 2000a).

Os triatomíneos são insetos hemimetábolos, possuem cinco estádios ninfais antes de chegar a adulto, e todos os estádios evolutivos são capazes de transmitir o *T. cruzi* ao hospedeiro vertebrado (mamíferos).

A colonização de habitações humanas pelos triatomíneos, o curto espaço de tempo entre o repasto sanguíneo e a defecação, e a presença de enzimas vasodilatadoras, anestésicas, inibidores de coagulação sanguínea e antiagregadores de plaquetas presentes na saliva dos triatomíneos são algumas características fundamentais para que as espécies sejam classificados como bons vetores na transmissão do *T. cruzi* aos humanos (DIOTAIUTI *et al.*, 2000).

Atualmente são reconhecidas 141 espécies de triatomíneos divididos em cinco tribos e 15 gêneros (GALVÃO *et al.*, 2003; GALVÃO & SCHOFIELD, 2009; FRÍAS-LASSERRE, 2010). Estes insetos ocupam diversos nichos ecológicos sendo capazes de se estabelecerem no intradomicílio e peridomicílio, a partir do ambiente silvestre. Com relação à capacidade de

estabelecimento de colônias, a OMS classifica os triatomíneos em quatro grupos: i) espécies nativas que frequentemente colonizam as habitações com alta ou moderada taxa de infecção pelo *T. cruzi*, estando incluídos nesta classificação o *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 e *Triatoma dimidiata* Latreille, 1811; ii) espécies nativas que esporadicamente colonizam as habitações com baixas taxas de infecção pelo *T. cruzi* e/ou pouca antropofilia – *Triatoma sordida* Stål, 1859 e *Triatoma maculata* Erichson, 1848; iii) espécies nativas com tendência a tornar-se adaptadas às habitações humanas: o caso do *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 e, iv) espécies nativas estritamente silvestres, como acontece com *Psammolestes arthuri* Pinto, 1926.

Um exemplo clássico da intradomiciliação dos triatomíneos é o *Triatoma infestans* Klug, 1834. Esta espécie, introduzida no Brasil, de ampla distribuição geográfica, era encontrada predominantemente dentro das habitações e em menores proporções no peridomicílio (PEREIRA *et al.*, 2006). No entanto, medidas de controle foram criadas para erradicar o *T. infestans* de dentro das casas, inicialmente ao nível nacional, complementadas por uma iniciativa intergovernamental a partir de 1991 (Iniciativa de Saúde dos Países do Cone Sul). O êxito de tal iniciativa levou o Brasil a receber, no dia 9 de junho de 2006, o certificado de interrupção da transmissão vetorial por *T. infestans* Klug, 1834, concedida pela OPAS (FERREIRA & SILVA, 2006). Entretanto, algumas espécies autóctones de triatomíneos apresentam diferentes potenciais de colonização das unidades domiciliares mantendo o ciclo de transmissão do parasita, principalmente no peridomicílio, e trazendo risco de infecção humana (DIOTAIUTI, 2007).

Além do cenário domiciliar, há muitas espécies de triatomíneos exclusivamente silvestres, que mantem o ciclo enzoótico do *T. cruzi* na natureza. Exemplo clássico da manutenção enzoótica são as espécies do gênero *Rhodnius* que habitam diversas espécies de palmeiras (LENT & WYGODZINSKY, 1979; DIOTAIUTI & DIAS, 1984; ROMANA *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2008; ABAD-FRANCH *et al.*, 2009).

Em regiões de pastagens e áreas devastadas após as queimadas, as palmeiras configuram a vegetação dominante em muitas regiões, sendo, muitas vezes o único refúgio para animais vertebrados.

DIAS *et al.*, (2008) demonstraram que a arquitetura da copa de diferentes gêneros de palmeiras permite uma maior ou menor estabilidade microclimática que pode estar diretamente relacionado com a infestação destes ecótopos por triatomíneos e com a densidade populacional destes insetos. Recentemente, DIAS *et al.*, (2011) avaliaram a influência de duas espécies de palmeiras, babaçu (*A. speciosa*) e carnaúba (*Copernicia prunifera*) sobre a variabilidade de *R. nasutus* na caatinga brasileira. Neste estudo foi observado um nítido dimorfismo sexual entre os insetos, sendo os triatomíneos procedentes dos babaçus maiores que os *R. nasutus* das carnaúbas. Além disso os dados microclimáticos das palmeiras revelaram que palmeiras do gênero *Attalea* possui maior estabilidade microclimática, com baixa amplitude térmica e menor variação na umidade relativa. Já nas palmeiras do gênero *Copernicia*, os dados microclimáticos (temperatura e umidade) foram similares ao ambiente externo ao longo do dia. Estes resultados corroboram com os estudos de DIAS *et al.* (2008) demonstrando que palmeiras com copa mais fechada possuem microclima mais estável. Além disso, os resultados obtidos pela genotipagem de seis *loci* de microssatélites demonstraram maior heterozigosidade no grupo de triatomíneos da carnaúba (DIAS *et al.*, 2011).

Em suma, as palmeiras com copa exuberante, (e.g. babaçu) mantêm um microclima ameno e abrigam animais que servem de fonte de alimentação para os triatomíneos. Neste ecossistema estável os vetores não necessitam dispersar muito para a procura de alimento, acarretando em um endocruzamento entre os espécimes presentes neste ambiente e, conseqüentemente, menor variabilidade genética. Ao contrário, palmeiras com copa aberta, como em *C. prunifera*, a presença de fontes de alimentação para os triatomíneos é escassa, o microclima (temperatura, umidade e luminosidade) varia de acordo com as condições do ambiente externo, acarretando em uma forte pressão ambiental sobre a fauna

triatomínica. Devido a estes fatores, os insetos são obrigados a dispersar a procura de alimento e condições mais favoráveis o que promove o cruzamento entre populações distintas, aumentando, assim, a sua variabilidade genética.

Outras espécies de triatomíneos, como *T. sordida*, têm presença constante no peridomicílio e forte associação com galinhas (*Gallus gallus*) e, por isso, possuem menor importância na transmissão do *T. cruzi*, uma vez que as aves são consideradas refratárias a infecção por *T. cruzi*. Entretanto, elas são muito importantes para a manutenção de colônias peridomésticas, geralmente muito próximas das casas (PIRES *et al.*, 1999; DIOTAIUTI *et al.*, 1998).

1.4 Trypanosoma cruzi: o agente etiológico da doença de Chagas

O *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente a família Trypanosomatidae. Embora apresente mais de uma forma evolutiva, a forma tripomastigota metacíclica que é considerada infectante para os hospedeiros vertebrados.

Estima-se que a veiculação do *T. cruzi* na natureza ocorra há mais de 10 milhões de anos, intimamente relacionada com animais silvestres (COURA & VIÑAS, 2010). Além disso, há relato sobre o isolamento de fragmento de DNA do *T. cruzi* em tecido humano mumificado datado de quatro mil anos demonstra que a ocorrência do *T. cruzi* na América vem desde a antiguidade (GUHL *et al.*, 1997; GUHL *et al.*, 1999).

A transmissão do *T. cruzi* ao hospedeiro vertebrado ocorre pela penetração de formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas dejeções de triatomíneos infectados. Uma grande diversidade de mamíferos, pertencentes a oito ordens já foi encontrada naturalmente infectada pelo *T. cruzi* (BARRETTO, 1979).

T. cruzi apresenta um elevado nível de variabilidade genética e, por isso, uma diversidade de alvos moleculares podem ser utilizados para

identificação específica deste parasito. Várias designações vêm sendo utilizadas para a classificação dos subgrupos de *T. cruzi*, como zimodemas (MILES *et al.*, 1977, 1978, 1981, ROMANHA *et al.*, 1979), esquizodemas (MOREL *et al.*, 1980), biodemas (ANDRADE, 1974; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), clones (TIBAYRENC & AYALA, 1991), linhagens (SOUTO *et al.*, 1996), e, mais recentemente, DTUs (*Discrete Typing Units*) (TIBAYRENC, 1998) e haplótipos (FREITAS *et al.* 2006, HERRERA *et al.* 2007).

Devido a grande diversidade genética encontrada em cepas de *T. cruzi*, em 1999, durante o Simpósio Internacional em comemoração aos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, um grupo de pesquisadores se reuniram para padronizar a nomenclatura de *T. cruzi*. Nesta publicação, os autores apresentaram um esquema (tabela 1) para a classificação de novas cepas de *T. cruzi* baseada em características bioquímicas, biológicas e moleculares, tendo em vista que as cepas de *T. cruzi* deveriam se agrupar em dois principais grupos, até então denominados linhagem 1 (TC 1) e linhagem 2 (TC 2) (ANONYMOUS, 1999). Porém, nos casos de cepas não caracterizadas ou cuja caracterização seria incerta, estas deveriam ser designadas como *T. cruzi* sem apontar o sufixo referente ao grupo.

Esta classificação de *T. cruzi* demonstrou que os isolados de TC 1 estariam relacionados ao ciclo de transmissão silvestre, enquanto os isolados de TC 2 ligados ao ciclo de transmissão doméstico da doença de Chagas. Além disso, cepas de TC 1 são predominantes na região Amazônica, em áreas endêmicas como na Venezuela, enquanto TC 2 predomina nos ciclos de transmissão domésticos dos países do Cone Sul (FERNANDES *et al.*, 1998; YEO *et al.*, 2005). Porém isto não é uma regra. HERRERA *et al.* (2005) avaliando a infecção por *T. cruzi* em animais silvestres e domésticos no Parque Nacional da Serra da Capivara, Piauí, Brasil, encontraram que ambos os genótipos, TC 1 e TC 2 são circulantes na região. Em Minas Gerais, fragmento de DNA pertencente do grupo TC 1 foi isolado em tecido mumificado (FERNANDES *et al.*, 2008). Além disso, as diferenças na patogenia causadas pelos dois grupos de *T. cruzi* nos seres humanos ainda não foram completamente esclarecidas. Estudo sobre a caracterização biológica e

genética de dois clones de *T. cruzi* em modelo murino demonstrou que TC 1 é mais infectivo, com tropismo tissular preferencial ao coração, músculo esquelético e reto, enquanto TC 2 apresentou tropismo pelo baço e fígado (BOTERO *et al.*, 2007).

Tabela 1: Classificação dos principais grupos de *Trypanosoma cruzi* de acordo com ANONYMOUS, 1999.

Tipo	Equivalência	Referência
<i>T. cruzi</i> I	Zimodema I	MILES <i>et al.</i> , 1977, 1978 ; BARRETT <i>et al.</i> 1980
	Tipo III	ANDRADE, 1974
	Linhagem II	SOUTO <i>et al.</i> , 1996
	Grupo I	TIBAYRENC, 1995
	Ribodema II/III	CLARK & PUNG, 1994
<i>T. cruzi</i> II	Zimodema II	MILES <i>et al.</i> , 1977, 1978 ; BARRETT <i>et al.</i> , 1980
	Zimodema A	ROMANHA <i>et al.</i> , 1979
	Tipo II	ANDRADE, 1974
	Linhagem I	SOUTO <i>et al.</i> , 1996
	Grupo II	TIBAYRENC, 1995
	Ribodema I	CLARK & PUNG, 1994
Cepas Híbridas*	Zimodema Chileno 2b	MILES <i>et al.</i> , 1984
	Zimodema B	ROMANHA <i>et al.</i> , 1979
	Tipo I	ANDRADE, 1974
	Grupo 1/2 (24Sa rDNA)	SOUTO <i>et al.</i> , 1996
	Genótipo 39	TIBAYRENC, 1995
	Zimodema 3**	MILES <i>et al.</i> , 1978, 1981

* será decidida mais tarde, após novos estudos

**situação similar às cepas híbridas

Apesar da classificação proposta em 1999, estudos anteriores realizados com RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) já demonstravam a existência de uma subdivisão dentro do grupo 2 (TIBAYRENC *et al.*, 1993), denominada 2a, 2b, 2c, 2d e 2e que, posteriormente, foram denominadas como DTU's (BRISSE *et al.*, 2000, 2001).

Vista a tamanha diversidade encontrada em isolados de *T. cruzi*, com o emprego de mais marcadores moleculares e bioquímicos, recentemente um novo consenso para a nomenclatura intraespecífica de *T. cruzi* foi proposto (ZINGALES *et al.*, 2009). Embora o comitê reconheça a existência recente de uma subdivisão dentro do grupo 1 (HERRERA *et al.*, 2007, FALLA *et al.*, 2009), a nova nomenclatura deverá seguir as seis DTUs. A distribuição aproximada das seis DTUs propostos pelo novo consenso está representada na figura 1. Neste novo consenso, ZINGALES *et al.* (2009) recomendam um esquema de caracterização de *T. cruzi* proposto por LEWIS *et al.* (2009) com a utilização de marcadores já disponíveis e baseado em um triplo ensaio (figura 2).

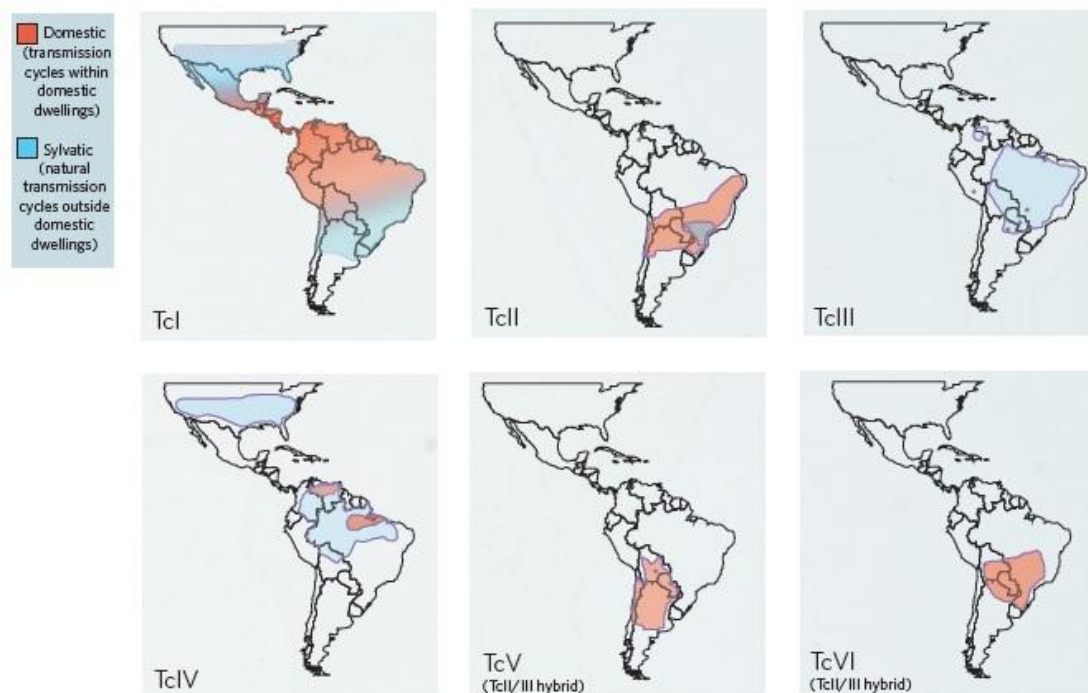


Figura 1: Diferentes genótipos e distribuição geográfica de *Trypanosoma cruzi* (Revista Nature, cortesia de Martin S. Llewellyn e Michael A. Miles).

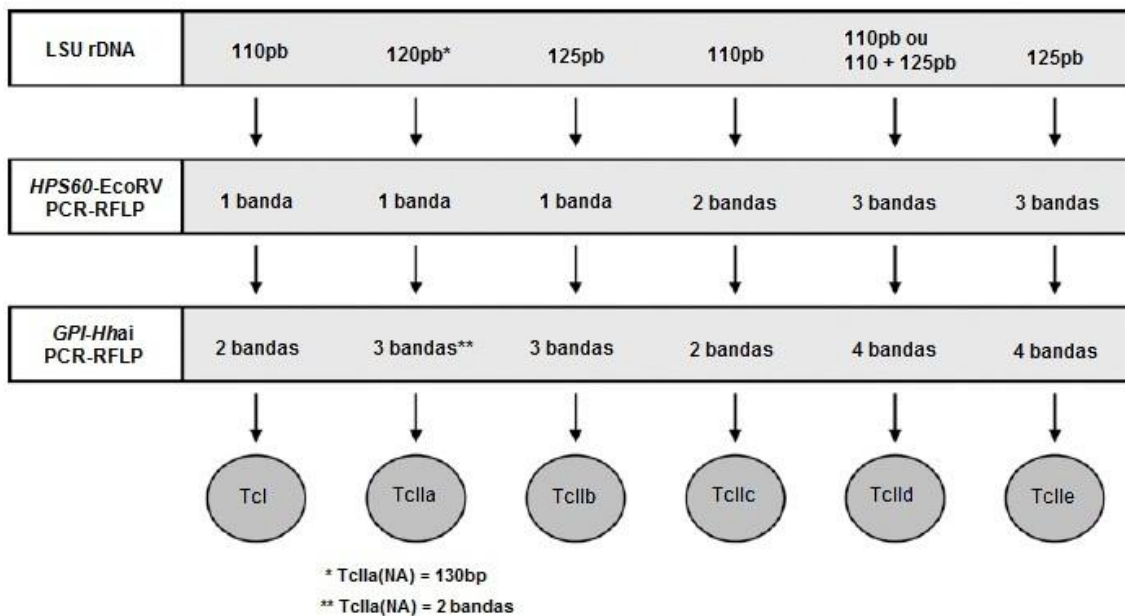


Figura 2: Esquema do triplo ensaio proposto por LEWIS *et al* (2009) e adotado pelo novo consenso de nomenclatura intraespecífica de *Trypanosoma cruzi* (ZINGALES *et al.*, 2009). Esta figura apresenta os três marcadores propostos para a nova classificação de *T. cruzi* nas seis DTUs. Os valores descritos para o marcador LSU rDNA indicam o tamanho do fragmento em pares de bases amplificado via PCR. Os demais marcadores, o resultado é analisado pelo perfil de bandas gerado pela PCR-RFLP.

1.5 *Trypanosoma rangeli*

Além do *T. cruzi*, os triatomíneos também são vetores do *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 um parasito que invade e se multiplica na hemolinfa e, posteriormente, atinge as glândulas salivares destes insetos. Ao contrário do *T. cruzi*, o *T. rangeli* é considerado não patogênico para os hospedeiros vertebrados, no entanto, nos triatomíneos, este parasito pode ser considerado como um bom controle biológico, pois pode causar lesões histopatológicas, as quais podem induzir dificuldades ou mesmo ter efeitos letais no processo de muda dos insetos e na alimentação (WATKINS, 1971; AÑEZ *et al.*, 1987).

O mecanismo de infecção dos hospedeiros vertebrados pelo *T. rangeli* se dá por meio da picada dos triatomíneos. Durante o repasto sanguíneo,

formas tripomastigotas metacíclicas são liberadas junto com a saliva dos insetos, sendo considerado um método de transmissão muito mais eficiente que pela via posterior como ocorre com o *T. cruzi* (D'ALESSANDRO & SARAIVA, 1992).

Ambos os parasitos (*T. cruzi* e *T. rangeli*) possuem distribuição geográfica simpátrica nas Américas. Estudos de imunoelctroforese, ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), Imunofluorescência Indireta e Imunodifusão dupla têm demonstrado que o *T. rangeli* apresenta reação antigênica cruzada com o *T. cruzi* e que ambos os parasitos compartilham aproximadamente 60% dos antígenos de superfície (GUHL & VALLEJO, 2003). Assim, o *T. rangeli* possui um importante papel na saúde pública, pois pode causar reações cruzadas em ensaios de sorologia, dificultando o diagnóstico para a doença de Chagas (GUHL & MARINKELLE, 1982; GUHL *et al.*, 1987).

Nos hospedeiros vertebrados, já foi relatada infecção por *T. rangeli* em mais de 20 gêneros de cinco diferentes ordens de animais (Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primates) (D'ALESSANDRO & SARAIVA, 1992).

O *T. rangeli* é o único parasita capaz de viver na hemolinfa e glândulas salivares dos triatomíneos. Durante muitos anos, a identificação deste parasita era realizada somente por meio da morfologia. De maneira geral, o *T. rangeli* é maior e mais delgado que o *T. cruzi*, medindo em média 26 a 34µm, porém pode ser confundido com *T. lewisi* Lewis, 1872 e com outros membros do subgênero *Herpetosoma* (D'ALESSANDRO & SARAIVA, 1992). Além disso, considerando o fato de que o *T. rangeli* é altamente pleomórfico, sua identificação morfológica pode ser bastante difícil, sendo erroneamente identificado como *T. cruzi* (URDANETA-MORALES & TEJERO, 1992).

Nos últimos anos uma gama de técnicas bioquímicas também têm sido empregadas para a identificação e caracterização de *T. rangeli*. Dentre os métodos bioquímicos, destacam-se a sensibilidade à lise mediada pelo complemento, caracterização de açúcares de superfície usando lectinas, caracterização antigênica e análise isoenzimática (GUHL & VALLEJO, 2003).

Da mesma forma, marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na caracterização e diagnóstico dos tripanosomatídeos, como alguns genes do DNA nuclear (mini exon e histonas), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites. O uso de marcadores de minicírculos de região conservadas de kDNA (KP1), duas regiões conservadas (KP2) e quatro regiões conservadas (KP3), demonstram que *T. rangeli* está dividido em duas linhagens, denominadas KP+ e KP-, e possuem uma grande divergência genética. Estudos dos minicírculos KP realizados com várias cepas de *T. rangeli* isoladas de *R. prolixus* e *R. colombiensis* demonstram que as espécies de *Rhodnius* são capazes de selecionar sub-populações de *T. rangeli*, podendo ou não transmiti-la ao hospedeiro vertebrado (VALLEJO *et al.*, 2002).

1.6 Amazônia, a doença de Chagas e seus vetores

Após a descoberta da doença de Chagas em Lassance, Minas Gerais, entre 1912 e 1913, Carlos Chagas, juntamente com Pacheco Leão e João Pedroso de Albuquerque, saíram em expedição científica para a Amazônia brasileira com o intuito de avaliar as condições médico sanitárias da Amazônia Ocidental (BATISTA, 1972). Os relatórios de campo já apontavam a necessidade de estudos e de controle das doenças tropicais, principalmente pelas precárias condições médico sanitárias dos trabalhadores da borracha, e o desafio de controle da malária na região (SCHWEICKARDT & TRINDADE-LIMA, 2007). Neste período, as publicações de Carlos Chagas demonstravam uma elevadíssima prevalência da malária na região. Cerca de 80-90% da população encontrava-se infectada. Em uma das localidades avaliadas, São Felipe, quase a metade da população foi a óbito somente no primeiro semestre de 1911, vítimas do paludismo (BATISTA, 1972). Além disso, foram documentadas e registradas as condições de vida da população interiorana, bem como seus hábitos e mentalidade, associados às questões sanitárias, os aspectos sócio econômicos, culturais e ambientais das regiões percorridas (THIELEN *et al.*, 1991).

Naquela época, não era somente a malária que vitimava pessoas na Amazônia. Outras doenças como beribéri, leishmanioses, sífilis, hanseníase, ancilostomose e diversas disenterias (amebíase, giardíase, balantidiose e shigeloses) também estavam presentes na região. Além disso, houve relatos de dois portadores de bócio, que erroneamente suspeitaram da possibilidade de serem chagásicos, mas nesta época, não havia casos confirmados da Tripanossomíase Americana na Amazônia brasileira. Foi somente em 1924, no estado do Pará, que Carlos Chagas identificou como *T. cruzi* o parasita isolado em um primata *Saimiri sciureus* Linnaeus, 1758 (CHAGAS, 1924).

Embora em 1969 tenha sido notificado em Belém, Pará, o primeiro relato autóctone de infecção chagásica humana na Amazônia brasileira (SHAW *et al.*, 1969), os casos da prevalência do inquérito nacional, no entanto, não foram considerados autóctones, nem discriminadas as idades das pessoas, mas associados na ocasião à imigrantes provenientes, principalmente, dos estados do Nordeste. Surpreendem, entretanto, o encontro de infecção humana no inquérito soropidemiológico realizado no final da década de 80 (FIÚSA-LIMA & SILVEIRA, 1984; CAMARGO *et al.*, 1984), quando foram observados taxas de prevalência de 2,39% no Acre, 1,88% no Amazonas, 0,56% no Pará, 0,41% em Rondônia, 0,31% em Roraima e 0,0% no Amapá.

Nas últimas décadas, no entanto, devido ao crescente processo de desmatamento, a constante migração de populações nordestinas e, principalmente, o aumento do número de casos agudos na Amazônia brasileira fez-se com que esta região despertasse atenção não só para a comunidade científica, mas das autoridades governamentais sobre o risco de emergência da doença de Chagas na Amazônia.

Estudos demonstram que a taxa anual de desmatamento na Amazônia brasileira é cerca de dois milhões de hectares. De 1988 até 2010 aproximadamente 385.234 km² foram desmatados na Amazônia Legal. Neste mesmo período, a taxa média de desmatamento no Estado do Pará foi de

5.543 km² – o segundo estado com o maior índice no Brasil, perdendo apenas para o Mato Grosso, com 5.834 km² (BRASIL, PROJETO PRODES, 2011). Dados do Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia (IMAZON) demonstram que em 2004, 26.130 quilômetros quadrados de florestas foram desmatados na Amazônia Legal, indicando a intensa pressão humana sobre a cobertura vegetal na região (BARRETO *et al.*, 2005). Imagens de satélite mostram que a metade do desmatamento corresponde às pequenas áreas de 15-100 hectares, dos pequenos produtores que migraram de outras regiões (GORLA *et al.*, 2005). Segundo esses autores, a transmissão de doenças transmitidas por vetores está associada com as mudanças da cobertura vegetal, particularmente com o desmatamento (ROMAÑA, 2007). Somente na região de Santarém, Pará, mais de 120 mil hectares de florestas primárias e secundárias foram convertidos em plantações e cultivos de grãos nos últimos seis anos. No estado do Amazonas, anualmente, são plantados nove mil hectares de soja, milho e arroz, a maior parte em áreas anteriormente degradadas (COSTA, 1999). Uma consequência direta desta mudança paisagística, provavelmente, é a emergência de doenças tropicais, como a Tripanossomíase Americana, em uma região até então declarada como não endêmica para esta enfermidade (ROMAÑA, 2007), cujo número de casos humanos agudos tem aumentado quase exponencialmente nas últimas décadas (GUHL & SCHOFIELD, 2002).

Somente na região de Barcelos, nas proximidades do Rio Negro, Amazonas, COURA *et al.*, (1995) avaliaram a prevalência chagásica humana (n=710 pessoas) e encontraram 12,5% de positividade. O alto índice de prevalência na região de Barcelos foi associado, principalmente, ao extrativismo da palmeira *Leopoldina piassaba* (Wallace ex Archer) que muitos moradores exerciam para a retirada das fibras. *L. piassaba* é considerada ecótopo natural de *R. brethesi* Matta, 1919, sendo essa relação já reconhecida desde o período da descrição desta espécie de triatomíneo, feita por MATTA (1922). Em sua publicação, MATTA (1922) aponta dados sobre a biologia do *R. brethesi* e demonstra que as populações amazônicas são vítimas de picadas do inseto devido ao extrativismo das fibras desta

palmeira. Também na região de Barcelos, em 1994, COURA *et al.* descreveram o ataque de populações humanas por *R. brethesi*, demonstrando o comportamento “agressivo” desta espécie em comunidades amazônicas.

Outras espécies de triatomíneos chamam a atenção por sua grande importância epidemiológica na transmissão da doença de Chagas na região Amazônia. Destaca-se primeiramente o *R. prolixus* Stål, 1859, principal espécie vetora na Colômbia, Venezuela e em países da América Central. De hábito exclusivamente doméstico na Colômbia e Venezuela, *R. prolixus* é capaz de estabelecer grandes colônias dentro das casas, tendo já sido contabilizados mais de 10 mil triatomíneos dentro de uma habitação no departamento de San Joaquim, Colômbia (SANDOVAL, *et al.*, 2000b). Esta espécie foi agrupada juntamente com outras três espécies de *Rhodnius* - *R. nasutus* Stål, 1859, *R. neglectus* Lent, 1954 e *R. robustus* Larrousse, 1927 em um complexo de espécies, denominado ‘Complexo *R. prolixus*’ devido às semelhanças morfológicas existentes (BARRETT *et al.*, 1988). No entanto, a maior dificuldade de separação destas espécies está entre *R. prolixus* e *R. robustus*. Ambas possuem distribuição simpátrica, ocorrendo em regiões de florestas tropicais e subtropicais. Mais recentemente, MONTEIRO *et al.*, (2003) com o uso de marcadores moleculares do citocromo B mitocondrial e gene nuclear não só conseguiram diferenciar o *status* taxonômico entre *R. prolixus* e *R. robustus*, como verificaram a existência de uma grande variabilidade genética em *R. robustus*. Para estes autores, *R. robustus* constitui um “grupo” de espécies crípticas. Além disso, o fato de *R. robustus* ter sido reagrupado em quatro diferentes clados filogenéticos, um dos quais se destaca dos padrões de *R. robustus* e *R. prolixus*, levaram-os a sugerir a criação de uma nova espécie denominada como grupo *R. robustus* I (MONTEIRO *et al.*, 2003).

O primeiro relato de surto agudo da doença de Chagas na Amazônia brasileira foi descrito no Estado do Pará, na década de 60. Embora as pesquisas entomológicas não tenham encontrado triatomíneos na área, as investigações sugerem ser autóctone este surto. No entanto, o mecanismo de como a infecção foi adquirida não foi esclarecido (SHAW *et al.*, 1969).

Segundo VALENTE *et al.*, (2009) cerca de 600 novos casos agudos da doença de Chagas já foram registrados na Amazônia brasileira. Somente no Estado do Pará, de janeiro a novembro de 2006, cerca de 178 casos agudos foram notificados (NÓBREGA *et al.*, 2009), o que considera a região como área de emergência para a Tripanossomíase Americana.

Devido a este crescente número de surtos agudos da doença de Chagas na Amazônia brasileira, esta enfermidade tem alertado pesquisadores e autoridades governamentais para um mecanismo de transmissão que até algumas décadas não estava entre as formas de infecção mais importante: a via oral. Vários surtos agudos da doença de Chagas na Amazônia têm sido descritos nos últimos anos, muitos desses associados a ingestão do suco do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) (VALENTE *et al.*, 1999; COURA, 2006; VALENTE *et al.*, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2009, PEREIRA *et al.*, 2009). Embora a infestação da *E. oleracea* por triatomíneos não tenha sido descrita, na Amazônia esta palmeira ocorre em simpatria com outras espécies já conhecidas como ecótopos para os barbeiros, principalmente *Attalea* spp. Em 2006 foi notificado um surto de doença de Chagas no distrito de Mojuí dos Campos, município de Santarém, Pará. As investigações sugerem que o consumo do suco da bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.), seja a principal forma de infecção pelo *T. cruzi* (BRASIL, 2006). Muito próximo ao local de processamento do suco, foram encontrados em palmeiras de babaçu (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng.), colônias de *R. robustus* Larrousse, 1927 e de *Panstrongylus lignarius* Walker, 1873 (BRASIL, 2006). VALENTE *et al.* (2009) investigando um surto agudo da doença de Chagas em Mazagão, Amapá, coletaram em armadilha luminosa instalada na cozinha comunitária para processamento do suco do açaí, seis exemplares de *R. pictipes*, estando cinco destes infectados pelo *T. cruzi*. Neste episódio, a contaminação oral foi a principal suspeita visto que o açaí faz parte da dieta nutricional das pessoas infectadas. Além disso, os pacientes não apresentaram sinais de picada por triatomíneos (chagoma) e tampouco houve achados de colonização no intradomicílio pelos insetos (VALENTE *et al.*, 2009).

Em função destes e outros demais, o Programa Nacional de Controle de Doença de Chagas, da Secretaria de Vigilância em Saúde (PNCDCh/SVS), vem implantando desde novembro de 2005, um modelo de vigilância epidemiológica específico para a Região Amazônica. Além disso, estão sendo realizadas capacitações para técnicos de vigilância epidemiológica e de diagnóstico laboratorial na região, bem como visitas técnicas aos estados (BRASIL, 2006).

No programa tradicional de controle dos triatomíneos, quando uma unidade domiciliar é notificada quanto à presença de barbeiros, a estratégia utilizada pelos serviços de saúde é a borrifação com inseticidas piretróides (atualmente o inseticida em uso é a Alfacipermetrina). Na Amazônia brasileira, não havia evidências de colonização das casas por triatomíneos. Porém, o cenário de domiciliação por triatomíneos nesta região tem mudado com constante presença do *T. maculata* no estado de Roraima (AMCHA, 2004). Para se estabelecer uma colônia intradomiciliar são necessárias algumas variáveis como a própria condição física da casa e do peridomicílio, que devem oferecer facilidades ou oportunidades de abrigo além de oferta de alimento para os triatomíneos. No norte do Estado do Tocantins, área de transição com a Amazônia e com grandes extensões de babaçus, foram descritos surtos agudos da doença de Chagas humana (DIOTAIUTI *et al.*, 2009). Nesta região, onde *R. neglectus* Lent, 1954 juntamente com *R. pictipes* Stål, 1872 representam os principais vetores, provavelmente os surtos sejam devidos à invasão de adultos sem colonização nas casas como já demonstrado na Amazônia (COURA *et al.*, 1994; DIOTAIUTI *et al.*, 2009).

O intenso fluxo migratório de pessoas procedentes de áreas endêmicas, a extensiva transformação da paisagem proveniente do desmatamento descontrolado, além da grande diversidade encontrada de *T. cruzi*, de hospedeiros vertebrados e espécies de triatomíneos, configuram o atual cenário da Amazônia brasileira (AGUILAR *et al.*, 2007).

Este preocupante cenário levaram Delegados Oficiais dos países

amazônicos juntamente com pesquisadores e técnicos, especialistas em diversos aspectos da pesquisa, da prevenção e do manejo da doença de Chagas a elaborar um grupo de recomendações e diretrizes dentre as quais está a proposta de um sistema de cooperação intergovernamental para a vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia (AMCHA). Esta iniciativa tem como principais objetivos:

- Implantar/implementar um sistema de vigilância epidemiológica regular, integrado e com aproveitamento máximo de recursos, serviços e programas de saúde já existentes;
- Desenvolver métodos e/ou técnicas de controle ajustados aos mecanismos de transmissão já conhecidos (transmissão vetorial extradomiciliar, transmissão domiciliar sem colonização do vetor e transmissão oral);
- Gerar novos conhecimentos acerca da epidemiologia da doença na região.

Um risco em saúde pública pode ser definido como “todos os eventos indesejáveis que possam afetar a saúde dos indivíduos, grupos, ou populações a partir de comportamentos, atividades humanas e situações” (CNRS, 1998). Em termos ecológicos, além do homem ser considerado um dos elementos do sistema, deve-se avaliar o risco em nível global do ecossistema (ROMAÑA, 2007).

No que concerne aos mecanismos de transmissão vetorial extradomiciliar, as palmeiras do gênero *Attalea* são consideradas ecótopos naturais para espécies de *Rhodnius* e é possível considerá-las como um indicador ecológico de risco epidemiológico para a doença de Chagas. Numerosos estudos vêm demonstrando a importância de diversos gêneros de palmeiras como ecótopos para os triatomíneos, destacando-se *Acrocomia*, *Attalea*, *Copernicia*, *Mauritia* e *Syagrus* (LENT & WYGODZINSKY, 1979; BARRETTO 1979; DIAS *et al.*, 2008, ABAD-FRANCH *et al.*, 2009). No Panamá, por exemplo, a constante presença da palmeira *Attalea butyracea* (Mutis ex L.f.) Wess. Boer nas áreas rurais e urbanas, região

habitada por quase dois terços da população do país, concentram-se numerosos casos clínicos da Tripanossomíase Americana entre reservatórios domésticos e em crianças menores de 15 anos (ROMAÑA, 2007).

No Brasil a grande parte das investigações ligadas aos surtos agudos da doença de Chagas na Amazônia demonstram o envolvimento de triatomíneos, principalmente do gênero *Rhodnius*, o que reforça a importância de estudos relacionados a ecologia destes vetores, dos ciclos silvestres de transmissão do *T. cruzi* e da interação entre os triatomíneos e seus ecótopos.

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os aspectos ecológicos da Tripanossomíase Americana em comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil.

2.2 Objetivos específicos

Verificar quais são as espécies de triatomíneos existentes na região de estudo e determinar a taxa de infestação e a densidade populacional dessas espécies em palmeiras locais;

Determinar o índice de infecção natural dos triatomíneos por tripanosomatídeos, e quais a (s) espécie (s) de tripanosomatídeo (s) que infectam os triatomíneos;

Caracterizar isolados de *T. cruzi* de acordo com a nova nomenclatura (Zingales *et al.*, 2009);

Determinar as fontes de alimentação dos triatomíneos e suas possíveis fontes de infecção pelos tripanosomatídeos no ambiente silvestre;

Cartografar as áreas estudadas a partir de imagens de satélites caracterizando os ecótopos das espécies de triatomíneos como indicadores ecológicos de risco.

3.1 Área de Estudo

Neste estudo, foram investigadas três comunidades localizadas nas proximidades do médio rio Tapajós, Estado do Pará. A região faz parte do bioma amazônico e clima equatorial úmido. As temperaturas médias ultrapassam os 25° C e possui duas estações bem definidas: período seco e período chuvoso. De dezembro a março, período das chuvas, o índice de precipitação pode ultrapassar 400 mm, enquanto em setembro não chega a 40mm. As comunidades foram escolhidas por se apresentarem heterogêneas em relação à paisagem, cultura e hábitos alimentares dos seus habitantes. Além disso, as três comunidades se diferem em: tempo de ocupação da área, procedência da população, graus de antropização, e a ocorrência de diferentes espécies de palmeiras.

A primeira comunidade, Agrovila-Araipá, ribeirinha ao lago Araipá, possui 47 famílias, 198 habitantes, sendo 93 mulheres e 105 homens e quase sua totalidade são de origem paraense. A idade média dos moradores é de $26,8 \pm 19,8$ anos. Nesta comunidade também há moradores procedentes do Estado do Maranhão, da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte, Tocantins, Rondônia, Amazonas, Distrito Federal e Portugal. As casas geralmente são feitas de madeira, com piso de chão batido e telhado de madeira. Há também casas de adobe e teto de palha. Outras residências possuem piso cimentado e telhas de amianto. Em todas as habitações o banheiro é fora das casas. A água para consumo vem, geralmente, de poço a céu aberto, mas em algumas famílias, a água é retirada diretamente do rio ou de igarapés. O tratamento da água é realizado com pastilhas de cloro fornecidas pelo agente de saúde, em outros casos, a água é apenas filtrada. Nesta comunidade as doenças mais comuns relatadas são gripe e febre, e a energia elétrica é obtida por meio de gerador a óleo diesel e disponível diariamente das 18 às 21 horas. Algumas casas possuem televisão e rádio e apenas em duas residências os moradores revelaram ter geladeira. Ao entorno da comunidade de Araipá há predominância da palmeira inajá *Attalea maripa* (Aubl.) Mart, embora ocorra também a presença da palmeira Tucumã (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey). A maior parte do terreno

da comunidade foi desmatada para servir de pastagem para o gado e plantações, principalmente de mandioca e arroz.

A segunda comunidade estudada, São Tomé, ribeirinha ao lago, está localizada muito próxima ao rio Tapajós sendo conhecida pelos moradores locais como "boca". São Tomé é formada por uma comunidade de famílias nativas da região do rio Tapajós, composta por 25 casas e 106 habitantes, sendo 45 mulheres e 61 homens. A idade média dos moradores de São Tomé é de $26,4 \pm 20,0$ anos. Nesta comunidade existe presença constante de três espécies de palmeiras do gênero *Attalea*: inajá, babaçu (*Attalea speciosa*) e uricuri (*A. phalerata*). Dentro dos fragmentos florestais há a existência da palmeira bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.), mas em pequena quantidade. A palmeira macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart] também ocorre com pequena frequência, no entanto, não é nativa sendo plantada pelos moradores. A energia elétrica vem por meio de gerador a óleo diesel como em Agrovila-Araipá. A maioria das moradias são construídas de madeira com chão de barro batido e telhado de amianto. Uma única residência possui construção de alvenaria. Os plantios são destinados á subsistência e, em algumas ocasiões, para a venda em cidades próximas. Tanto São Tomé, quanto Agrovila-Araipá fazem parte do município de Aveiro.

A terceira comunidade, Assentamento Nova Estrela, possui 42 famílias e 160 habitantes, sendo 74 mulheres e 86 homens. A idade média dos moradores é de $25 \pm 18,4$ anos. Trata-se de uma comunidade não ribeirinha e que está próxima de uma vila situada no Km 30 da rodovia Transamazônica. Nesta comunidade a maioria dos moradores são procedentes do Estado do Maranhão. Alguns paraenses e nativos da região também vivem na comunidade. Além disso, há moradores procedentes dos Estados do Ceará, Piauí e São Paulo. Em Nova Estrela há predominância das palmeiras do gênero *Attalea*, embora ocorra também a presença do buriti (*Mauritia flexuosa* L.) que, segundo os próprios moradores, não é nativo da região. Nova Estrela faz parte do município de Rurópolis e possui energia elétrica disponível pelo Governo. Assim como em Araipá e São Tomé, a

construção das casas é feita, geralmente, de madeira, embora seja encontrada com menor frequência casas de pau-a-pique. A figura 3 apresenta os tipos de habitações encontradas na região de estudo e a figura 4 apresenta a localização das três comunidades pesquisadas.



Figura 3: Casas típicas das áreas de estudo: (A) casa de pau-a-pique com telhado de lona e folhas de palmeiras; (B) casa de madeira construída sobre palafitas e teto com telhas de amianto; (C) casa ribeirinha construída de madeira com telhado de palha; (D) casas de madeira com telhado de amianto.

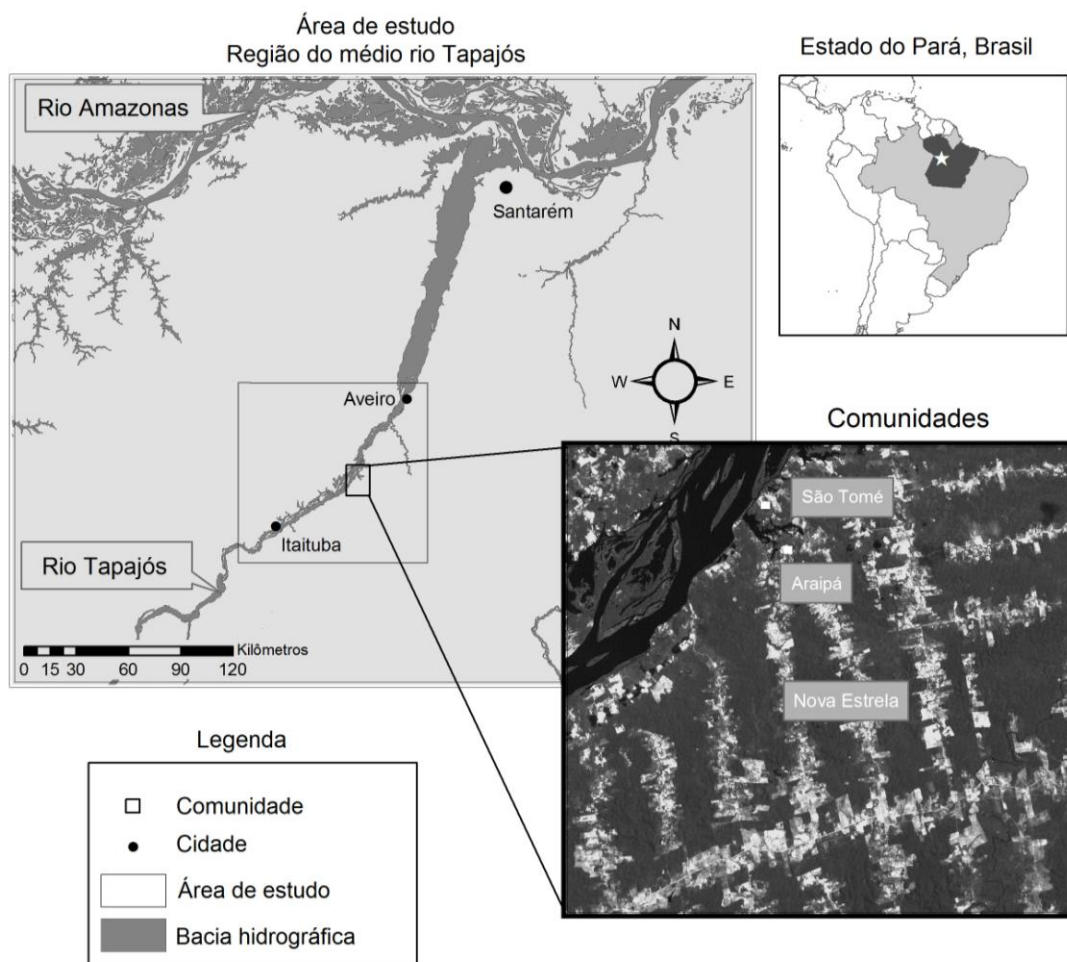


Figura 4: Cartografia da localização das três comunidades estudadas. Mapa elaborado por Jordan Sky Oestreicher (doutoranda do projeto PLUPH).

3.2 Coleta dos Triatomíneos

Foram realizadas duas missões de campo para a coleta dos triatomíneos: a primeira, no período de 15 de setembro a 08 de outubro de 2008, período correspondente ao final da época de seca na região; a segunda, entre os dias 08 a 27 de maio de 2009, que coincide com o final da estação chuvosa.

Os triatomíneos foram coletados a partir da dissecação de palmeiras de acordo com DIOTAIUTI & DIAS (1984) (figura 5), após autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). A licença foi emitida em 27/06/2008, sob número de registro 16485-2, conforme mostra o anexo I desta tese.



Figura 5: Etapas de dissecção das palmeira para a coleta dos triatomíneos. (A) palmeira sendo cortada com a ajuda de uma moto-serra; (B) após a derrubada, as folhas são removidas de forma a manter uma copa relativamente reduzida; (C) busca de triatomíneos entre cada bainha foliar e também na matéria orgânica; (D) etapa final da dissecção das palmeiras.

As palmeiras foram identificadas segundo LORENZI *et al.* (1996, 2004), HENDERSON *et al.* (1995) e também foi utilizado o conhecimento popular dos moradores locais.

Para a coleta dos triatomíneos, as palmeiras eram cortadas com a ajuda de uma moto-serra. As folhas na região basal dos folíolos eram serradas e a copa deslocada do estipe de forma a manter uma copa relativamente reduzida. Em seguida eram serradas também individualmente cada bainha foliar para a busca dos triatomíneos. Panos claros (aproximadamente 9 m²) eram colocados no chão ao lado da copa. Cada bainha foliar após serrada era colocada sobre os panos junto com a

matéria orgânica presente nas palmeiras para a procura dos insetos. As coletas dos triatomíneos foram realizadas com ajuda de moradores locais (duas equipes com quatro pessoas).

Para cada palmeira era preenchida uma ficha de campo (anexo II). Foram registrados os seguintes dados: data e horário da coleta, coordenadas geográficas, condição meteorológica (chuva ou sol), tipo de vegetação que a palmeira trabalhada encontrava-se (pasto, capoeira ou fragmentos florestais), fauna associada às palmeiras, tamanho da palmeira (excluindo as folhas) e presença ou ausência de marcas de fogo na palmeira.

Definiu-se como uma palmeira infestada àquela que continha desde um exemplar de triatomíneo, presença de ovos ou até mesmo exúvia de triatomíneo.

A medida em que os triatomíneos eram encontrados, os mesmos eram acondicionados dentro de tubos de plástico (tubos Falcon® de 50 mL) que continham um papel cartolina em formato de sanfona para facilitar a locomoção dos insetos e auxiliar na absorção das fezes e urinas produzidos pelos triatomíneos. Diariamente, após cada jornada de campo, as tampas dos tubos eram retiradas e substituídas por tecido envolto por esparadrapo para facilitar a oxigenação dos insetos.

Durante a primeira missão de campo, os triatomíneos foram mantidos dentro de um quarto em um barco com ar condicionado ligado por algumas horas durante o dia. Na tentativa de evitar a mortalidade dos triatomíneos nas condições de campo, a segunda coleta, os insetos foram guardados dentro de um isopor hermeticamente fechado. Dentro do isopor havia algodão embebido com água para aumentar a umidade relativa do ar.

Os insetos mortos eram transferidos para tubos de 1,5 mL contendo álcool absoluto. Dentro dos micro tubos era colocado um papel que continha as seguintes informações: código da palmeira que o triatomíneo foi coletado, aparente *status* nutricional (alimentado ou em jejum) e estágio

evolutivo. Devido as condições locais de trabalho e de moradia em campo, e ausência de um laboratório, a análise parasitológica das fezes foi realizada somente no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas (LATEC), Fiocruz, Belo Horizonte-MG.

3.3 Identificação morfológica e molecular dos insetos coletados

Os triatomíneos coletados foram *a priori* identificados pela morfologia de acordo com as chaves de classificação propostas por LENT & WYGODZINSKY (1979). Além disso, os insetos também foram identificados molecularmente de acordo com MONTEIRO *et al* (2003). Para isto, foram utilizados dois iniciadores que amplificam parte da região conservada do gene do citocromo B (mtDNA) de *Triatoma dimidiata*. CYTB7432F, 5'-GGACG(AT)GG(AT)ATTATTATGGATC-3', e CYTB7433R, 5'-GC(AT)CCAATCA(AG)GTTA(AG)TAA-3', sendo o iniciador *forward* marcado com fluoresceína. Os reagentes utilizados na PCR foram: 5 µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 10 µM de cada iniciador, 1 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e 1 µl de DNA "A" molde, perfazendo volume total de 25 µl/reação. Três microlitros do produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e os fragmentos amplificados visualizados em lâmpada UV. O restante do produto amplificado (~22 µL) foi purificado, usando o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), sendo o DNA purificado dosado em Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Termo Fisher Scientific Inc.). O iniciador *forward* foi sequenciado em sequenciador automático ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, UK). As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no genbank utilizando a ferramenta BLAST.

3.4 Exame parasitológico das fezes e exame de hemolinfa

Todos os insetos que chegaram vivos ao LATEC foram submetidos ao exame parasitológico das fezes e exame de hemolinfa para constatação de infecção por tripanosomatídeos.

Para os exames das fezes, uma gota de soro fisiológico 0,9% foi colocada sobre lâmina de microscopia. Com o auxílio de pinças de dissecação, o abdomen dos triatomíneos era comprimido de forma a induzir a eliminação das fezes. Após a defecação, as fezes eram homogeneizadas em soro fisiológico com ajuda de uma lamínula.

Para o exame de hemolinfa, uma perna dos triatomíneos foi seccionada com tesoura de dissecação e uma micro gota de hemolinfa colocada sobre lâmina. Em ambos os exames (parasitológico das fezes e hemolinfa), o material foi observado em microscópio óptico, aumento 160x. Os triatomíneos em que foram observadas formas de tripanosomatídeos foram destinados ao isolamento da cepa.

3.5 Isolamento de Tripanossomatídeos e cultivo

Foi realizado o isolamento das cepas de tripanosomatídeos dos insetos positivos ao exame das fezes. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril, dentro de capela de fluxo laminar. Cada triatomíneo era mergulhado dentro de um béquer com álcool 70° por 10 seg e após seco com gaze hidrófila. Pinças e tesoura de dissecação estéreis foram utilizadas para a retirada do tubo digestivo. Um pequeno corte foi feito na porção terminal do abdomen. O abdomen era comprimido para eliminação das fezes e, com a ajuda de pinças, o tubo digestivo foi retirado e transferido imediatamente para um tubo de vidro com tampa de rosca contendo 1mL de meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (CAMARGO, 1964) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado e 2 mL de ágar sangue. Os isolados foram acondicionados dentro de estufa B.O.D. a 27° C para multiplicação dos parasitos. Semanalmente as culturas eram examinadas e repicadas quando

necessárias.

Para a coleta de massa dos parasitas, quando as culturas se apresentavam em fase exponencial (aproximadamente 10^9 parasitos/mL), estas foram submetidas à centrifugação ($1500\times g$ por 10 minutos a $4^\circ C$). O sobrenadante era descartado por inversão do tubo e o "pellet" ressuspendido em solução salina 0,9%. Tal procedimento foi repetido três vezes, sendo o sedimento obtido após a última centrifugação transferido para tubos de 1,5 mL e criopreservado a $-70^\circ C$ para futura extração do DNA e caracterização (ROMANHA, 1982).

Alíquotas das cepas isoladas foram criopreservadas em nitrogênio líquido ($-196^\circ C$), de acordo com a técnica padronizada por FILARDI & BRENER (1975), utilizando como agente crioprotetor, glicerol estéril a 10%, fazendo parte do banco de cepas do LATEC.

Cerca de 3-4 gotas das cepas foram impregnadas em papel de filtro. Os papéis após secos, foram colocados dentro de sacos plásticos individuais e mantidos em temperatura ambiente para posterior extração do DNA, se necessário.

3.6 Extração de DNA dos triatomíneos

Todos os insetos coletados no campo tiveram o DNA genômico extraído utilizando o kit DNease® Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Ao final da extração, o DNA foi ressuspendido em $50 \mu L$ em solução TE (duas centrifugações de $25 \mu L$ cada). Para cada inseto foram realizadas duas extrações de DNA seguindo o seguinte esquema: a primeira extração, nomeado de DNA "A", foi realizada a partir de duas pernas e do tórax dos insetos e, a segunda extração, nomeado de DNA "B", foi realizada do tubo digestivo dos triatomíneos.

Nesta etapa não havia mais inseto vivo. Todos os triatomíneos estavam acondicionados dentro de tubos de 1,5 mL com álcool absoluto. Para a extração do DNA "A" os insetos foram secos em lenços de papel e tiveram

as pernas retiradas com auxílio de pinças e tesoura de dissecção. Em seguida as cabeças dos triatomíneos foram removidas e os toráx cortados com tesoura. Todo o material (pernas e tórax) foi colocado dentro de tubos de 1,5 ou 2 mL e picotados com tesoura.

Para a extração do DNA "B" nos machos, nas fêmeas e nas ninfas de 5º e 4º estádios, as asas e o conexivo (insetos adultos) foram retirados, bem como a cutícula superior do abdômen. Com uma tesoura, foi separada a porção lateral da parte central do abdômen, sendo a parte central, local que se encontra o tubo digestivo, destinada à extração do DNA. Nos insetos em que foi possível observar grande quantidade de sangue no tubo digestivo, a extração era realizada da porção terminal do abdômen (aproximadamente a partir do sexto tergito). Em ninfas de 3º estágio, ao invés de retirar a cutícula abdominal superior, era feito um corte em forma de "V" no abdômen de maneira que a porção terminal fosse destinada a extração.

Somente nas ninfas de 1º e 2º estádios, devido ao seu tamanho reduzido, o DNA foi extraído do inseto inteiro, denominado de DNA "AB".

Em todas as extrações de DNA, após picotar o material com a tesoura, dentro de cada tubo era colocada uma pequena esfera de moagem em aço inox e o material era colocado em agitador Retsch MM301, (Retsch, Alemanha) por duas séries de 30 seg e frequência 30 para otimizar a maceração do tecido. A figura 6 apresenta de forma esquemática a metodologia empregada para a extração de DNA dos triatomíneos.

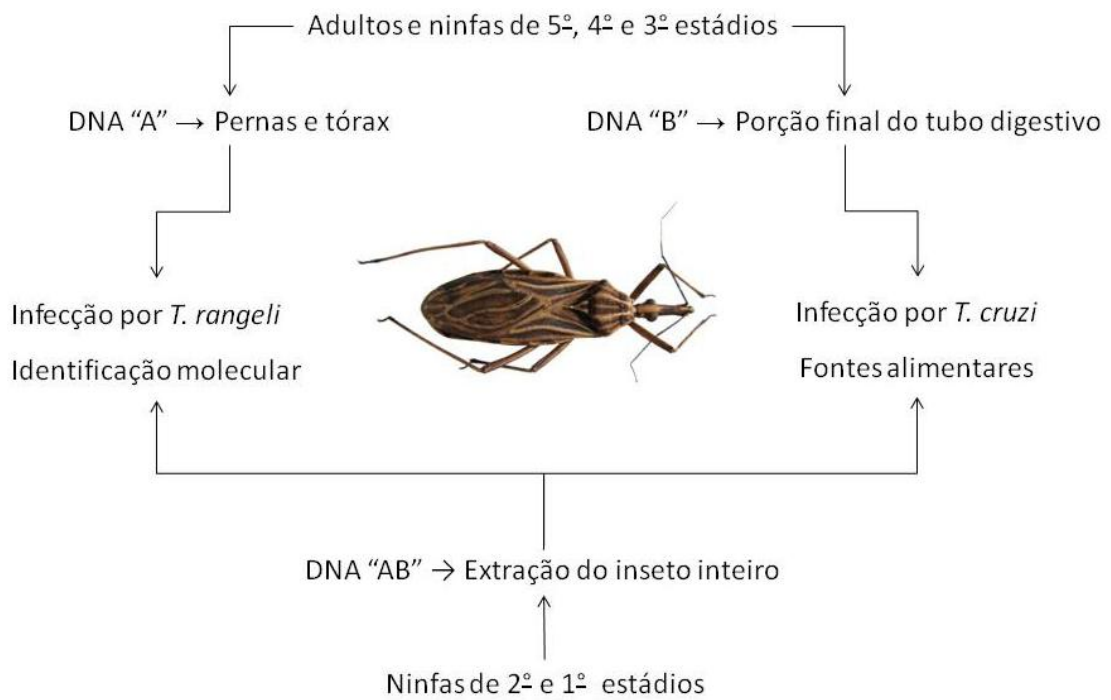


Figura 6: Esquema metodológico empregado para a extração de DNA dos triatomíneos coletados.

3.7 Caracterização molecular de tripanosomatídeos

3.7.1 Identificação da infecção natural por *Trypanosoma rangeli* nos insetos coletados

A identificação da infecção natural por *T. rangeli* nos insetos coletados foi baseada na tipagem molecular de um gen repetitivo de RNA nucleolar Cl1 (sno-RNA-Cl1) que amplifica um fragmento de 620pb (MORALES *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2007). Este procedimento foi realizado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Nesta etapa foi utilizado o DNA extraído das pernas e tórax dos triatomíneos (DNA "A"). Foram utilizados os seguintes iniciadores: TrF (5'-CGCCCCGTCTTGCCCTGT-3') e TrR2 (5'-CGCAGCAAGGACAG GAGGGA-3'). Os iniciadores utilizados foram sintetizados pelo Laboratório Sigma-Aldrich. Os reagentes utilizados na PCR foram: 1 µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 1 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 2,5 µM de cada iniciador, 0,5 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e 2 µl de DNA molde, perfazendo volume total de 10 µl/reação. As

condições da PCR estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase nos estudos da caracterização molecular de *Trypanosoma rangeli* do gen repetitivo de RNA nucleolar C11 (sno-RNA-C11) (MORALES *et al.*, 2002; PAVIA *et al.*, 2007).

Temperatura de desnaturação/tempo		Ciclo	Temperatura de anelamento dos iniciadores/tempo		Temperatura de extensão do DNA/tempo	
95° C	5 min	primeiro				
95° C	30 seg	15 Ciclos	63° C	1 min	72° C	30 seg
95° C	30 seg	20 Ciclos	60° C	1 min	72° C	30 seg
		extensão final			72° C	5 min

Para a visualização dos produtos amplificados, 3 µL da amostra amplificada foram utilizados e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Após, os géis eram colocados em uma solução de brometo de etídio 0,04% por 10 min para corar as bandas. Em seguida, os géis eram colocados em transluminador ultra violeta (UV) acoplado a um fotodocumentador Kodak 1D v.3.6.6. Scientific Imaging Systems para a visualização das bandas.

3.7.2 Identificação da infecção natural por *Trypanosoma cruzi* nos insetos coletados

A identificação da infecção natural por *T. cruzi* nos insetos coletados no campo foi realizada utilizando como marcador parte da região intergênica do gene do mini-exon (SOUTO *et al.*, 1996) que amplifica um fragmento de 350 pb para isolados de *T. cruzi* tipo 1 e 300 pb para *T. cruzi* 2, seguindo a antiga classificação deste parasito (ANONYMOUS, 1999). Foram utilizados três iniciadores para a tipagem molecular: TCI - 5'-CCT GCA GGC

ACA CGT GTG TGT G-3' (específico para *T. cruzi* 1, segundo ANONYMOUS, 1999), TCII - 5'-GTG TCC GCC ACC TCC TCC GGC CC-3' (específico para *T. cruzi* 2, de acordo com ANONYMOUS, 1999) e TC - 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3' (comum aos dois grupos) (SOUTO *et al.*, 1996). Os iniciadores utilizados foram sintetizados pelo laboratório Sigma-Aldrich. Os reagentes utilizados na PCR foram: 1 µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 0,75 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,25 µM de cada iniciador, 0,5 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e 1 µl de DNA molde, perfazendo volume total de 10 µl/reação. Tanto na caracterização de *T. rangeli* quanto para *T. cruzi* foi utilizado como padrão de peso molecular o marcador Ladder 100 pb (Invitrogen). As condições da PCR estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase nos estudos da caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* de parte da região intergênica do gene do mini exon (SOUTO *et al.*, 1996).

Temperatura de desnaturação/tempo		Ciclo	Temperatura de anelamento dos iniciadores/tempo		Temperatura de extensão do DNA/tempo	
94° C	5 min	primeiro	61° C	30 seg	72° C	30 seg
94° C	1 min	15 Ciclos	61° C	30 seg	72° C	30 seg
94° C	1 min	Último ciclo	61° C	30 seg	72°C	10 min

A visualização dos produtos amplificados foi similar a metodologia descrita para caracterização de *T. rangeli*. As PCRs foram realizados em termociclador Eppendorf Mastercycler EP Gradients e Biometra T-1 Termoblock.

3.8 Controles positivo e negativo das reações de *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma cruzi*

Em todas as reações de PCR de *T. rangeli* e *T. cruzi* foram utilizados controles positivos e negativos. Para o controle positivo de *T. cruzi*, ninfas de 2º estágio de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 foram infectadas no laboratório via oral em alimentador artificial (aproximadamente 1×10^7 parasitos/inseto) com a cepa CL. Os insetos foram mantidos no LATEC. Quando os insetos chegaram ao 3º estágio, esses foram examinados para confirmação da infecção e, ao chegar no 4º estágio, as ninfas foram deixadas em jejum até morrerem de forma a simular a mesma mortalidade dos insetos coletados em campo. O DNA destes insetos também serviu de controle negativo para as reações de *T. rangeli*.

Para controle positivo de *T. rangeli*, ninfas de 4º estágio de *R. prolixus* foram infectadas no laboratório com a cepa Choachi, isolada das glândulas salivares de *R. prolixus* naturalmente infectado, capturado no intradomicílio no Estado de Cundinamarca, Colômbia (SCHOTELIUS, 1987) (inóculo intrafemural ~ 50 parasitos/inseto). Após sete dias do inóculo, a hemolinfa dos insetos foi examinada para verificação da infecção. Assim como nos insetos infectados com *T. cruzi*, os insetos infectados com *T. rangeli* foram deixados em jejum até a morte. Após a morte, os insetos foram transferidos para tubos de 1,5 mL contendo álcool absoluto. Esses triatomíneos, que foram utilizados como controles nas reações de PCR vieram do LATEC e foram gentilmente cedidos pela Dra. Alessandra A. Guarneri.

Além destes controles, em todas as reações foi utilizado um outro controle negativo que consistia no mix da reação sem adição de DNA molde.

3.9 Caracterização molecular de cepas de *Trypanosoma cruzi* de acordo com o novo consenso

A caracterização molecular de *T. cruzi* seguiu as recomendações publicadas recentemente de acordo com o novo consenso sobre a

nomenclatura de *T. cruzi* (ZINGALES *et al.*, 2009). Foram caracterizadas amostras de *T. cruzi* encontradas em 39 triatomíneos coletados no campo.

Quatro marcadores moleculares foram usados para a nova caracterização: i) espaçador intergênico não transcrito do gene do mini exon; ii) domínio divergente D7 do locus 24Sα rRNA (LSU rDNA); iii) gene glucose-6-fosfato isomerase e, iv) gene hsp60 - *Heat Shock Protein*.

Afim de facilitar a compreensão de como está sendo realizada a caracterização de *T. cruzi*, a seguir, a metodologia de cada marcador é descrita separadamente, seguindo a publicação de LEWIS *et al.* (2009) e as recomendações do novo consenso em taxonomia para *T. cruzi*.

3.9.1 Espaçador intergênico não transcrito do gene do Mini exon

Foram utilizados três iniciadores TCI - 5'-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G-3' (específico para *T. cruzi* 1, de acordo com ANONYMOUS, 1999), TCII - 5'-GTG TCC GCC ACC TCC TCC GGC CC-3' (específico para *T. cruzi* 2, segundo ANONYMOUS, 1999), TC - 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3' (comum aos dois grupos) (SOUTO *et al.*, 1996). Os iniciadores foram sintetizados pelo Laboratório Sigma-Aldrich. O tamanho dos fragmentos esperados variam entre 300 e 350 pb (SOUTO *et al.*, 1996) ou 250, 300, 350 ou 400 pb (LEWIS *et al.*, 2009). Os reagentes usados na PCR foram: 2,5 µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 0,75 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 2,5 µM de cada iniciador, 1 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e 2-3 µL de DNA "B" molde, perfazendo volume total de 25 µL/reação. A condição da PCR foi a mesma como descrito na tabela 2. Em seguida, 3 µL do produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%, deixados em um banho de brometo de etídio 0,04% e os fragmentos visualizados em fotodocumentador UV. Em seguida os produtos da PCR foram purificados com a utilização do Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), o DNA purificado dosado em Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Termo Fisher Scientific Inc.) e então, as amostras foram destinadas ao sequenciamento em sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic

Analyser (Applied Biosystem).

Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados, as sequências forward e reverse de cada amostra foram alinhadas no programa Bioedit versão 7.0.9.0 (HALL, 1999) juntamente com as sequências dos iniciadores. Após o alinhamento e tratamento das bases inespecíficas foi criada uma sequência consenso de cada amostra e novamente alinhado.

3.9.2 Domínio divergente D7 do locus 24S α rRNA (LSU rDNA)

Para a amplificação do domínio divergente D7 do locus 24S α rRNA (LSU rDNA) foram utilizados dois iniciadores: D71 - 5'-AAG GTG CGT CGA CAG TGT GG-3' e D72 - 5'-TTT TCA GAA TGG CCG AAC AGT-3'. O tamanho esperado dos fragmentos amplificados pode variar de 110, 117, 120, 125 ou 130 pb (LEWIS *et al.*, 2009). Os reagentes usados na PCR foram: 5 μ L de 5X Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega), 3 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 2,5 μ M de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 2,5 μ l do DNA "A" molde, perfazendo volume total de 25 μ l/reação. A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler EP Gradients e Biometra[®] T-1 Termoblock e consistiu em desnaturação inicial a 94° C por 3 min, seguidos de 27 ciclos de 94° C por 1 min, 60° C a 1 min e 72° C por 1 min e extensão final de 72° C por 5 min. Foram submetidos 3 μ L dos produtos amplificados a eletroforese em gel de agarose 3% e em seguida corados com brometo de etídio e visualizados em lâmpada UV.

3.9.2.1 Clonagem dos fragmentos amplificados do domínio divergente D7 do locus 24S α rRNA (LSU rDNA)

Devido a proximidade dos tamanhos dos fragmentos esperados, foram identificados e clonados os diferentes padrões de bandas encontrados. Aproximadamente 20 μ L dos produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 3% e corados com brometo de etídio. Com ajuda de um bisturi as diferentes bandas foram cortadas do gel, o produto amplificado foi

purificado com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System e o DNA dosado em Nanodrop. Para a clonagem foi utilizado o kit pGEM®-T Easy Vector System (Promega). A etapa de ligação consistiu na preparação do mix contendo 5 µL de tampão 2x de ligação rápida, 1 µL de Ligase, 0,5 µL do vetor (pGEM®-T Easy Vector), aproximadamente 40 ng de DNA e água para completar 10 µL. O material foi mantido a 4° C por toda a noite e transferido no dia seguinte para freezer -20° C.

Para a etapa de transformação, 2 µL do produto de ligação foram colocados dentro de tubos Falcon® de 15 mL acrescidos de 100 µL de *Escherichia coli* Escherich, 1885 DH5 alpha e mantidos em gelo por 30 min. Em seguida, os tubos foram incubados a 42° C por 45 seg e transferidos imediatamente para o gelo. Após esta etapa, a manipulação foi realizada próxima a um bico de bunsen para evitar contaminação e foram adicionados 400 µL de meio de cultura SOC (Anexo II). Os tubos ficaram sob agitação por 1 hora a 37° C. Em seguida o material foi transferido para tubos de 2 mL, centrifugados a 13200 rpm por 5 min e descartado 400 µL do sobrenadante. Cerca de 100 µL restantes foram homogeneizados com pipeta, transferidos para placas de petri com meio de cultura LB (Anexo III) e mantidos em estufa B.O.D. a 36° C por toda a noite. No dia seguinte pela manhã, as placas foram transferidas para geladeira a 4° C.

Para verificação dos produtos clonados, foi realizada uma PCR com os iniciadores SP6 5'- ATTAGGTGACACTATAGAA-3' e T7 5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3', desenhados para a amplificação de fragmentos inseridos no vetor pGEM® (Promega) (figura 7).

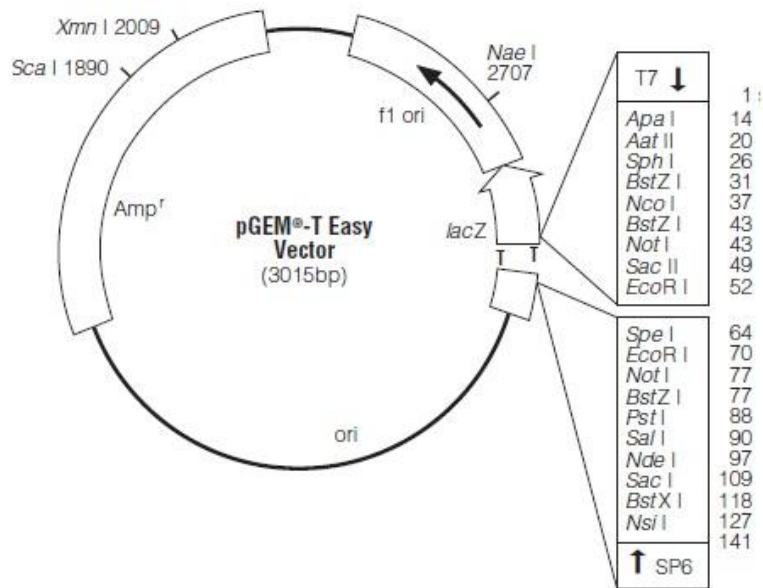


Figura 7: Local de anelamento dos iniciadores T7 e SP6 usados na clonagem dos fragmentos amplificados do domínio divergente D7 do locus 24Sa rRNA (LSU rDNA) (Fonte: Promega).

Os reagentes usados na PCR foram: 5 μ L de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 2,5 μ M de cada iniciador, 1 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e, com a ajuda de uma ponteira, foi retirada uma colônia de bactérias (colônias brancas) para cada tubo de PCR. Para cada fragmento clonado foram realizadas seis amostras (seis colônias de bactérias). O Ciclo da PCR consistia em desnaturação inicial de 94° C por 10 min, seguidos de 35 ciclos de 94° C 1 min, 55° C por 1 min e 72° C por 1 min e extensão final de 72° C por 5 min. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em lâmpada UV.

Nos casos onde o vetor inseriu o fragmento da clonagem, os produtos de PCR foram purificados. A purificação consistia na preparação de um mix contendo para cada amostra: 0,75 μ L de água, 3 μ L de tampão Fosfatase, 0,875 μ L de Fosfatase e 0,375 μ L de Exonuclease, perfazendo 5 μ L cada amostra. Toda a etapa foi realizada em gelo e em seguida as amostras foram incubadas a 37° C por 15 min e depois a 80° C por 15 min. Após, o

material foi transferido e mantido em congelador a -20° C. Os produtos purificados foram sequenciados, conforme será descrito a seguir.

3.9.3 Glucose-6-fostato isomerase – PCR/RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*)

Como descrito por LEWIS *et al.* (2009), para a utilização deste marcador para a identificação taxonômica de *T. cruzi* é necessário o uso de enzimas de restrição. Para tal, foram utilizados dois iniciadores descritos por GAUNT *et al.* (2003) que amplificam um fragmento de 1038 pb: GPI-F 5' - GGCATGTGAAGCTTTGAGGCCTTTTCAG - 3' e GPI-R 5' - TGTAAGGGCCCAGTGAGAGCGTTCGTTGAATAGC - 3'. A amplificação do fragmento foi realizada via PCR em termociclador Eppendorf Mastercycler EP Gradients, utilizando os seguintes reagentes: 5 µL de 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 5 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 2 µl do DNA “A” molde, perfazendo volume total de 25 µl/reação. As condições da PCR estão descritas na tabela 4.

Tabela 4: Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase nos estudos da caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* da enzima Glucose-6-fostato isomerase e do gene *Heat Shock Protein* (modificado de LEWIS *et al.*, 2009).

Temperatura de desnaturação/tempo		Ciclo	Temperatura de anelamento dos iniciadores/tempo		Temperatura de extensão do DNA/tempo	
94° C	3 min	Primeiro				
94° C	30 seg	4 Ciclos	60° C	30 seg	72° C	1 min
94° C	30 seg	28 Ciclos	56° C	30 seg	72° C	1 min
		extensão final			72° C	10 min

Para a visualização dos produtos amplificados, 3 µL da amostra amplificada foram diluídos em igual volume de tampão de amostra 2x (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 15% de ficol) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e a observação das bandas feita em fotodocumentador com lâmpada UV.

Para a digestão com enzima de restrição, 10 µL de cada produto amplificado foi digerido contendo 0,25 U/µL da enzima *Hha* I (NEB, Hitchin, UK), 100 ng/µL de BSA e 1x de tampão enzimático (50 mM de acetato de potássio, 20 mM de Tris acetato, 10 mM de acetato de magnésio e 1 mM de DTT pH 7,9) perfazendo volume total de 20 µL. As amostras foram incubadas a 37° C por quatro horas e em seguida, para visualização dos produtos digeridos, 10 µL foram aplicados em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (LEWIS *et al.*, 2009).

3.9.4 Gene HSP60 - Heat Shock Protein PCR/RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*)

A metodologia empregada para a amplificação do gene HSP60 de *T. cruzi* foi a mesma para o gene Glucose-6-fostato isomerase, com o uso de enzimas de restrição (PCR-RFLP). Dois iniciadores, HSP60F – 5'-GTGGTATGGGTGACATGTAC-3' e HSP60R – 5'-CGAGCAGCAGAGCGAACAT-3', foram utilizados para a amplificação de um fragmento de 432 ou 462pb (LEWIS *et al.*, 2009). Os reagentes utilizados na PCR foram: 5µL de 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 5 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 2 µl do DNA "A" molde, perfazendo volume total de 25 µl/reação.

As condições da PCR foram as mesmas utilizadas para a amplificação do gene *Heat Shock Protein* e estão descritas na tabela 4.

Os produtos amplificados (3 µL) foram diluídos na mesma quantidade de tampão de amostra 2x (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de

xilenocianol e 15% de ficol) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio e a observação das bandas feita em fotodocumentador com lâmpada UV.

A digestão dos produtos amplificados foi realizada com a enzima de restrição EcoRV. Para tal, 10 µL de cada produto amplificado foi digerido contendo 0,25 U/µL da enzima EcoRV (NEB, Hitchin, UK), e 1x de tampão enzimático (50 mM de acetato de potássio, 20 mM de Tris acetato, 10 mM de acetato de magnésio e 1 mM de DTT pH 7,9) perfazendo volume total de 20 µL. As amostras foram incubadas a 37° C por quatro horas e em seguida, para visualização do produto digerido, 10 µL foram aplicados em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio (LEWIS *et al.*, 2009).

3.10 Identificação das fontes alimentares dos triatomíneos: amplificação de fragmento do gene Citocromo B mtDNA.

A identificação das fontes alimentares dos triatomíneos, foi realizada utilizando um par de iniciadores que amplifica parte do mtDNA do gene citocromo B (CytB). Estes iniciadores, L14841 5'-AAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' e H15149 5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTGTCCTCA-3', designados iniciadores universais para animais vertebrados (KOCHER *et al.*, 1989), amplificam um fragmento de 305 pb e possuem a vantagem de não amplificar o DNA dos triatomíneos presente no tecido abdominal (MALMQVIST *et al.*, 2004).

Ninfas de quinto estágio de triatomíneos (*R. prolixus*) alimentadas no LATEC em camundongos (*Mus musculus*) e galinhas (*Gallus gallus*) serviram de controles positivos para a validação desta metodologia.

A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL, contendo: 5 µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega) 0,2 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 10 µM de cada iniciador, 1 U de Taq Polimerase (Promega) e 4-6 µL de DNA "B".

Após a PCR, 3 µL do produto amplificado foi submetido a eletroforese

em gel de agarose a 1%. Em seguida, os géis foram colocados em um recipiente contendo solução de brometo de etídio 0,04% por 10 minutos. A visualização das bandas foi feita em transluminador UV acoplado a um fotodocumentador Kodak 1D v.3.6.6. Scientific Imaging Systems.

3.11 Purificação do produto de PCR

Todos os insetos que amplificaram o fragmento CytB mtDNA para identificação das fontes alimentares tiveram o produto de PCR purificado. A purificação foi feita com kit comercial (Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System, Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Ao final, os DNAs purificados foram ressuspensos em 20 µL de água ultra pura livre de Rnase e Dnase e mantidos em freezer a -20° C.

A qualidade e concentração do DNA purificado, foi mensurada em espectrofotômetro Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Termo Fisher Scientific Inc.) sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação de absorbância 260/280 nm de comprimento de onda.

3.12 Sequenciamento

3.13 Reação de sequência e precipitação de DNA

A reação de sequência foi realizada a partir de um protocolo estabelecido no *Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation* do *Centre Nationale de la Recherche Cientifique* (LEGS/CNRS) e realizadas em tubos de 0,5 mL. Os reagentes utilizados foram: 3 µL de tampão de sequenciamento 5x, 2 µL de Bigdye Terminator v1.1® (Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem™, Courtaboeuf, France), 1 µL de cada iniciador a 3,2 µM, 40-60 ng do DNA purificado e água para totalizar 20 µL. A reação de sequência foi realizada separadamente para cada iniciador. Para a identificação das fontes alimentares foi realizado somente o sequenciamento em um sentido com o iniciador L14841 (KOCHER, et al., 1989). A reação de sequência foi realizada em termociclador Biometra Thermal Cycler. A tabela 5 apresenta

as condições estabelecidas para a reação de sequência.

Tabela 5: Condições estabelecidas para as reações de sequências.

Temperatura de desnaturação/tempo		Ciclo	Temperatura de anelamento dos iniciadores/tempo		Temperatura de extensão do DNA/tempo	
96° C	1 min	Primeiro				
96° C	10 seg	24 Ciclos	50° C	5 seg	60° C	4 min

Em seguida, a próxima etapa consistia na precipitação do DNA. Em cada tubo era adicionado 2 µL de solução de EDTA 125 mM, 2 µL de solução Acetato de Sódio 3M pH=5,2 e 50 µL de álcool 95° gelado. As amostras eram centrifugadas a 13200 rpm por 20 min. Após o sobrenadante era pipetado cuidadosamente de forma que a ponteira não encostasse na parede do tubo e 150 µL de álcool 70° gelado era adicionado em cada amostra. Estas foram novamente centrifugadas a 13200 rpm por 10 min. O sobrenadante era novamente retirado cuidadosamente e os tubos foram colocados em termociclador a 95° C para evaporação total. Uma vez secos os tubos, os mesmos eram armazenados em freezer -20° C para o sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado por uma equipe de técnicos do LEGS/CNRS. Em cada tubo foi adicionado 10 µL de Formamida (Applied Biosystem), homogeneizado com micropipeta e transferido para uma placa de 96 poços. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystem).

3.14 Tratamento das sequências das fontes alimentares

Uma vez sequenciadas, as sequências obtidas foram tratadas com a ajuda do programa Bioedit, versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). Após esta etapa, as sequências obtidas do primer L14841 foram comparadas com sequências depositadas na base de dados do GenBank usando a ferramenta BLAST.

3.15 Cartografia das áreas de estudo a partir de imagens de satélites como indicadores ecológicos de risco

As coordenadas geográficas das palmeiras investigadas foram obtidas com auxílio de um GPS (*Global Position System* - Garmin eTrex Legend) utilizando o Datum WGS-84.

Foi utilizada a imagem do satélite Landsat 5 228/63 (órbita/ponto) de 02/08/2009. O mapa da cobertura vegetal das três comunidades (São Tomé, Nova Estrela e Araipá) apresentando as áreas com florestas primária e secundária e o desflorestamento por ano, no período de 2000-2009, foram confeccionados a partir dos dados obtidos do Projeto Prodes (<http://www.obt.inpe.br/prodes/index.html>) e do Projeto TerraClass (<http://www.inpe.br/cra/terraclass.php>).

As análises espaciais de Sistemas de Informações Geográficas (SIG) foram realizadas com a ajuda dos softwares ArcGis (versão 9.3 - <http://www.esri.com/>) e SPRING (versão 5.16 - <http://www.dpi.inpe.br/spring/>), e para a elaboração dos mapas foram empregadas duas ferramentas: Kernel e o Interpolador de Médias Simples. Tanto para a análise de Kernel, quanto para o Interpolador de Médias Simples foram confeccionados mapas utilizando a infestação das palmeiras por triatomíneos, a densidade triatomínica e as palmeiras com insetos infectados pelo *T. cruzi*.

A análise de estimativa de Kernel é uma ferramenta estatística, não paramétrica, para a identificação visual dos "hotspots" (aglomerados), sem mudar as suas características locais (BAILEY & GATRELL 1995). Esta ferramenta foi utilizada com o objetivo de identificar visualmente quais áreas nas três comunidades apresentaram aglomerados significativos, ou seja, maior concentração de infestação das palmeiras por triatomíneos e maior densidade de insetos infectados pelo *T. cruzi*. A intensidade do kernel pode ser estimada pela equação (SANTOS *et al.*, 2001):

$$\hat{\lambda}_\tau(s) = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\tau^2} \kappa\left(\frac{(s-s_i)}{\tau}\right)$$

onde: $\hat{\lambda}_\tau(s)$ é o valor estimado em uma região; $\kappa()$ é a função de estimação kernel e s_1, \dots, s_n são localizações de n eventos observados (amostras) em um raio de influência τ com centro em s .

O arquivo gerado pelo kernel é uma grade com resolução espacial (x, y) e a escolha de τ define superfícies suaves (grandes larguras) ou não (pequenas larguras) centrados em s .

O kernel foi aplicado nos 133 pontos das três comunidades com o objetivo de identificar visualmente as áreas que apresentaram aglomerados significativos, ou seja, maior concentração de infestação da doença de Chagas e maior densidade dos triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*.

Já o Interpolador de Média Simples do software SPRING (CÂMARA *et al.*, 1996) é uma ferramenta de SIG que estima o valor da variável densidade de barbeiros (infectados e não infectados) em cada ponto da grade a partir da média simples dos valores da variável nos oito vizinhos mais próximos desse ponto, conforme a equação abaixo (INPE, 2006):

$$f(x, y) = \frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^8 z_i \right)$$

onde: n = número de vizinhos; z = valor da variável dos 8 vizinhos mais próximos e $f(x,y)$ = função interpolante.

O arquivo gerado pelo Interpolador é uma grade com resolução espacial (x, y). Na construção da grade regular foi aplicada a ferramenta nas comunidades através das coordenadas dos 133 pontos com o objetivo de identificar visualmente qual o local das comunidades apresentaram uma maior densidade de barbeiros e maior densidade de barbeiros infectados pelo *T. cruzi*.

3.16 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software Minitab, versão 14. Os dados obtidos da infestação das palmeiras, bem como os índices de infecção natural pelo *T. cruzi* e pelo *T. rangeli* foram comparados pelo teste do Qui-quadrado. Os valores de densidade triatomínica foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis e, em seguida, realizadas comparações entre cada par de variável pelo teste Mann-Whitney admitindo intervalo de confiança de 95%. O estudo de sorologia humana, foi realizado com moradores voluntários e acima de 14 anos de idade. A determinação do tamanho da amostra, para estimar a proporção de indivíduos infectados em cada uma das comunidades, foi calculado considerando o nível de 95% de confiança e uma margem de erro de 3%. O método de determinação do tamanho da amostra seguiu as determinações prescritas pela OMS (LEMESHOW *et al.*,1995).

4.1 Coleta dos triatomíneos e infestação das palmeiras

Durante as duas coletas de campo foram dissecadas 136 palmeiras em três diferentes unidades paisagísticas: pastos, capoeiras e fragmentos florestais. Na primeira coleta foram dissecadas 76 palmeiras (final do período seco) e, no final do período chuvoso 60 palmeiras de quatro espécies, a saber: babaçu (*Attalea speciosa*), inajá (*Attalea maripa*), uricuri (*Attalea phalerata*) e tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). A comunidade Nova Estrela foi a única em que as coletas foram realizadas somente no final do período seco. As demais comunidades foram investigadas nas duas missões de campo.

Na comunidade Araipá foram investigadas 38 palmeiras, sendo 10 (26,3%) infestadas por triatomíneos. Na comunidade São Tomé 73 palmeiras foram dissecadas estando 50 (68,5%) habitadas por triatomíneos, enquanto na Nova Estrela, dentre as 25 palmeiras pesquisadas, 13 (52%) foram positivas para os triatomíneos. No ano de 2008, dos 21 babaçus pesquisados 15 estavam infestados; entre os 36 inajás, 15 tinham triatomíneos; dos 16 uricuris, 11 estavam infestados por *Rhodnius* e nenhum dos três tucumãs foi encontrado barbeiro. Os resultados estatísticos revelaram diferença significativa de infestação entre as espécies de palmeiras ($p=0,045$), e o índice global de infestação em 2008 foi de 53,9%. Já em 2009, foram dissecadas 60 palmeiras, sendo: 12 babaçus (83,3% infestadas), 38 inajás (34,2% infestadas) e 10 uricuris (90% infestadas). Assim como em 2008, os resultados estatísticos para 2009 demonstraram diferença significativa entre as espécies de palmeira ($p<0,05$) sendo as maiores infestações encontradas em babaçus e uricuris. Neste período, o índice de infestação global foi de 53,3%. Somando as duas coletas, 53,7% das palmeiras pesquisadas estavam infestadas por triatomíneos. A tabela 6 apresenta os dados de infestação das palmeiras por comunidade, período de coleta e espécie de palmeira.

Embora não tenha sido realizada pesquisa de triatomíneos no intradomicílio, potes plásticos descartáveis com tampas foram entregues aos moradores das três comunidades. Qualquer inseto encontrado dentro das

casas era coletado, armazenado nos potes e enviados ao LATEC. Foram encontrados várias espécies de insetos incluindo algumas da família Reduviidae, porém predadores. No entanto, chama a atenção o encontro de uma fêmea de *R. robustus* sem conteúdo estomacal, indicando jejum prolongado e que foi encontrada na parede da sala de uma casa na comunidade de Nova Estrela no segundo semestre de 2010. As quatro espécies de palmeiras pesquisadas estão apresentadas na figura 8.



babaçu
Attalea speciosa



inajá
Attalea maripa



uricuri
Attalea phalerata



Tucumã
Astrocaryum aculeatum

Figura 8: Espécies de palmeiras pesquisadas nas comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil.

Tabela 6: Infestação das palmeiras pesquisadas por triatomíneos de acordo com comunidade, ano de coleta.

Palmeira	Agrovila-Araipá						Nova Estrela				São Tomé				Total Geral	
	2008		2009		Total		2008		2008		2009		Total			
	P	I (%)	P	I (%)	P	I (%)	P	I (%)	P	I (%)	P	I (%)	P	I (%)	P	I (%)
babaçu	-	-	-	-	-	-	7	3 (42,9)	14	12 (85,7)	12	10 (83,3)	26	22 (84,6)	33	25 (75,8)
inajá	17	6 (35,3)	18	4 (22,2)	35	10 (28,6)	4	1 (25)	15	8 (53,3)	20	9 (45)	35	17 (48,6)	74	28 (38,8)
tucumã	3	0	-	-	3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0
uricuri	-	-	-	-	-	-	14	9 (64,3)	2	2 (100)	10	9 (90)	12	11 (91,7)	26	20 (77)
Total	20	6 (30)	18	4 (22,2)	38	10 (26,3)	25	13 (52)	31	22 (71)	42	28 (66,7)	73	50 (68,5)	136	73 (53,7)

P = número de palmeiras pesquisadas

I (%) = número de palmeiras infestadas

- = palmeira inexistente no local de coleta

4.2 Densidade populacional

No total foram coletados 743 triatomíneos, sendo 120 adultos e 623 ninfas. Entre os 120 adultos, 85 eram machos (70,8%) e 35 fêmeas (29,2%). Durante o primeiro trabalho de campo foram coletados 424 triatomíneos sendo 359 (84,7%) ninfas e 65 (15,3%) adultos pertencentes a três espécies: *R. robustus*, *R. pictipes* e *Panstrongylus lignarius* (figura 9). Os resultados estatísticos não demonstraram diferença significativa da densidade triatomínica entre as três comunidades pesquisadas (Kruskal-Wallis, $p=0,105$), entretanto, os resultados obtidos por comparação entre as comunidades demonstrou diferença somente entre São Tomé e Aripá, sendo maior a densidade de triatomíneos nas palmeiras de São Tomé (Mann-Whitney, $p=0,0352$) (figura 10). Ao compararmos a infestação nas três espécies de palmeira de maneira global, observa-se uma diferença significativa entre as mesmas (Kruskal-Wallis, $p=0,015$). Os resultados demonstram maior densidade de triatomíneos nas palmeiras babaçu e uricuri (Mann-Whitney, $p<0,05$) em relação a palmeira injá. (figura 11).

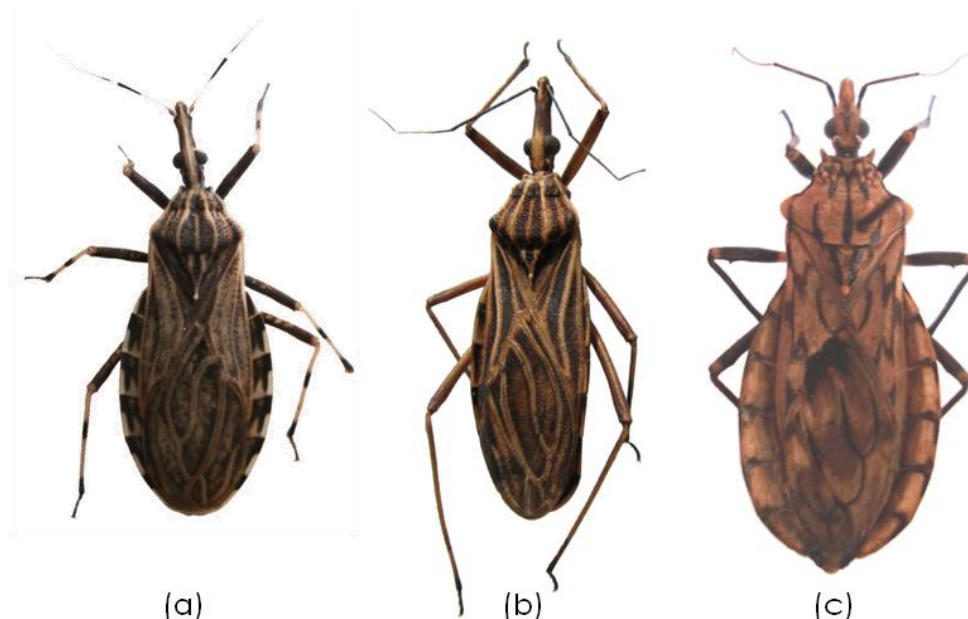


Figura 9: Espécies de triatomíneos encontradas nas palmeiras das comunidades do médio Tapajós, Pará, Brasil. (a) macho de *Rhodnius pictipes* (foto: Maria Angélica de Oliveira); (b) macho de *R. robustus* (foto do autor) e (c) fêmea de *Panstrongylus lignarius* (foto: Maria Angélica de Oliveira).

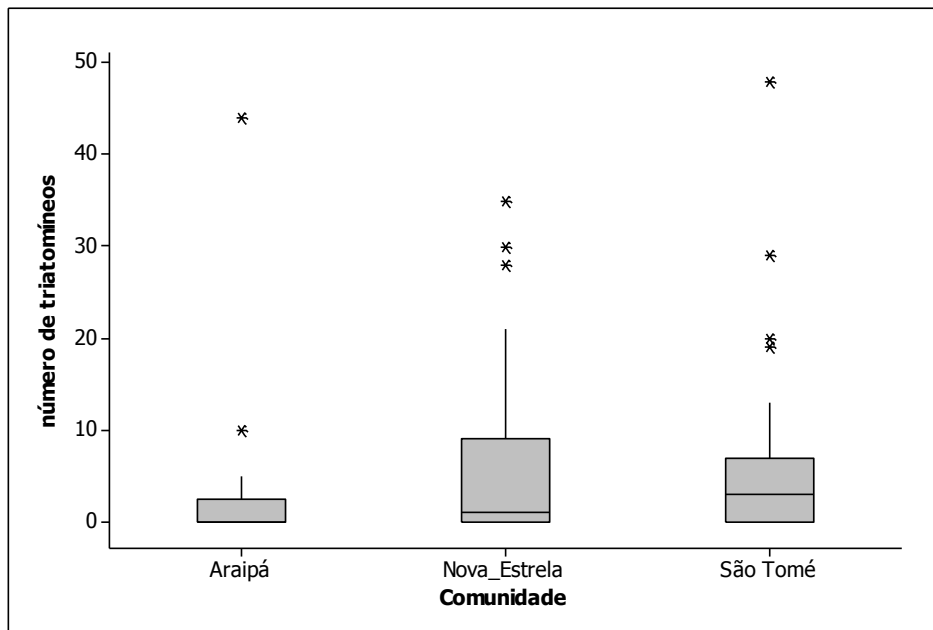


Figura 10: Box plot da densidade de triatomíneos coletados nas palmeiras das três comunidades pesquisadas no ano de 2008. A linha central de cada box plot refere-se à mediana e os asteriscos referem-se ao número de triatomíneos coletados em algumas palmeiras (*outliers*).

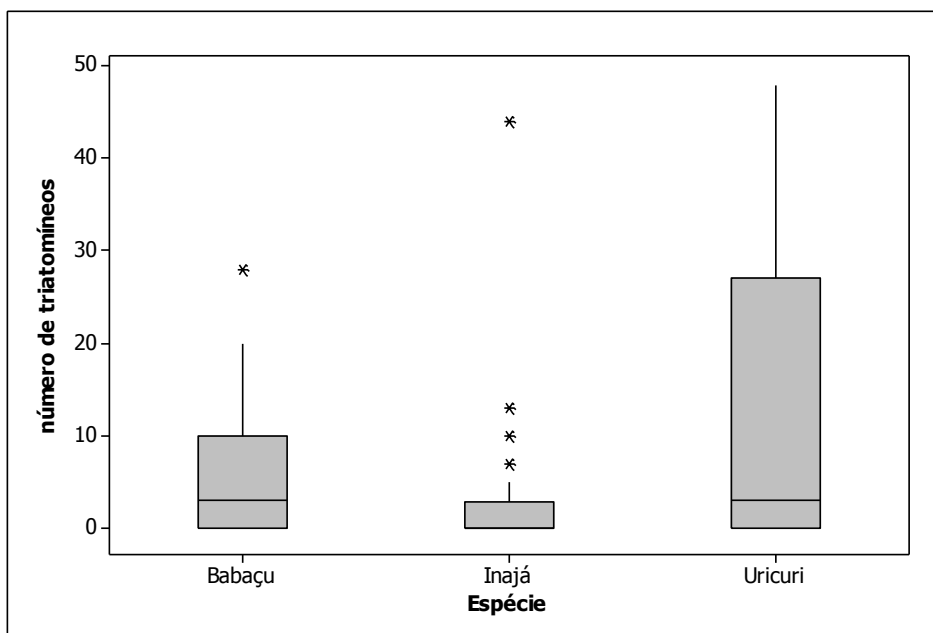


Figura 11: Box plot da densidade de triatomíneos coletados nas três comunidades por espécie de palmeira no ano de 2008. A linha central de cada box plot refere-se à mediana e os asteriscos referem-se ao número de triatomíneos coletados em algumas palmeiras (*outliers*).

Já na segunda coleta foram encontradas 264 (82,8%) ninfas e 55 (17,2%) adultos de duas espécies de triatomíneos: *R. robustus* e *R. pictipes* nas duas comunidades trabalhadas: Araipá e São Tomé. As análises estatísticas demonstraram diferença significativa de densidade de triatomíneos entre as duas comunidades (Mann-Whitney, $p=0,0005$), estando as palmeiras de São Tomé mais povoadas por triatomíneos (figura 12). Neste período (2009), considerando ainda a densidade dos triatomíneos, os resultados foram similares a 2008. Estatisticamente foi encontrada diferença entre as três espécie de palmeiras de uma forma global (Kruskal-Wallis, $p=0,000$), sendo as palmeiras injás com menor densidade de barbeiros (Mann-Whitney, $p<0,05$) (figura 13)

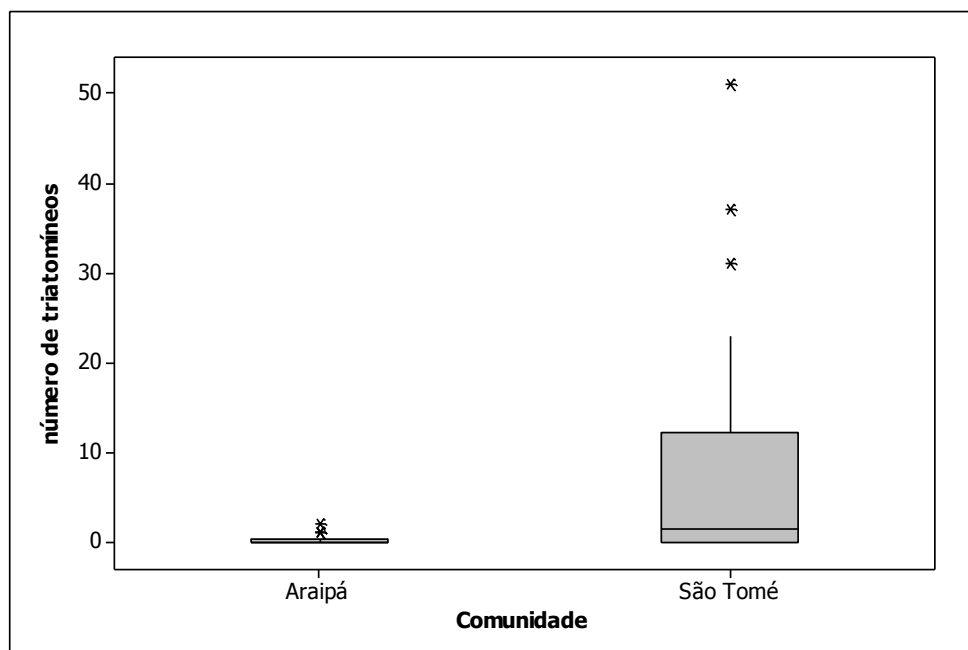


Figura 12: Box plot da densidade de triatomíneos coletados nas palmeiras de Araipá e São Tomé no ano de 2009. A linha central de cada box plot refere-se à mediana e os asteriscos referem-se ao número de triatomíneos coletados em algumas palmeiras (*outliers*).

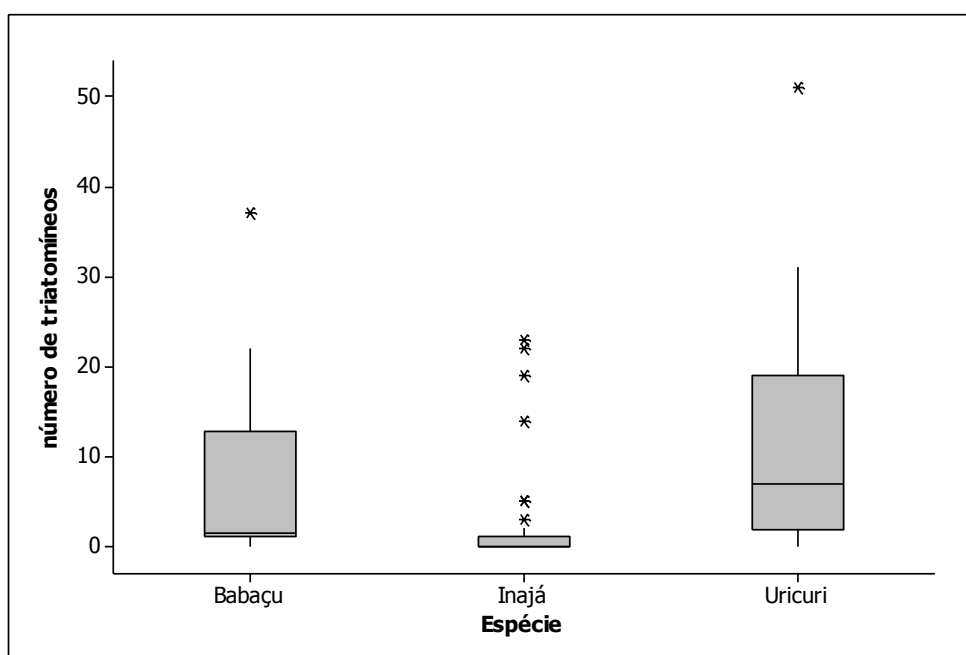


Figura 13: Box plot da densidade de triatomíneos coletados nas três comunidades por espécie de palmeira no ano de 2009. A linha central de cada box plot refere-se à mediana e os asteriscos referem-se ao número de triatomíneos coletados em palmeiras individuais (*outliers*).

O único espécime de *P. lignarius* que foi encontrado era uma ninfa de quinto estágio que habitava uma palmeira inajá, juntamente com *R. robustus* em um fragmento de mata da comunidade São Tomé em 2008. Para a identificação deste espécime, a ninfa foi alimentada semanalmente em galinhas no laboratório (LATEC) e mantida em insetário climatizado. Após a muda imaginal, o inseto foi identificado de acordo com as chaves de LENT & WYDOGZINSKY (1979), para confirmação do *status* taxonômico. Durante os dois trabalhos de campo, foram encontradas três ninfas de *R. pictipes*, sendo duas ninfas (N3 e N4) coletadas em 2008 e uma ninfa de quinto estágio em 2009. Na região de estudo a predominância da espécie encontrada foi *R. robustus* (99,5%, n=739).

Os resultados obtidos pela análise do Citocromo B de uma amostra dos *Rhodnius robustus* coletados corroboraram com a identificação realizada pelas chaves de classificação propostas por LENT & WYGODZINSKY (1979), confirmando o *taxon* encontrado. Todos os *R. robustus* apresentaram 99% de

similaridade com haplótipo roBR3m, procedente de Apuí, Amazonas, correspondente ao grupo *R. robustus* III (MONTEIRO *et al.*, 2003).

Os triatomíneos coletados foram contabilizados por espécie de palmeira e ano de amostragem (tabela 7), e a tabela 8 apresenta os dados da densidade populacional dos triatomíneos em cada comunidade, em relação ao período de coleta, espécie de palmeira (figura 14).

Tabela 7: Densidade de triatomíneos coletados por espécie de palmeira, por comunidade e por período.

Comunidade/ palmeira	Araipá		Nova Estrela	São Tomé		Total
	2008	2009	2008	2008	2009	
Babaçu	0	0	45	88	93	226 (30,4%)
Inajá	66	5	1	36	93	200 (26,9%)
Uricuri	0	0	112	77	128	317 (42,7%)
Total	66	5	158	200	314	743 (100%)
Mediana	0	0	1	3	1,5	

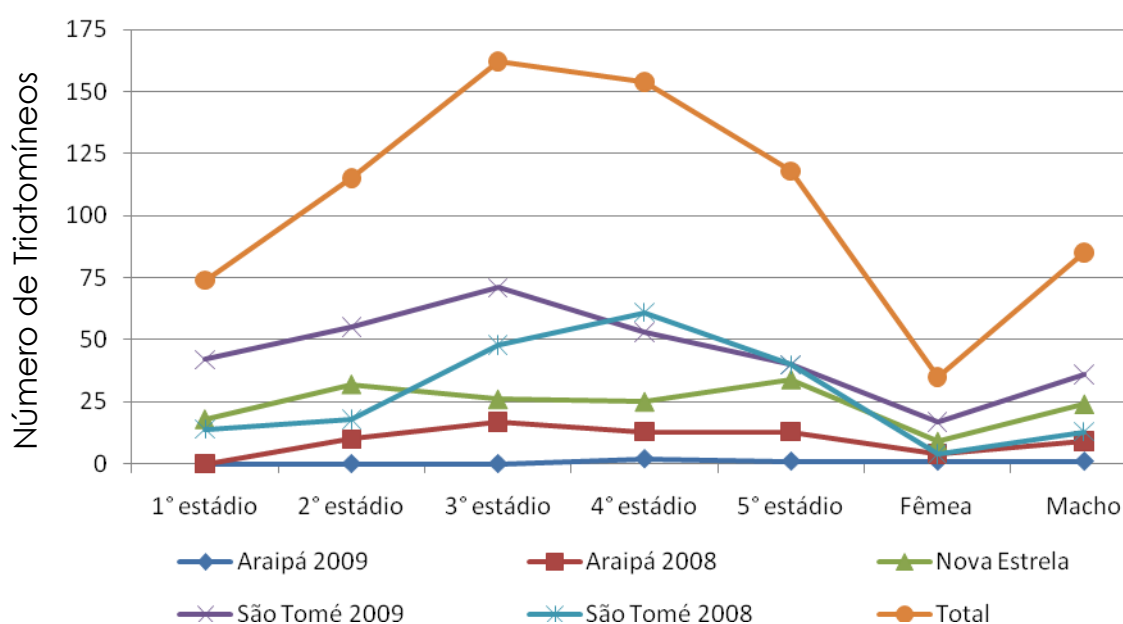


Figura 14: Densidade triatomínica encontrada nas palmeiras pesquisadas por comunidade e período de coleta

Tabela 8: Número de triatomíneos coletados em cada comunidade, em relação ao período de coleta, espécie de palmeira e estágio evolutivo dos insetos.

Estádio evolutivo	Araipá		Nova Estrela				São Tomé				Total	
	2008	2009	2008		2008		2009					
	inajá	inajá	Babaçu	inajá	uricuri	babaçu	inajá	uricuri	babaçu	inajá		uricuri
1º estágio	0	0	8	0	10	8	2	4	11	11	20	74
2º estágio	10	0	17	0	15	7	2	9	19	11	25	115
3º estágio	17	0	9	1	16	20	6	22	16	24	31	162
4º estágio	13	2	3	0	22	17	14	30	11	24	18	154
5º estágio	13	1	3	0	21	22	8	11	15	12	13	118
Fêmea	4	1	1	0	8	2	1	1	8	4	5	35
Macho	9	1	4	0	20	12	3	0	13	7	16	85
Total	66	5	45	1	112	88	36	77	93	93	128	743

4.3 Infecção por Tripanosomatídeos

4.3.1 Exame parasitológico direto e exame da hemolinfa

O exame parasitológico direto das fezes para constatação de infecção por tripanosomatídeos foi realizado apenas nos triatomíneos que chegaram vivos no LATEC. Portanto, na primeira coleta, dos 424 triatomíneos coletados, apenas 33 (7,8%) foram examinados e não foi encontrado em nenhum inseto formas flageladas de tripanosomatídeos. Na segunda coleta de campo, dos 319 triatomíneos coletados, 63 (19,7%) foram examinados, estando 21 triatomíneos infectados (índice de infecção natural 33,3% → referente aos insetos coletados em 2009), todos procedentes da comunidade São Tomé. Os dados globais revelaram que dos 96 triatomíneos examinados, 21 estavam infectados, gerando um índice de infecção global de 21,9%.

Os insetos examinados (n=96) também foram submetidos a exame da hemolinfa para constatação de infecção por *T. rangeli*, porém não foi encontrada infecção por este parasito nos triatomíneos. A tabela 9 apresenta os dados globais de captura, exame de triatomíneos, número de triatomíneos infectados e valor percentual de barbeiros infectados.

Tabela 9: Número de triatomíneos capturados, examinados, infectados com tripanossomatídeos, por comunidade, espécie de palmeira e período de coleta.

Palmeira	Triatomíneos capturados					Triatomíneos examinados					Triatomíneos infectados				
	Araipá		São Tomé		Nova Estrela	Araipá		São Tomé		Nova Estrela	Araipá		São Tomé		Nova Estrela
	2008	2009	2008	2009	2008	2008	2009	2008	2009	2008	2008	2009	2008	2009	2008
Babaçu	0	0	88	93	45	0	0	19	21	0	0	0	0	9	0
Inajá	66	5	35	93	1	7	0	6	20	0	0	0	0	3	0
Uricuri	0	0	77	128	112	0	0	0	22	1	0	0	0	9	0
Total	66	5	200	314	158	7	0	25	63	1	0	0	0	21	0

4.3.2 Identificação da infecção natural de *Rhodnius* spp por *Trypanosoma cruzi* empregando método molecular

Devido à alta mortalidade, não foi possível realizar o exame parasitológico *in vivo* de todos os insetos coletados no campo. Foi então, utilizado o espaçador intergênico não transcrito do gene do mini exon (SOUTO *et al.*, 1996), por meio da PCR.

Foram examinados 740 triatomíneos de um total de 742 *Rhodnius* spp coletados. Na primeira coleta de campo, dos 423 *Rhodnius* spp coletados, 32 (7,6%) apresentaram o mesmo tamanho de fragmento amplificado pela cepa Colombiana que corresponde a 350pb, característico de *T. cruzi* tipo 1 de acordo com ANONYMOUS, 1999 (figura 15). Estes triatomíneos infectados estão distribuídos em três espécies de palmeiras (babaçu, inajá e uricuri) e em todos os estádios evolutivos. A única comunidade que não apresentou triatomíneo infectado com *T. cruzi* foi Araipá e os resultados estatísticos não demonstraram diferença significativa do número de insetos infectados entre Nova Estrela e São Tomé (Qui-quadrado, $p=0,4506$). Considerando as espécies de palmeiras pesquisadas nas três comunidades, somente os inajás diferiram estatisticamente dos uricuris (Teste exato de Fisher, $p=0,0261$) (figura 16).

Na segunda coleta de campo, no ano de 2009, dos 319 triatomíneos coletados, foi investigada a infecção natural em 317 insetos e encontrada infecção em 93 (29,3%) *R. robustus*. Os três espécimes de *R. pictipes* coletados não apresentaram infecção por *T. cruzi*. O índice global de infecção foi de 16,9% e, assim como em 2008, a única comunidade que não apresentou triatomíneo infectado por *T. cruzi* foi Agrovila-Araipá. Considerando as duas comunidades investigadas em 2009 (São Tomé e Nova Estrela), as palmeiras de babaçu apresentaram maior índice de infecção em relação aos inajás e uricuris (Teste exato de Fisher, $p=0,0000$). Diferença estatística também foi encontrada entre São Tomé e Araipá com relação à infecção dos *Rhodnius* pelo *T. cruzi* (Teste exato de Fisher, $p=0,002549$).

De uma forma global, considerando os dados das duas coletas de campo, não foi encontrada diferença estatística somente os inajás e uricuris ($p=0,119$) (figura 17). Além disso, o ano de 2009 apresentou maior taxa de infecção pelo *T. cruzi* se comparado ao ano de 2008 para cada espécie de palmeira (Teste exato de Fisher, $p<0,03247$).

As tabelas 10 a 13 apresentam os dados de infecção natural por *T. cruzi* em *Rhodnius* spp por estágio evolutivo, ano de coleta, comunidade e espécie de palmeira.

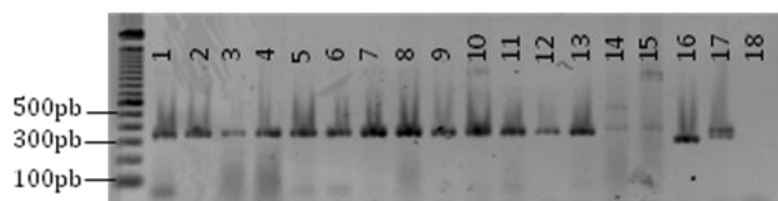


Figura 15: Amplificação via PCR do gene do mini exon de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos infectados. Canaletas 1 a 15 referem-se a triatomíneos coletados na comunidade de São Tomé, em 2009 nas três espécies de palmeiras estudadas (babaçu, inajá e uricuri). Canaleta 16: cepa CL; canaleta 17: cepa Colombiana; canaleta 18: controle negativo da reação (sem adição de DNA). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

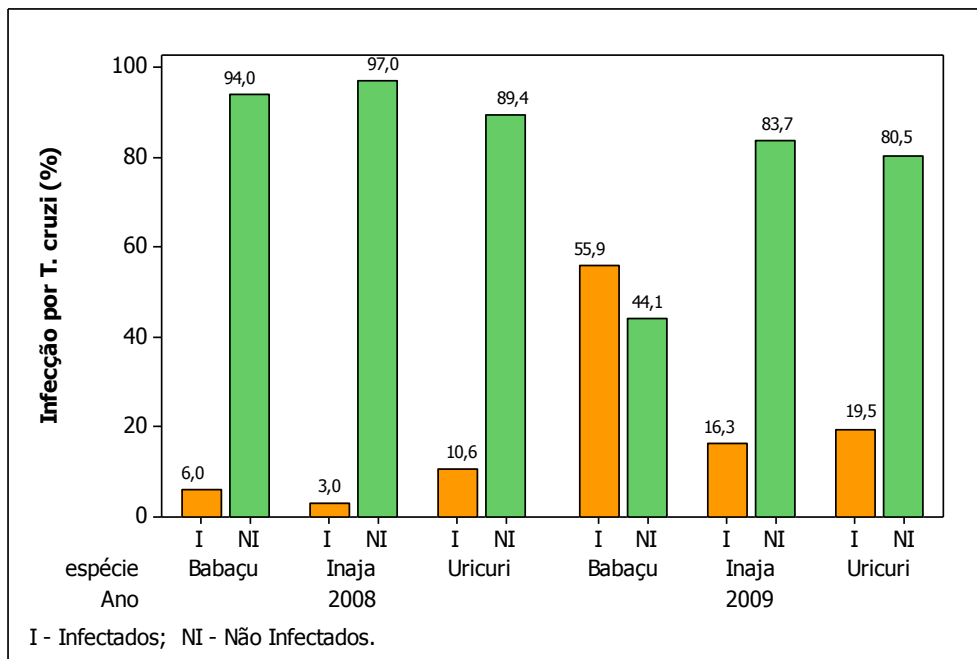


Figura 16: Porcentagem do número de triatomíneos infectados (I) e não infectados (NI) pelo *Trypanosoma cruzi*, por espécie de palmeira em 2008 e 2009.

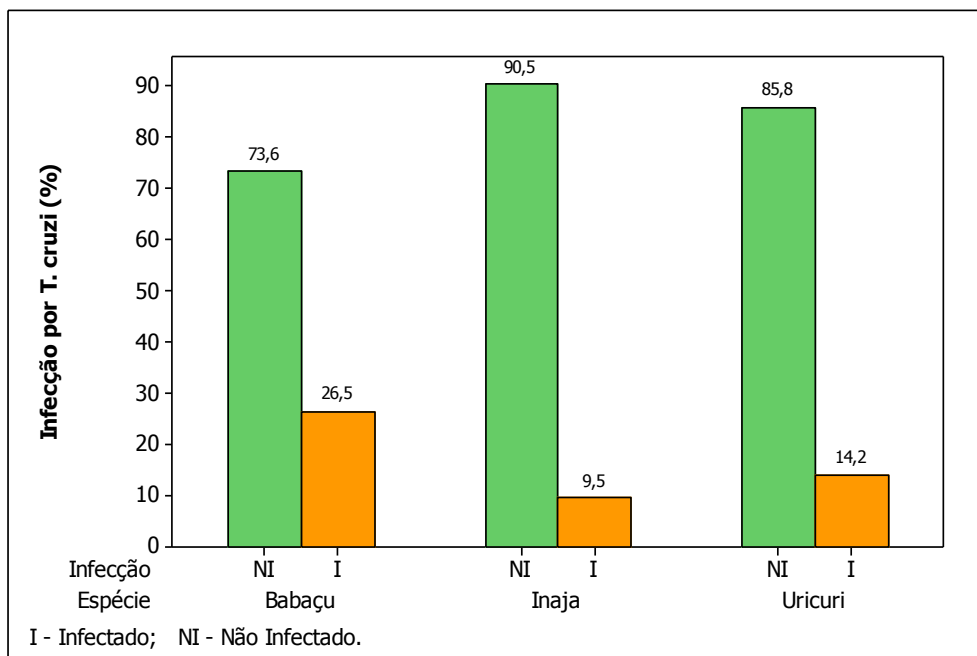


Figura 17: Porcentagem do número de triatomíneos infectados (I) e não infectados (NI) pelo *Trypanosoma cruzi*, por espécie de palmeira nas duas coletas de campo.

Tabela 10: Número de triatomíneos examinados/infectados com *Trypanosoma cruzi* através da PCR na comunidade de Agrovila-Araipá, por ano de coleta e estágio evolutivo.

Agrovila-Araipá (examinados / infectados)																								
2008								2009								Total								
	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total
Inajá	9/0	4/0	13/0	13/0	17/0	10/0	0/0	66/0	1/0	1/0	1/0	2/0	0/0	0/0	0/0	5/0	10/0	5/0	14/0	15/0	17/0	0/0	0/0	71/0

Tabela 11: Número de triatomíneos examinados/infectados com *Trypanosoma cruzi* através da PCR na comunidade de Nova Estrela, 2008, por estágio evolutivo.

Nova Estrela, 2008								
	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total
Babaçu	4/0	1/0	3/0	3/0	9/1	17/0	8/0	45/1
Inajá	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	1/0
Uricuri	20/7	8/3	21/0	22/2	16/0	15/1	10/2	112/15
Total	24/7	9/3	24/0	25/2	26/1	32/1	18/2	158/16

Tabela 12: Número de triatomíneos examinados/infectados com *Trypanosoma cruzi* através da PCR na comunidade de São Tomé, por ano de coleta e estágio evolutivo.

São Tomé (examinados / infectados)																								
2008								2009								Total								
	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total
Babaçu	12/2	2/0	22/2	17/1	20/0	7/1	8/2	88/8	13/10	8/7	15/12	11/6	16/9	19/6	11/2	93/52	25/12	10/7	37/14	28/7	36/9	26/7	19/4	181/60
Inajá	3/1	1/1	6/1	14/0	6/0	2/0	2/0	34/3	7/1	4/3	12/4	23/7	24/1	11/0	10/0	91/16	10/2	5/4	18/5	37/7	30/1	13/0	12/0	125/19
Uricuri	0/0	1/1	11/1	30/1	22/2	9/0	4/0	77/5	16/2	5/1	13/4	18/10	31/7	25/0	20/1	128/25	16/2	6/2	24/5	48/11	53/9	34/0	24/1	205/30
Total	15/3	4/2	39/4	61/2	48/2	18/1	14/2	199/16	36/13	17/11	40/20	52/23	71/17	55/6	41/3	312/93	51/16	21/13	79/24	113/25	119/19	73/7	55/5	511/109

Tabela 13: Dados globais do número de triatomíneos examinados/infectados com *Trypanosoma cruzi* através da PCR nas três comunidades pesquisadas, por ano de coleta e estágio evolutivo.

examinados / infectados																								
2008								2009								Total								
	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total
Babaçu	16/2	3/0	25/2	20/1	29/1	24/1	16/2	133/9	13/10	8/7	15/12	11/6	16/9	19/6	11/2	93/52	29/12	11/7	40/14	31/7	45/10	43/7	27/4	226/61
Inajá	12/1	5/1	19/1	27/0	24/0	12/0	2/0	101/3	8/1	5/3	13/4	25/7	24/1	11/0	10/0	96/16	20/2	10/4	32/5	52/7	48/1	23/0	12/0	197/19
Uricuri	20/7	9/4	32/1	52/3	38/2	24/1	14/2	189/20	16/2	5/1	13/4	18/10	31/7	25/0	20/1	128/25	36/9	14/5	45/5	70/13	69/9	49/1	34/3	317/45
Total	48/10	17/5	76/4	99/4	91/3	60/2	32/4	423/32	37/13	18/11	41/20	54/23	71/17	55/6	41/3	317/93	85/23	35/16	117/24	153/27	162/20	115/8	73/7	740/125

4.3.3 Identificação da infecção natural de *Rhodnius* spp por *Trypanosoma rangeli* empregando método molecular

Foi verificada também a infecção natural dos triatomíneos coletados por *T. rangeli*. Para isto, foi utilizado como marcador um gen repetitivo de ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11). Assim como na identificação da infecção natural para *T. cruzi*, foram avaliados 740 *Rhodnius* spp. Entre os 423 *Rhodnius* spp coletados em 2008, 16 triatomíneos amplificaram um fragmento de 620pb indicando a presença da infecção pelo *T. rangeli* (figura 18). Foi encontrada infecção em todos os estádios, exceto nas ninfas de primeiro estágio. Das 76 palmeiras dissecadas, seis continham insetos infectados por *T. rangeli*, sendo cinco palmeiras *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng. na comunidade de Nova Estrela e uma palmeira *A. maripa* em São Tomé. Não foi encontrado infecção nos triatomíneos coletados na comunidade de Araipá, nem nas palmeiras babaçu. Os resultados estatísticos demonstraram diferença significativa entre as comunidades, sendo maior o índice de infecção pelo *T. rangeli* nos triatomíneos de Nova Estrela ($p < 0,00659$) (figura 19). Além disso, estatisticamente também houve diferença significativa da infecção dos triatomíneos pelo *T. rangeli* nas palmeiras uricuri em 2008 (Teste exato de Fisher, $p < 0,0134$) (figura 20).

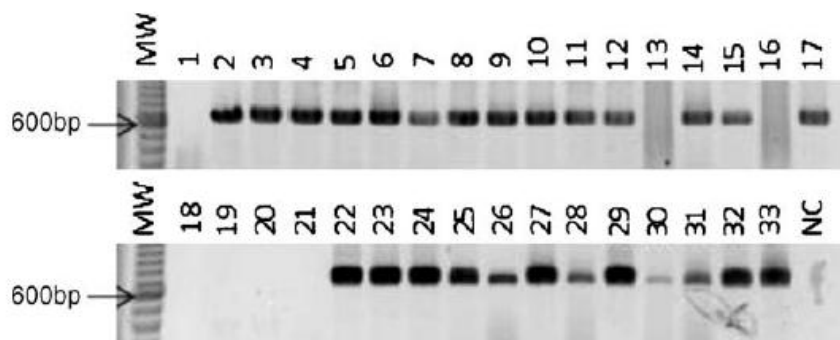


Figura 18: Amplificação via PCR do gene repetitivo de ARN nucleolar CI1 (sno-RNA-CI1) de triatomíneos infectados com *Trypanosoma rangeli*. Canaletas 1 – *R. prolixus* infectado em laboratório com *T. cruzi* (cepa CL); 2 – *R. prolixus* infectado em laboratório com *T. rangeli* (cepa Choachi); canaletas 3 a 33: *R. robustus* coletados em uma palmeira uricuri (*A. phalerata*) na comunidade São Tomé. Os triatomíneos correspondentes às canaletas 13, 16 e 18 a 21 não apresentaram infecção por *T. rangeli*. MW – Padrão de peso molecular (ladder 100pb – Invitrogen); NC – controle negativo da reação (sem adição de DNA). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

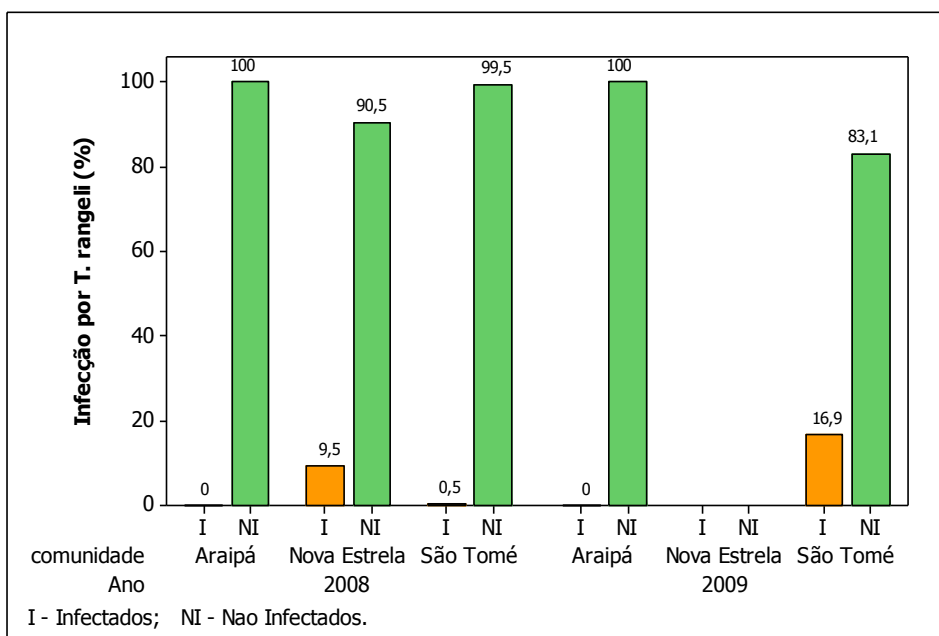


Figura 19: Porcentagem do número de triatomíneos infectados (I) e não infectados (NI) pelo *Trypanosoma rangeli*, por comunidade nas duas coletas de campo.

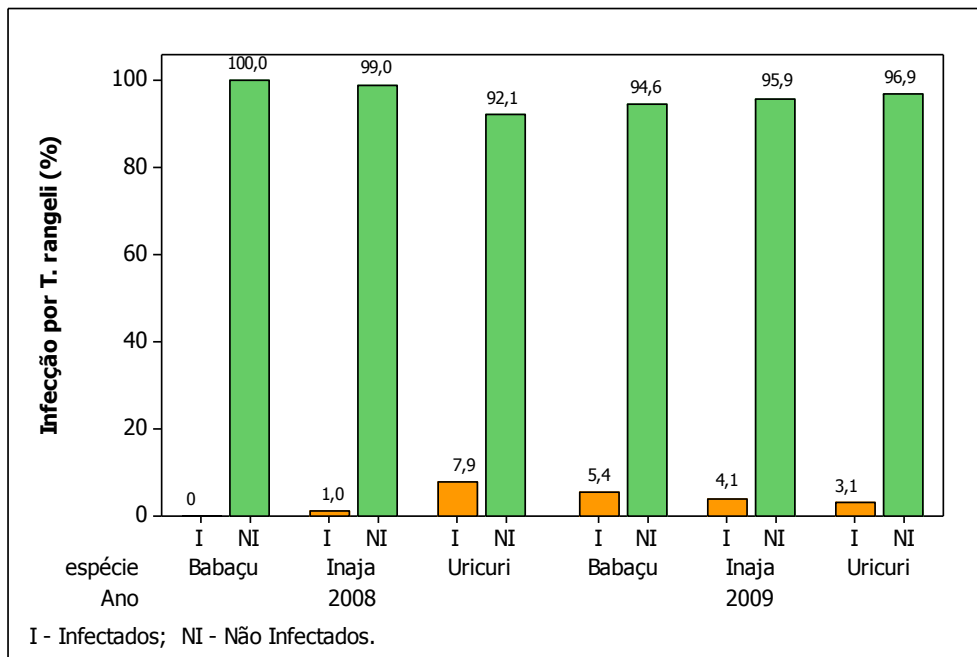


Figura 20: Porcentagem do número de triatomíneos infectados (I) e não infectados (NI) pelo *Trypanosoma rangeli*, por espécie de palmeira em 2008 e 2009.

Em 2009, entre os 319 triatomíneos coletados, 317 foram avaliados e 52 *R. robustus* e um *R. pictipes* também amplificaram o fragmento específico para *T. rangeli* (índice de infecção de 16,7%). Foi encontrada infecção em todos os estádios evolutivos. Somente em uma palmeira uricuri na comunidade São Tomé dos 31 triatomíneos coletados, 25 estavam infectados por *T. rangeli* (figura 18).

Das 60 palmeiras investigadas no ano de 2009, 10 palmeiras tinham triatomíneos infectados por *T. rangeli*, sendo seis palmeiras uricuri, dois babaçus e dois inajás, todas pertencentes a comunidade São Tomé. Não foi encontrado triatomíneo infectado por *T. rangeli* na comunidade Agrovila-Araipá. Considerando as duas comunidades pesquisadas em 2009, foi encontrada diferença estatística significativa de infecção dos triatomíneos pelo *T. rangeli* entre as mesmas ($p=0,00001$). No entanto, a comparação feita pelas três espécies de palmeira, os resultados não indicaram diferença estatística (Teste exato de Fisher, $p \geq 0,4975$).

De maneira global, considerando os dados de infecção de 2008 e

2009 somente foi encontrada diferença estatística entre as palmeiras de babaçu e uricuri (Qui-quadrado, $p=0,035$). Além disso, somente na palmeira babaçu os dados de infecção pelo *T. rangeli* apresentaram diferença estatística entre os dois anos pesquisados, demonstrando maior infecção dos *Rhodnius* no ano de 2009 (Teste exato de Fisher, $p=0,01105$),

As tabelas 14 a 17 apresentam os dados de infecção dos triatomíneos infectados por *T. rangeli*, utilizando a PCR como método de detecção do parasita, por comunidade e ano de coleta.

Tabela 14: Número de triatomíneos examinados/infectados com *Trypanosoma rangeli* através da PCR na comunidade Agrovila-Araipá, por ano de coleta e estágio evolutivo.

Agrovila-Araipá (examinados / infectados)																								
2008									2009									Total						
	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total
Inajá	9/0	4/0	13/0	13/0	17/0	10/0	0/0	66/0	1/0	1/0	1/0	2/0	0/0	0/0	0/0	5/0	10/0	5/0	14/0	15/0	17/0	10/0	0/0	71/0
Total	9/0	4/0	13/0	13/0	17/0	10/0	0/0	66/0	1/0	1/0	1/0	2/0	0/0	0/0	0/0	5/0	10/0	5/0	14/0	15/0	17/0	0/0	0/0	71/0

Tabela 15: Número de triatomíneos examinados/infectados com *Trypanosoma rangeli* através da PCR na comunidade Nova Estrela, 2008 e estágio evolutivo.

2008								
	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total
Babaçu	4/0	1/0	3/0	3/0	9/0	17/0	8/0	46/0
Inajá	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	1/0
Uricuri	20/4	8/1	21/1	22/5	16/2	15/2	10/0	112/15
Total	24/7	9/3	24/0	25/2	26/1	32/1	18/2	159/15

Tabela 16*: Número de triatomíneos examinados/infectados com *Trypanosoma rangeli* através da PCR na comunidade São Tomé, por ano de coleta e estágio evolutivo.

São Tomé (examinados / infectados)																								
	2008								2009								Total							
	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total
Babaçu	12/0	2/0	22/0	17/0	20/0	7/0	8/0	88/0	13/0	8/2	15/2	11/0	16/0	19/1	11/0	93/52	25/0	10/2	37/2	28/0	36/0	26/1	19/0	181/5
Inajá	3/1	1/0	6/0	14/0	6/0	2/0	2/0	34/1	7/1	4/2	12/0	23/0	24/1	11/0	10/0	91/16	10/2	5/2	18/0	37/0	30/1	13/0	12/0	125/5
Uricuri	0/0	1/0	11/0	30/0	22/0	9/0	4/0	77/0	16/11	5/2	13/4	18/5	31/7	25/11	20/4	128/25	16/11	6/2	24/4	48/5	53/7	34/11	24/4	205/44
Total	15/1	4/0	39/0	61/0	48/0	18/0	14/0	199/1	36/13	17/11	40/20	52/23	71/17	55/6	41/3	312/93	51/13	21/6	79/6	113/5	119/8	73/12	55/4	511/54

*a ninfa de *P. lignarius* coletada em uma palmeira inajá no ano de 2008 não foi examinada

Tabela 17: Dados globais do número de triatomíneos examinados/infectados com *Trypanosoma rangeli* através da PCR nas três comunidades pesquisadas, por ano de coleta e estágio evolutivo.

examinados / infectados																								
	2008								2009								Total							
	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total	Macho	Fêmea	N5	N4	N3	N2	N1	Total
Babaçu	16/0	3/0	25/0	20/0	29/0	24/0	16/0	133/0	13/0	8/2	15/2	11/0	16/0	19/1	11/0	93/5	29/12	11/7	40/14	31/7	45/10	43/7	27/4	226/5
Inajá	12/1	5/0	19/0	27/0	24/0	12/0	2/0	101/1	8/1	5/2	13/0	25/0	24/1	11/0	10/0	96/4	20/2	10/4	32/5	52/7	48/1	23/0	12/0	197/5
Uricuri	20/4	9/1	32/1	52/5	38/2	24/2	14/0	189/15	16/11	5/2	13/4	18/5	31/7	25/11	20/4	128/44	36/9	14/5	45/5	70/13	69/9	49/1	34/3	317/59
Total	48/5	17/1	76/1	99/5	91/2	60/2	32/0	423/16	37/12	18/6	41/6	54/5	71/8	55/12	41/4	317/53	85/17	35/7	117/7	153/10	162/10	115/14	73/4	740/69

4.3.4 Infecção Mista

Ao cruzar os dados de infecção natural do *T. cruzi*, utilizando o espaçador intergênico não transcrito do gene do mini exon, com os dados de infecção natural do *T. rangeli* com o uso do gene repetitivo de ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) foi possível verificar quais triatomíneos possuíam infecção mista, ou seja, a presença dos dois parasitos no mesmo inseto vetor.

Em 2008 foram encontrados cinco triatomíneos com infecção mista, sendo três machos e duas ninfas de quarto estágio. Estes triatomíneos estão distribuídos em cinco palmeiras, sendo quatro palmeiras uricuri na comunidade Nova Estrela e uma palmeira inajá em São Tomé.

No ano de 2009, 14 triatomíneos apresentaram infecção mista, todos da comunidade São Tomé. Somente ninfas de primeiro e segundo estágio não foram encontradas com infecção dupla. A tabela 18 apresenta os dados de infecção mista distribuídos conforme espécie de palmeira, no ano de 2009.

Tabela 18: Número de triatomíneos com dupla infecção (presença de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*) detectada via PCR, 2009.

Comunidade: São Tomé								
Palmeira	Estádio evolutivo						Total	
	Macho	fêmea	N5	N4	N3	N2		N1
babaçu	0	2	1	0	0	0	0	3
inajá	2	1	0	0	0	0	0	3
uricuri	0	1	1	2	4	0	0	8
Total	2	4	2	2	4	0	0	14

4.4 Caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* de acordo com o novo consenso

Dentre os 93 triatomíneos que foi encontrada infecção por *T. cruzi*, foram selecionados 39 insetos. Vale ressaltar que a caracterização foi realizada com os insetos mortos, sem o isolamento da cepa. Os resultados aqui apresentados serão, *a priori*, descritos para cada marcador separadamente.

4.4.1 Espaçador intergênico não transcrito do gene do mini exon

Todos os 39 triatomíneos utilizados amplificaram um fragmento de 350pb (figura 21) idêntico ao fragmento da cepa Colombiana, utilizada como controle nas reações de PCR, correspondente corresponde a *T. cruzi* grupo I.

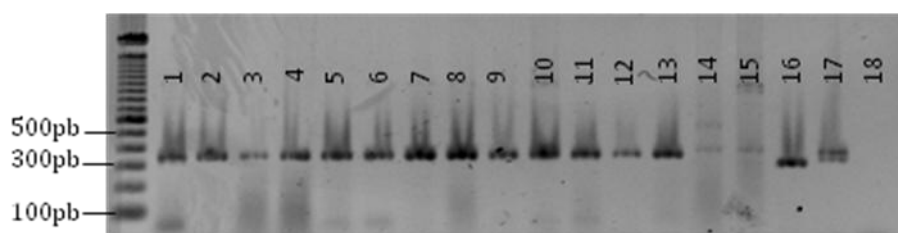


Figura 21: Amplificação via PCR com a utilização dos iniciadores TC, TCI e TCII para a caracterização de *Trypanosoma cruzi* de acordo com o novo consenso. As canaletas 1 a 15 representam *R. robustus* de diferentes palmeiras; canaleta 16 – *R. prolixus* infectado em laboratório com *T. cruzi* (cepa CL – representando *T. cruzi* II de acordo com ANONYMOUS, 1999); canaleta 17 – cepa Colombiana (representando *T. cruzi* I de acordo com ANONYMOUS, 1999); canaleta 18 – controle negativo da reação (sem adição de DNA). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

4.4.2 Domínio divergente D7 do locus 24a rRNA (LSU rDNA) e clonagem dos fragmentos

Foi possível observar diferentes padrões e diferentes tamanhos de fragmentos com a amplificação do domínio divergente D7 do locus 24a rRNA. No entanto, estas diferenças encontradas são tão sutis que torna-se impossível a distinção do tamanho destes fragmentos mesmo em comparação com o marcador de peso molecular Ladder 25pb.

Somente foi possível a identificação do tamanho dos fragmentos após a clonagem e sequenciamento dos mesmo. Os resultados demonstraram que, embora pequenas diferenças tenham sido observadas no gel de agarose, o tamanho do fragmento foi semelhante, apresentando 110pb. A grande maioria dos triatomíneos utilizados (n = 29) amplificaram o fragmento de 110pb, tamanho correspondente a TCI (LEWIS *et al.*, 2009). Além disso, oito triatomíneos amplificaram duas bandas bem próximas que, após a clonagem, foi possível verificar que estes fragmentos corresponderam a 110pb e 117pb, respectivamente (figura 22). Outros dois *R. robustus* amplificaram também duas bandas, porém de 110pb e 120pb. Estes resultados demonstraram a predominância de TCI nos triatomíneos analisados e a existência de infecção mista, com a presença de duas cepas diferentes no mesmo inseto vetor (TCI e TCII).

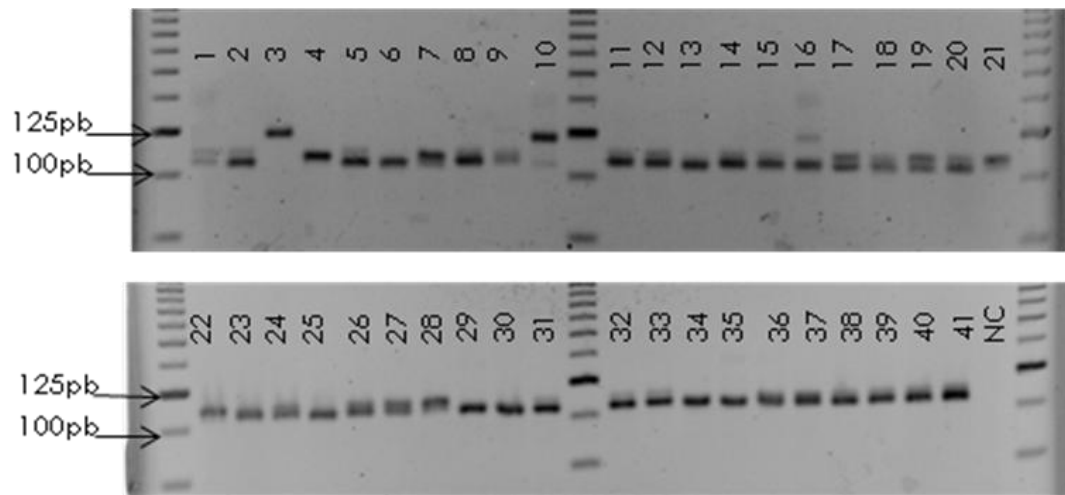


Figura 22: Amplificação do domínio divergente D7 do *locus* 24a rRNA (LSU rDNA) de *Trypanosoma cruzi* via PCR com os iniciadores D71/D72. As 21 canaletas representam parte dos *R. robustus* infectados com *T. cruzi*. Canaletas 1, 2, 17, 18, 19, 20, 21 e 27 amplificaram duas bandas muito próximas correspondentes a TCI e TCII (110 e 117pb). Canaleta 3: *R. prolixus* infectado no laboratório com a cepa CL (125pb); canaleta 4 – cepa colombiana (117pb); canaletas 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41: 110pb; canaleta 10 e 16: 110pb e 120pb; NC: controle negativo da reação (sem adição de DNA).

4.4.3 Glucose 6-fosfato Isomerase

Todos os triatomíneos analisados (n = 39) amplificaram um fragmento de 1264pb que corresponde a enzima Glucose-6-fostato Isomerase de *T. cruzi* (figura 23).

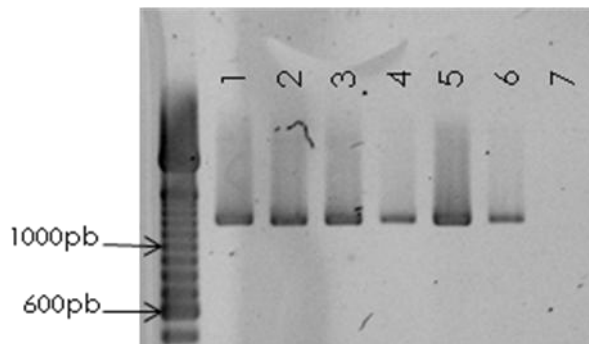


Figura 23: Amplificação da enzima Glucose-6-fosfato Isomerase de *Trypanosoma cruzi* via PCR com os iniciadores GPI_R e GPI_F. As canaletas 1 a 6 representam *R. robustus* infectados com *T. cruzi*; canaleta 7 – controle negativo da reação (sem adição de DN). Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

4.4.3.1 PCR-RFLP: digestão do produto amplificado da Glucose-6-fostato isomerase com enzima de restrição *HhaI*

A digestão do produto amplificado da enzima Glucose-6-fostato Isomerase de *T. cruzi* com a enzima de restrição *HhaI* pode apresentar quatro diferentes padrões de bandas, sendo idêntico os perfis de cepas de *T. cruzi* 2 e *T. cruzi* 3 e também entre as cepas *T. cruzi* 5 e *T. cruzi* 6 (figura 24). O tamanho dos fragmentos variam entre 253 a 817pb. Esses resultados podem ser visualizados na tabela 19 e na figura 24 que apresentam, não só os diferentes tamanhos de fragmentos, como também os subgrupos de *T. cruzi*.

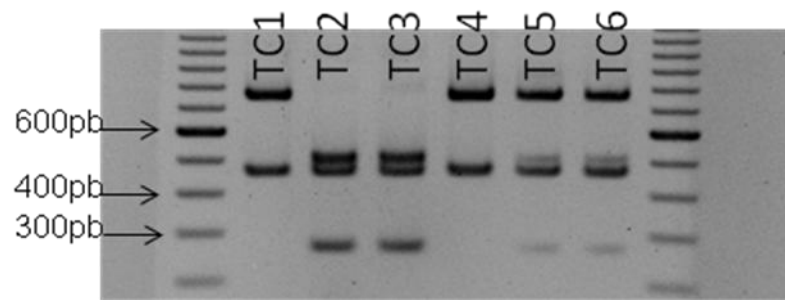


Figura 24: Diferentes subgrupos de *Trypanosoma cruzi* após a digestão do iniciador GPI com a enzima de restrição *HhaI*. TC1 – cepa X10/1 correspondente ao *T. cruzi* I; TC2 – cepa Can III cl1 (*T. cruzi* II); TC3 – cepa ESM cl3 (*T. cruzi* III); TC4 – cepa M5631 cl5 (*T. cruzi* IV); TC5 – cepa Sc43 cl1 (*T. cruzi* V) e TC6 – cepa CL Brener (*T. cruzi* VI).

Tabela 19: Diferentes tamanhos de fragmentos obtidos da enzima Glucose-6-fostato Isomerase de *Trypanosoma cruzi* após digestão com a enzima de restrição *HhaI* (valores expressos em pares de base, de acordo com LEWIS ET AL, 2009).

	TC I	TC II	TC III	TC IV	TC V	TC VI
GPI	1264	1264	1264	1264	1264	1264
<i>HhaI</i>	817 + 447	490+447+253	490+447+253	817+447	817 + 490 + 447 + 253	817 + 490 + 447 + 253

A figura 25 apresenta diferentes padrões de bandas que foram obtidos após a digestão da Glucose-6-fostato Isomerase com a enzima de restrição *HhaI* em uma amostra dos *R. robustus* analisados. Embora o perfil apresentado na canaleta 1 seja compatível com *T. cruzi* 5 ou *T. cruzi* 6, após a clonagem dos fragmentos do Domínio divergente D7 do locus 24 α rRNA, o resultado demonstrou a presença de infecção mista por *T. cruzi* em 10 triatomíneos, com a ocorrência dos subgrupos TCI e TCII. Outros 17 *R. robustus* apresentaram dois fragmentos de 817 e 447pb (canaletas 5 e 9), padrão característico de *T. cruzi* 1 e 12 triatomíneos apresentaram além dos fragmentos de 817 e 447pb outros dois fragmentos de tamanho inferior a 253pb, indicando ser uma variante de cepas de *T. cruzi* I (figura 25, canaletas

2, 3, 5, 6, 7 e 8).

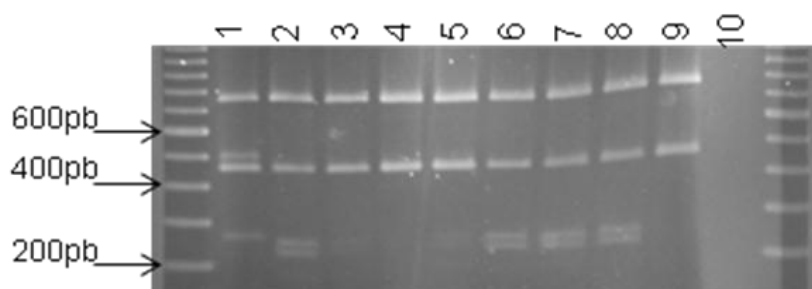


Figura 25: Exemplo de diferentes padrões encontrados nos triatomíneos utilizados para caracterização molecular de *Trypanosoma cruzi* após a digestão do iniciador GPI com a enzima de restrição *HhaI*. Canaleta 1 – inseto com infecção mista (presença de *T. cruzi* 1 e *T. cruzi* 2 no mesmo inseto); canaletas 2, 3, 5, 6, 7 e 8 - variante do subgrupo *T. cruzi* 1 (presença de duas bandas inferiores a 253pb); canaletas 4 – *T. cruzi* 1; canaleta 10 – controle negativo da reação (sem adição de DNA).

4.4.4 Gene HSP60 - Heat Shock Protein

Todos os triatomíneos analisados amplificaram um fragmento de 432-462pb correspondente ao gene HSP60 (*Heat Shock Protein*) de *T. cruzi* (figura 26). Os iniciadores utilizados para este gene não amplificaram em triatomíneos sem infecção por *T. cruzi* (dados não mostrados).

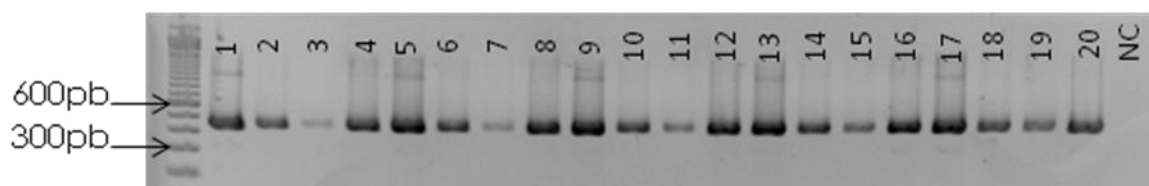


Figura 26: Amplificação do gene HSP60 (*Heat Shock Protein*) de *Trypanosoma cruzi*. As canaletas 1 a 20 referem-se a *R. robustus* infectados por *T. cruzi*; NC – controle negativo da reação (sem adição de DNA).

4.4.4.1 PCR-RFLP: digestão do produto amplificado do gene HSP60 (*Heat Shock Protein*) com enzima de restrição EcoRV

A digestão do produto amplificado do gene HSP60 com a enzima de restrição EcoRV pode apresentar três padrões diferentes de bandas, sendo idêntico o padrão de cepas de *T. cruzi* 1, *T. cruzi* 2 e *T. cruzi* 3, enquanto o perfil obtido com as cepas de *T. cruzi* 5 e *T. cruzi* 6 também são iguais. A tabela 20 apresenta o tamanho dos fragmentos esperados do gene HSP60 após a digestão com a enzima EcoRV.

Tabela 20: Diferentes padrões obtidos após digestão do gene HSP60 de *Trypanosoma cruzi* com a enzima de restrição EcoRV.

	TC I	TC II	TC III	TC IV	TC V	TC VI
HSP60	432-462	432-462	432-462	432-462	432-462	432-462
EcoRV	432-462	432-462	432-462	314 + 148-118	432-462 + 314 + 148-118	432-462 + 314 + 148-118

Não houve sítio de reconhecimento da enzima EcoRV nos triatomíneos infectados com *T. cruzi* utilizados neste estudo. Assim, após a RFLP, todos os triatomíneos analisados apresentaram uma única banda de 432-462pb. Este padrão encontrado é esperado para cepas de *T. cruzi* dos subgrupos 1, 2 ou 3.

Após a análise dos resultados obtidos pelo triplo ensaio para caracterização de *T. cruzi* sugerido pelo novo consenso (ZINGALES *et al.*, 2009), foi possível identificar que as amostras de *T. cruzi* presentes no tubo digestivo de *R. robustus* aqui analisados pertencem a dois subgrupos. Foram caracterizados 29 isolados pertencentes ao subgrupo *T. cruzi* 1, 10 triatomíneos apresentaram infecção dupla, com a presença de *T. cruzi* 1 e *T. cruzi* 2. Além disso, foi possível detectar em 12 *T. cruzi* 1, um padrão diferente de bandas após a PCR/RFLP (GPI/HhaI), indicando a existência de subgrupos dentro de *T. cruzi* 1.

4.5 Fauna associada às palmeiras

Durante todo o processo de coleta dos triatomíneos e dissecção das palmeiras, diversos animais vertebrados e invertebrados foram observados, sendo muitos destes considerados como possíveis fontes de alimentação dos triatomíneos. Muito cuidado foi necessário para realizar a coleta minuciosa dos triatomíneos, afinal a diversidade de animais que habitam uma palmeira é imensa. Foram encontrados animais de diferentes filos taxonômicos e diferentes portes. Dentre os animais documentados estão: *Tamandua tetradactyla* (Xenarthra); *Didelphis marsupialis* (Marsupialia), algumas espécies de roedores, lagartos como *Mabuya bistriata*, muitos ninhos de aves abandonados e uma grande diversidade de anfíbios (figura 27). Além disso, foi possível observar uma variedade de animais invertebrados, como aranhas, escorpiões, cupins, formigas e baratas que também habitavam as palmeiras com os triatomíneos (figura 28).



Figura 27: Fauna de vertebrados associada às palmeiras na região do médio Tapajós, Amazônia brasileira. A, B, C, D e E: anfíbios; F, G, H, I e J: reptéis; K, L e M: roedores; N: morcego (Quiroptera); O: *D. marsupialis* (Marsupialia) e P: *T. tetradactyla* (Xenarthra) (Fotos: Guy Mejía e Fernando B. S. Dias).



Figura 28: Fauna de invertebrados associada às palmeiras na região do médio Tapajós, Amazônia brasileira. A, B, C, D e E: Aracnídeos; F: lacraia (Quilopoda); G: escorpião-preto (*Tityus* sp) (Fotos: Fernando B. S. Dias).

4.6 Identificação das fontes alimentares dos triatomíneos

Foi realizado o sequenciamento de 504 triatomíneos. Destes, 313 não amplificaram o fragmento de 305pb correspondente a região do Citocromo B mtDNA. Outros 238 triatomíneos não foram analisados devido a falta de conteúdo estomacal/intestinal nos insetos.

As sequências obtidas dos 191 triatomíneos analisados demonstram que *Rhodnius* spp estão associados a diferentes animais nas palmeiras da região do médio Tapajós. Os triatomíneos alimentaram em três classes diferentes de animais (mamíferos, aves e répteis). Dentro da classe Mammalia, foram identificadas quatro ordens de animais – Primates, Didelphimorpha, Rodentia e Xenarthra (Edentata), distribuídos em 13 gêneros diferentes. Já na classe das aves, foram identificados três gêneros diferentes, enquanto na classe Reptilia, apenas um gênero. A figura 29 apresenta a distribuição geográfica de alguns mamíferos que foram identificados como hospedeiros para os triatomíneos nas comunidades trabalhadas, a partir da análise de conteúdo estomacal/intestinal dos *Rhodnius* spp.

A tabela 21 apresenta as espécies de animais identificadas em comparação com o banco de dados disponível (GenBank – BLAST)

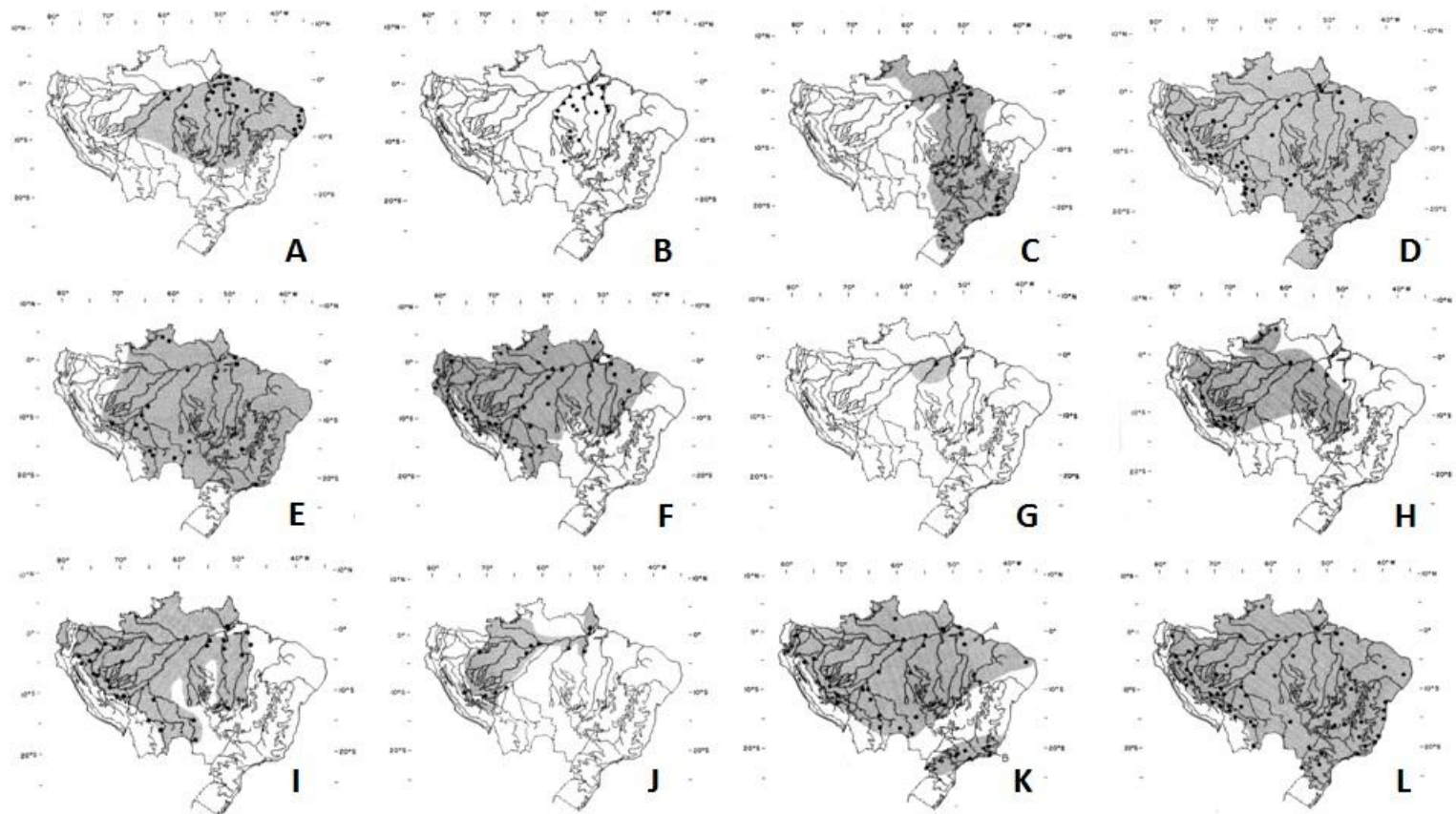


Figura 29: Mapa de distribuição de alguns mamíferos identificados pelo conteúdo intestinal dos triatomíneos na amplificação de fragmento do Citocromo B mitocondrial, segundo EISENBERG & REDFORD (1989). A) *Alouatta belzebul*; B) *Callicebus moloch*; C) *Caluromys philander*; D) *Cebus apella*; E) *Coendou prehensilis*; F) *Didelphis marsupialis*; G) *Lonchothrix emiliae*; H) *Mesomys hispidus*; I) *Oecomys bicolor*; J) *Oecomys roberti* (círculos); K) *Philander opossum*; L) *Tamandua tetradactyla*.

Tabela 21: Relação das fontes de alimentação de vertebrados identificadas no conteúdo intestinal dos triatomíneos.

		Espécie	Nome vulgar	Araipá	Nova Estrela	São Tomé	Total
Mammalia	Primate	<i>Allouatta belzebul</i>	Guariba-de-mãos-ruivas	1	4	4	9
		<i>Callicebus moloch</i>	Sauá, saá, zogue-zogue	0	0	1	1
		<i>Cebus apella</i>	Macaco prego	0	0	6	6
		<i>Cebus cay</i>	Macaco prego	0	0	1	1
	Didelphimorpha	<i>Caluromys philander</i>	Cuíca	0	1	0	1
		<i>Didelphis marsupialis</i>	Gambá, mucura	0	5	8	13
		<i>Philander opossum</i>	Mucura quatro olhos	1	0	0	1
		<i>Coendou prehensilis</i>	Cuendu, Ouriço-caxeiro	1	0	15	16
	Rodentia	<i>Lonchothrix emiliae</i>	Rato de espinho	0	0	1	1
		<i>Mesomys hispidus</i>	Rato de espinho	0	0	8	8
		<i>Nectomys squamipes</i>	Rato d'água	0	1	0	1
		<i>Oecomys bicolor</i>	Rato do mato	0	4	7	11
		<i>Oecomys roberti</i>	Rato do mato	0	9	9	18
		<i>Rattus rattus</i>	Rato	1	0	1	2

(continuação...)

Tabela 21: Relação das fontes de alimentação de vertebrados identificadas no conteúdo intestinal dos triatomíneos

		Espécie	Nome vulgar	Araipá	Nova Estrela	São Tomé	Total
Mammalia	Xenarthra	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Tamanduá de coleite	0	9	62	71
		<i>Cathartes aura</i>	Urubu da cabeça vermelha	0	0	1	1
Aves		<i>Dendrexetastes rufigula</i>	Arapaçu galinha	1	13	2	16
		<i>Xiphorhyncus picus</i>	Arapaçu de bico vermelho	1	1	4	6
Reptilia	Squamata	<i>Mabuya bistrata</i>	Lagarto liso	1	0	5	6
		<i>Mabuya nigropunctata</i>	Lagarto liso	0	1	0	1

4.7 Cartografia da área de estudo

A análise dos dados de campo destaca São Tomé das demais localidades em relação à infestação das palmeiras, densidade de triatomíneos, infecção pelo *T. cruzi* e número de insetos alimentados (tabela 22).

Dados dos Projetos Prodes e TerraClass demonstraram a existência de um processo de desmatamento na região de estudo no período de 2000-2009 (figura 30) e, considerando as três comunidades, é possível observar que São Tomé é a comunidade mais preservada, possuindo mais da metade da área trabalhada (considerando um raio de 500m e de 1km ao entorno das palmeiras dissecadas) de floresta primária (tabelas 23 e 24; figuras 31 e 32). Em Nova Estrela, entre as vicinais da Transamazônica há também grandes áreas de floresta primária, no entanto, o acesso a estes locais é extremamente difícil, impossibilitando a dissecção de palmeiras nesta unidade paisagística. Desta forma, pode-se observar nas figuras 33 e 34, que em Nova Estrela as coletas concentraram-se em duas regiões, predominando áreas de pastagens e floresta secundária (tabelas 23 e 24). Por outro lado, apesar de Araipá ser a comunidade com a maior área de desmatamento da região, o *buffer* criado, tanto com 500m, quanto para 1km ao entorno das palmeiras revelaram cerca de 25% de áreas preservadas (tabelas 23 e 24; figura 31 e 32). Em Araipá existe também uma grande área de floresta secundária que, caso não seja praticado o corte e a queima, poderá haver alteração do ambiente, com a reconstituição da mata.

Os resultados obtidos pela análise de Kernel demonstraram a existência de três aglomerados (*hotspot*) correspondentes às áreas de maior infestação de triatomíneos em São Tomé, sendo uma destas com grande concentração de palmeiras infestadas. Em Nova Estrela, os resultados apresentam apenas um aglomerado com maior intensidade de infestação, assim como em Araipá (figura 33). Nesta última comunidade, o *hotspot* revelado pela análise de Kernel foi devido a presença de uma palmeira que foram coletados 44 triatomíneos (figura 34).

Ao avaliar a infecção dos triatomíneos pelo *T. cruzi* também utilizando Kernel, as figuras 35 e 36 mostraram a presença de duas regiões com maior concentração de insetos infectados em São Tomé e uma região em Nova Estrela.

Os resultados quantitativos revelados pela análise do Interpolador de Médias demonstraram que São Tomé é a comunidade com a maior densidade triatomínica. Nesta comunidade, a intensidade da densidade de barbeiros é presente em quase toda a comunidade. Em Nova Estrela, a região que apresentou maior infestação das palmeiras na análise de Kernel também foi a área com o maior número de densidade de triatomíneos (figura 37).

A análise de infecção de *T. cruzi* pelo Interpolador de Médias destacou claramente São Tomé das demais comunidades, apresentando palmeiras com até 30 triatomíneos infectados (figura 38).

Tabela 22: Dados de infestação das palmeiras, infecção dos triatomíneos por *Trypanosoma cruzi*, densidade populacional, número de triatomíneos alimentados e estimativa do processo de antropização nas três comunidades estudadas.

	Infestação P/I (%)*			Infecção			Densidade**			Número de insetos alimentados			Processo de Antropização
	2008	2009	Total	2008	2009	Total	2008	2009	Total	2008	2009	Total	
Araipá	20/6 (30%)	18/4 (22,2%)	38/10 (26,3%)	-	-	-	66 (92,9%)(13A/53N)	5 (7,1%) (2A/3N)	71 (15A/56N)	15	2	17	+++
Nova Estrela	25/13 (52%)	-	25/13 (52%)	16 (10,1%)	0	16 (10,1%)	158 (33A/125N)	-	158 (33A/125N)	94	-	94	++
São Tomé	31/22 (71%)	42/28 (66,7%)	73/50 (68,5%)	16 (8%)	93 (29,6%)	109 (21,2%)	199 (38,8%) (19A/180N)	314 (53A/261N)	513 (61,2%) (72A/441N)	43	45	88	+

*P/I (%): palmeiras pesquisadas/palmeiras infestadas (%)

**A/N: Número de adultos e número de ninfas

Tabela 23: Porcentagem de floresta primária e floresta secundária nas três comunidades, considerando uma área com um raio de 500m no entorno das palmeiras dissecadas.

	Agrovila-Araipá	Nova Estrela	São Tomé
Floresta Primária	24,68%	5,30%	53,51%
Floresta secundária	23,63%	10,24%	10,10%
Outros (hidrografia, pastos, etc)	51,69%	84,46%	36,39%
Total	100%	100%	100%

Tabela 24: Porcentagem de floresta primária e floresta secundária nas três comunidades, considerando uma área com um raio de 1km no entorno das palmeiras dissecadas.

	Agrovila-Araipá	Nova Estrela	São Tomé
Floresta Primária	28,04%	21,15%	53,76%
Floresta secundária	21,30%	9,04%	7,68%
Outros (hidrografia, pastos, etc)	50,66%	69,81	38,56%
Total	100%	100%	100%

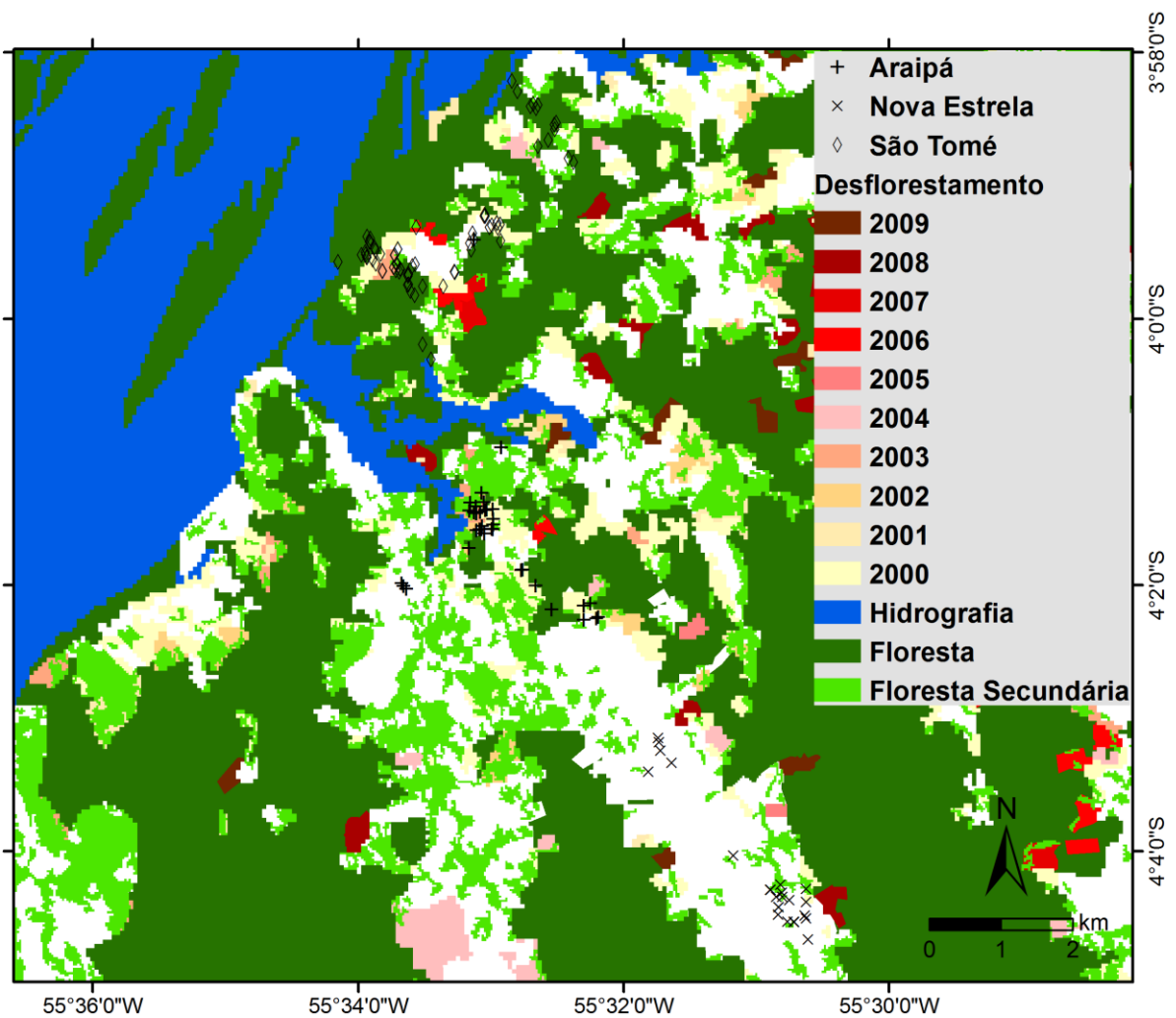


Figura 30: Mapa da cobertura vegetal mostrando as florestas primárias e secundárias, e os desflorestamentos por ano de 2000-2009. Foram utilizados as classificações do Projeto Prodes e Projeto TerraClass, e os pontos coletados em campo com o auxílio de GPS. As áreas em branco no mapa representam as pastagens e estradas

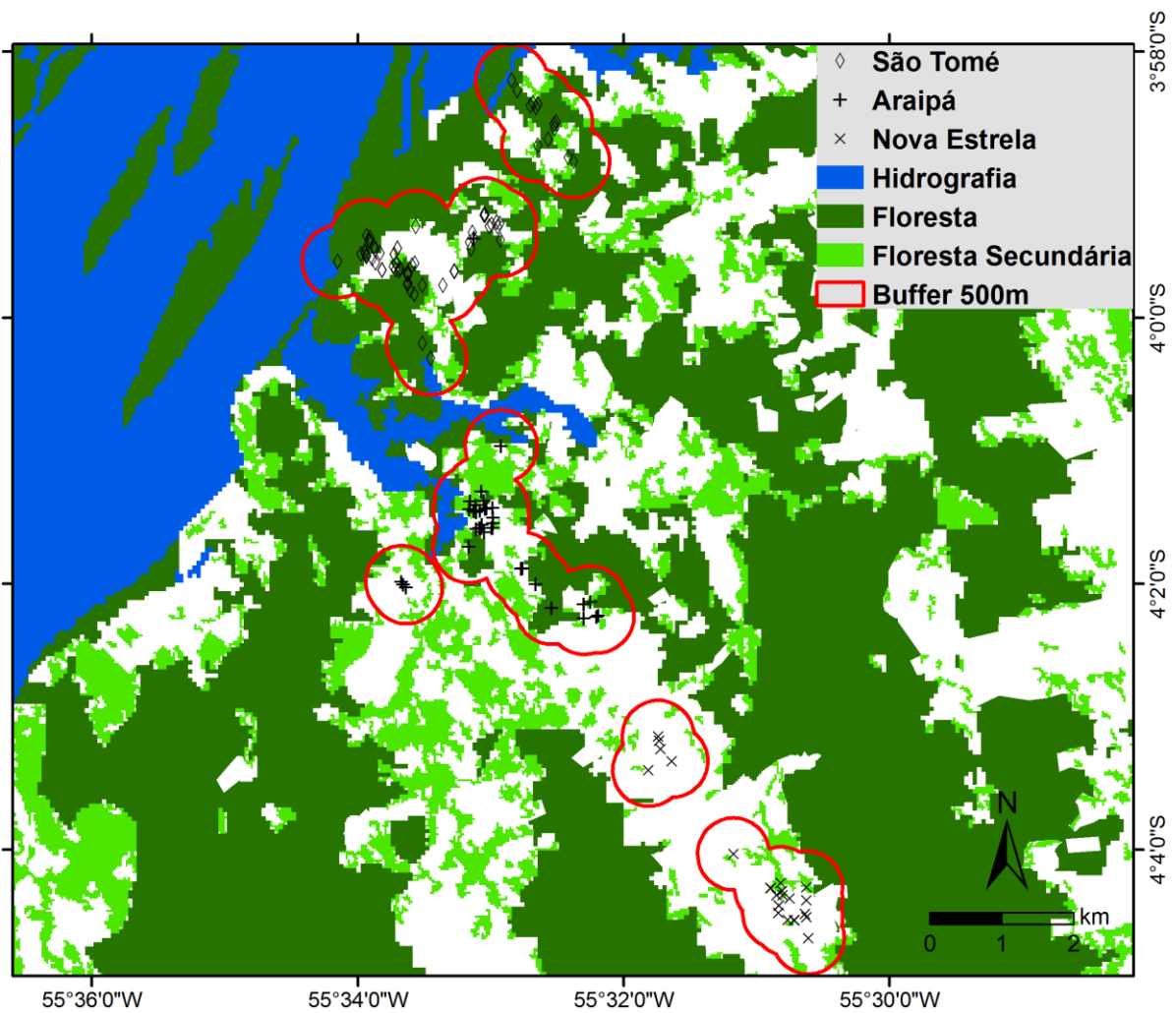


Figura 31: Distribuição das espécies de palmeiras dissecadas nas três comunidades. Foi aplicada uma distância de 500m no entorno das palmeiras trabalhadas ("buffer", representado pelas linhas vermelhas) para a quantificação de floresta primária e secundária em cada comunidade. As áreas em branco no mapa representam as pastagens e estradas.

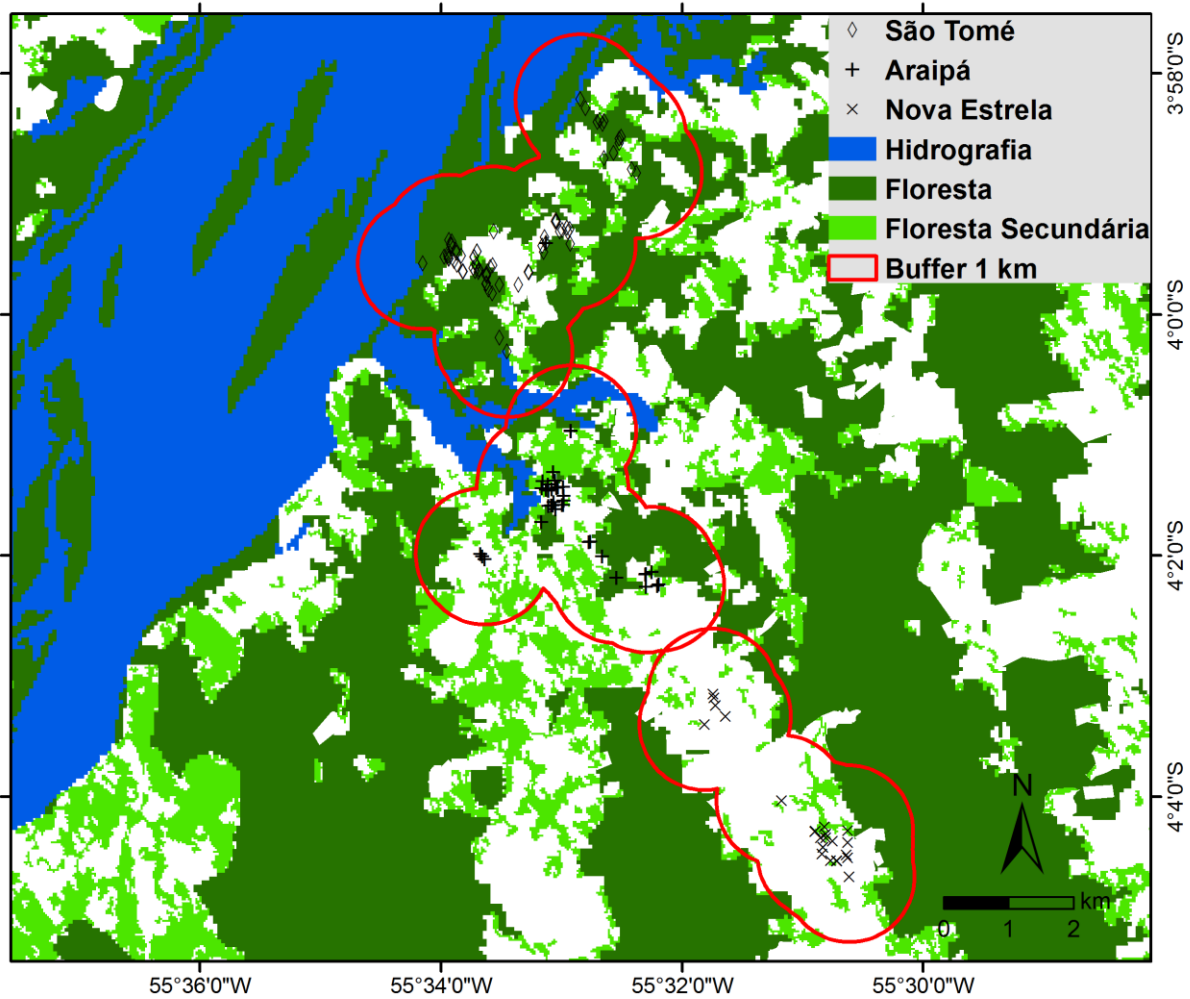


Figura 32: Distribuição das espécies de palmeiras dissecadas nas três comunidades. Foi aplicada uma distância de 1km no entorno das palmeiras trabalhadas ("buffer", representado pelas linhas vermelhas) para a quantificação de floresta primária e secundária em cada comunidade. As áreas em branco no mapa representam as pastagens e estradas.

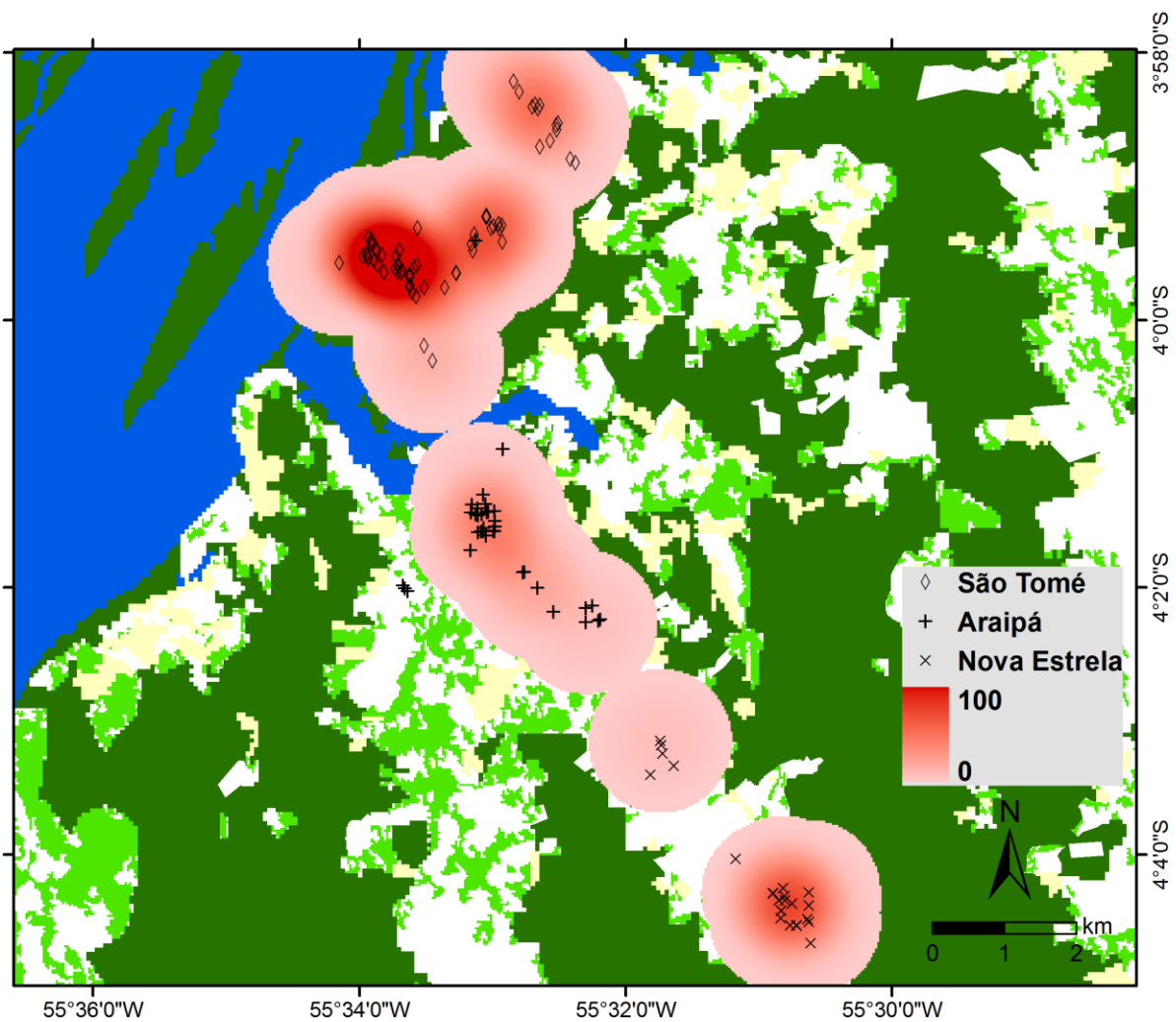


Figura 33: Mapa da infestação das palmeiras pelos triatomíneos mostrando os “hotspots”. As áreas em vermelho no mapa apresentam as maiores concentrações de infestação. A comunidade de São Tomé apresenta a maior concentração de infestação, seguida pela comunidade Nova Estrela e Araipá. Foi aplicado o kernel nos pontos coletados em campo com o auxílio de GPS com relação a presença ou ausência de infestação.

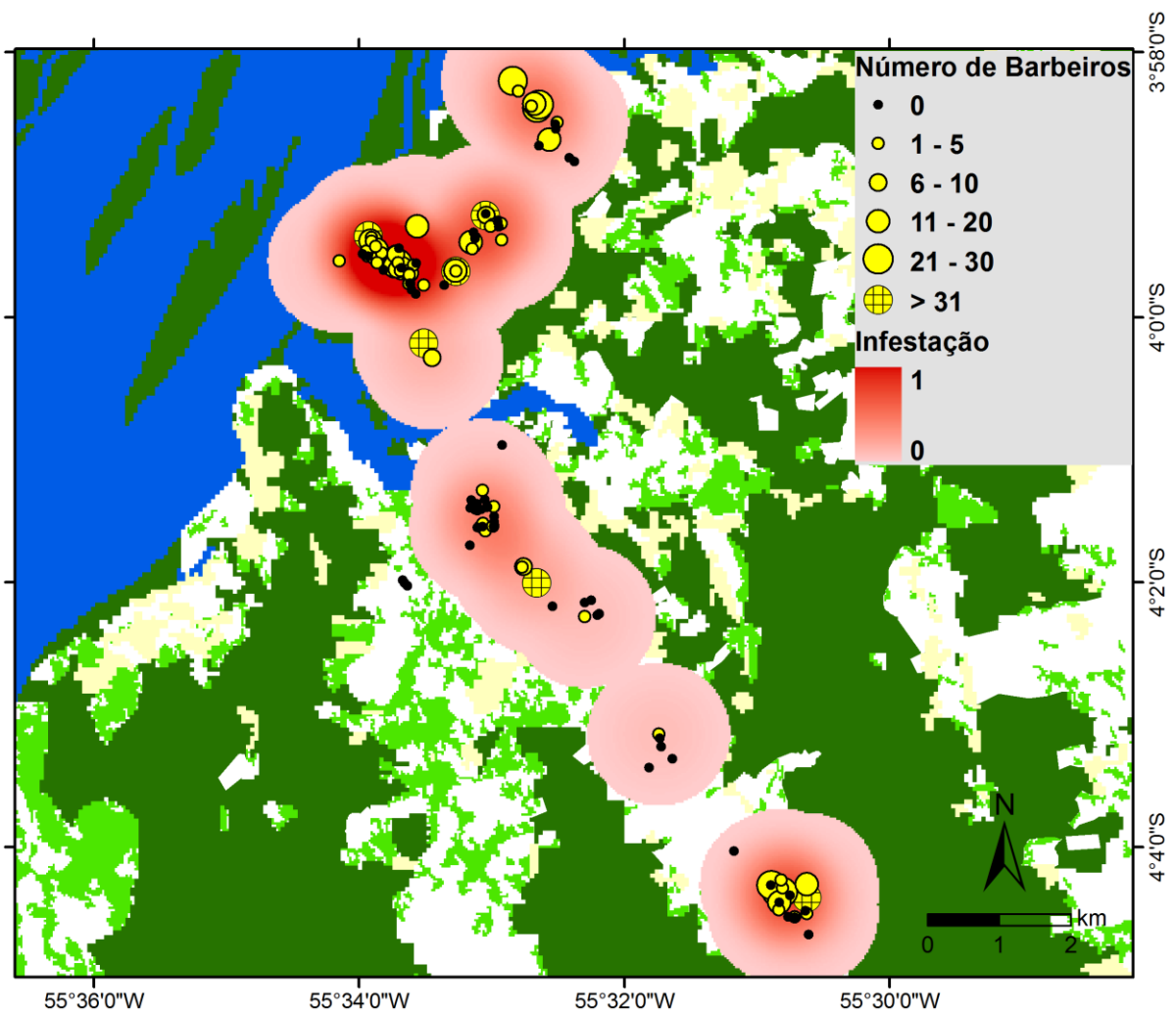


Figura 34: Mapa da infestação das palmeiras pelos triatomíneos mostrando dentro dos “hotspots” a densidade dos triatomíneos. As áreas em vermelho no mapa apresentam as maiores concentrações de infestação. A comunidade de São Tomé apresenta a maior concentração de infestação, seguida pela comunidade Nova Estrela e Araipá. Foi aplicado o kernel nos pontos coletados em campo com o auxílio de GPS com relação a presença ou ausência de infestação.

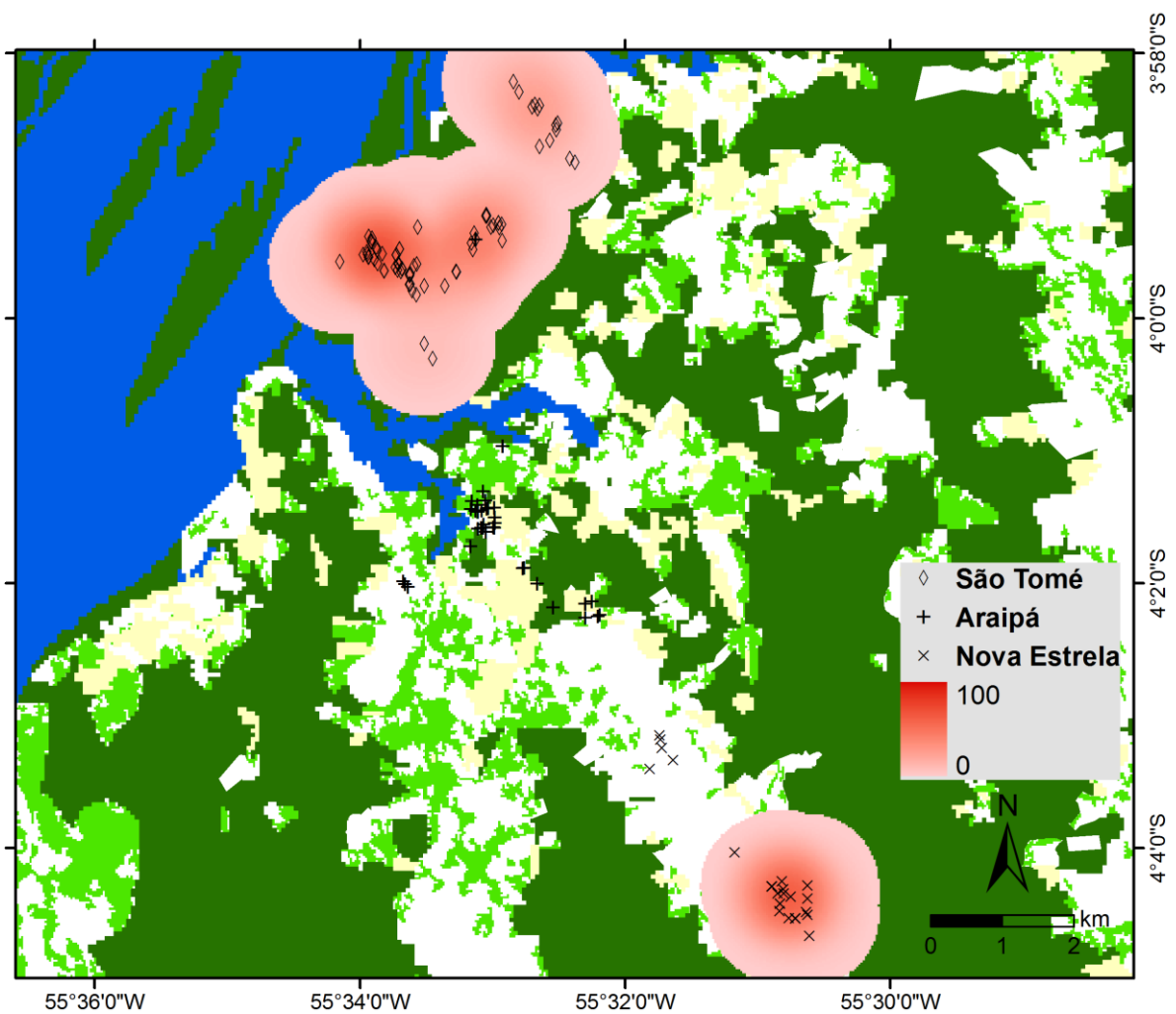


Figura 35: Mapa da distribuição espacial de infecção dos triatomíneos pelo *Trypanosoma cruzi* mostrando os “hotspot”. As áreas em vermelho no mapa apresentam as maiores concentrações de triatomíneos infectados. A comunidade de São Tomé apresenta a maior concentração de infecção, seguida pela comunidade de Nova Estrela. Foi aplicado o kernel nos pontos coletados em campo com o auxílio de GPS com relação a presença ou ausência de *T. cruzi*.

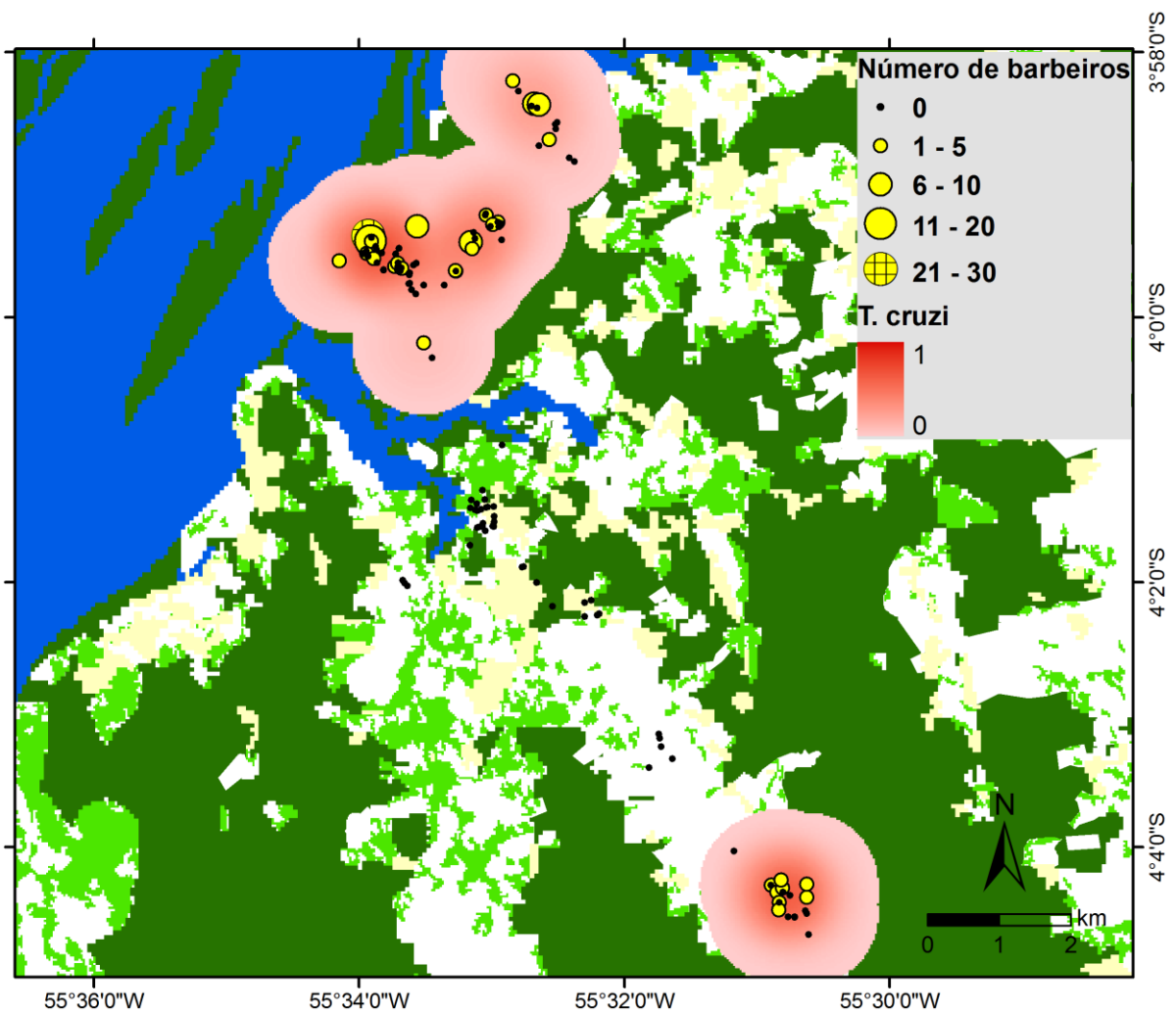


Figura 36: Mapa da distribuição espacial de infecção dos triatomíneos pelo *Trypanosoma cruzi* mostrando dentro dos “hotspot” a densidade de triatomíneos infectados. As áreas em vermelho no mapa apresentam as maiores concentrações dos insetos infectados. A comunidade de São Tomé apresenta a maior concentração de infecção, seguida pela comunidade de Nova Estrela. Foi aplicado o kernel nos pontos coletados em campo com o auxílio de GPS com relação a presença ou ausência de *T. cruzi*.

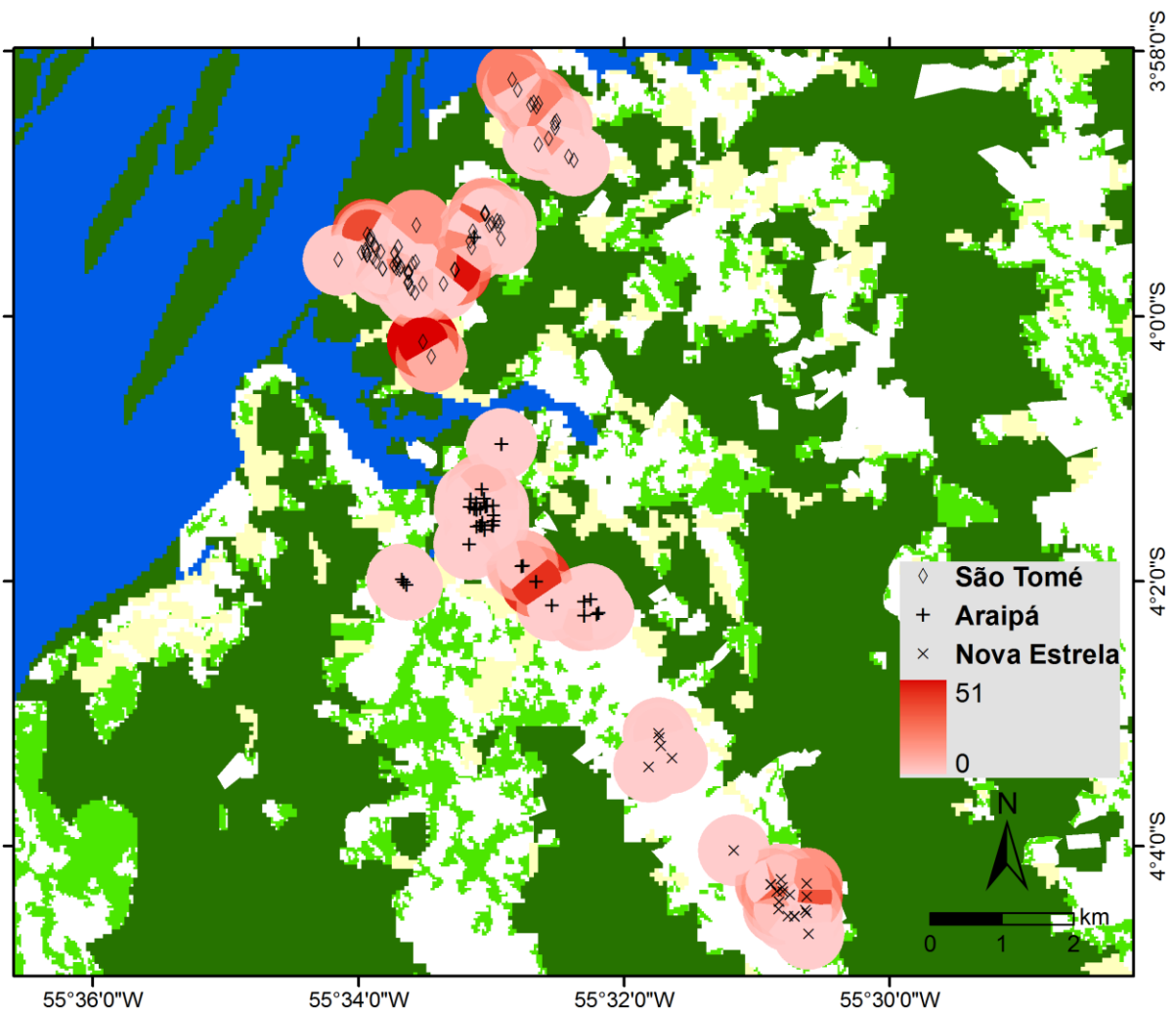


Figura 37: Mapa da distribuição espacial da densidade de triatomíneos mostrando os "hotspot". As áreas em vermelho no mapa apresentam as maiores densidades de barbeiros. Foi aplicado o Interpolador de Médias nos pontos coletados em campo com o auxílio de GPS com relação a quantidade de triatomíneos em um raio de 500 metros.

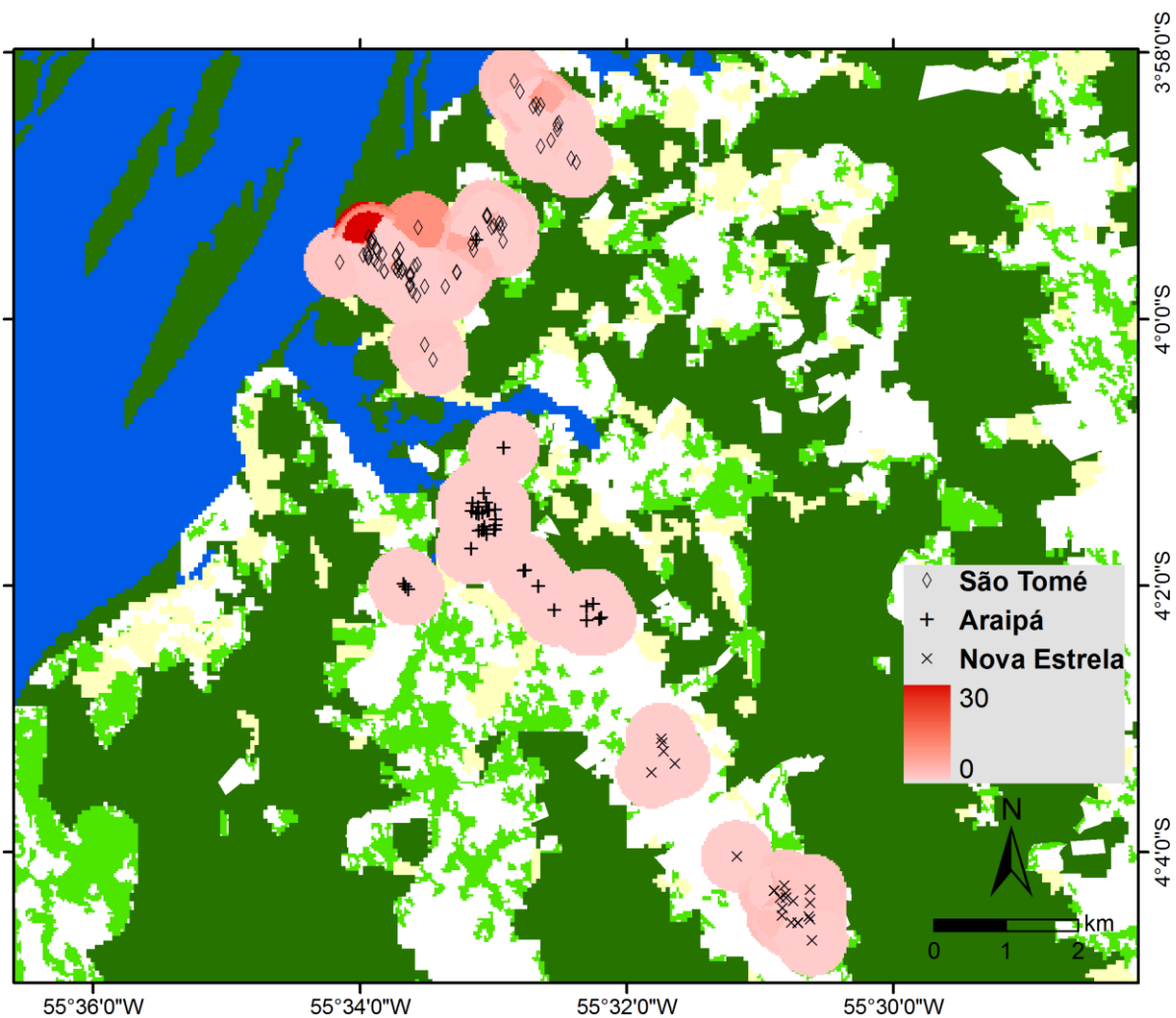


Figura 38: Mapa da distribuição espacial da densidade de triatomíneos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* mostrando os "hotspot". As áreas em vermelho no mapa apresentam as maiores densidades de barbeiros infectados. Foi aplicado o Interpolador de Médias nos pontos coletados em campo com o auxílio de GPS com relação a quantidade de triatomíneos infectados em um raio de 500 metros.

5.1 Área de estudo, infestação das palmeiras e densidade triatomínica

A Amazônia durante muito tempo foi considerada como área sem risco de transmissão do *T. cruzi*. No entanto, a partir da década de 60, com a construção da rodovia Transamazônica e da BR-163 (Cuiabá-Santarém), a migração de pessoas, principalmente, de nordestinos para a região amazônica brasileira cresceu de forma alarmante. Uma das consequências geradas com o aumento da população amazônica foi e está sendo a alteração ambiental e a emergência (ou re-emergência) de doenças. Foi somente após 1969 que as atenções foram voltadas para a Amazônia, com o relato do primeiro caso agudo da Tripanossomíase Americana em Belém, Pará (SHAW *et al.*, 1969). Não obstante, no final do século XX e início do XXI, novas formas de infecção pelo *T. cruzi* associadas à presença do triatomíneo nas casas sem colonização e a transmissão via oral, por alimentos contaminados tem sido relatadas na região amazônica (ROMAÑA, 2007; NÓBREGA *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2009). Deve-se ressaltar que o desmatamento para a implantação da agropecuária extensiva, de monocultivos, a exploração madeireira, a colonização agrária e as migrações de populações associadas ao processo de urbanização na região são importantes fatores para o surgimento de doenças (ROMAÑA, 2007). Dados do Projeto Prodes – Monitoramento da Floresta Amazônica brasileira por satélite, demonstraram como este bioma tem sofrido sérios problemas devido a ação antrópica. A taxa média de desmatamento desde 1988 somente no Estado do Pará foi aproximadamente 5.600Km².

Grande parte do território amazônico é composto por comunidades e áreas rurais, sendo a agricultura de subsistência a principal fonte de alimentação destas pessoas. Nestas áreas, a prática do cultivo após a queima é constante. Uma consequência desta prática é a proliferação de palmeiras, que são ecótopos para triatomíneos, principalmente do gênero *Rhodnius*. TEIXEIRA *et al.* (2001) demonstraram que as palmeiras produzem cerca de 15 toneladas de matéria orgânica seca, valor muito superior às outras espécies de árvores. Além disso, as espécies de palmeiras se recuperaram muito mais rapidamente após o fogo que as demais espécies

vegetais presentes na floresta. A prática do fogo foi observada nas três comunidades aqui trabalhadas. Em regiões já desmatadas, que servem de pastagens para o gado, a única espécie de médio e/ou grande porte encontrada eram as palmeiras. Nesta unidade paisagística, em alguns casos houve certa resistência dos proprietários para a dissecação das palmeiras e coleta dos triatomíneos. Tal resistência foi devida ao fato das palmeiras serem a única fonte de sombra para o gado.

Embora geograficamente as três comunidades sejam relativamente próximas, cada uma possui um histórico diferente. São Tomé, comunidade ribeirinha ao Rio Tapajós, é a mais antiga com pelo menos 64 anos de existência. Faz parte do município de Aveiro e sua população é quase que exclusivamente de Paraenses da região do Tapajós. As mulheres se ocupam das atividades de casa, enquanto os homens trabalham com a pesca e a agricultura familiar (BERÇOT, 2009). A porção ribeirinha de São Tomé é composta basicamente de pastagens, no entanto, a presença de fragmentos florestais no interior da comunidade é maior em relação às outras comunidades. Por ser mais antiga, São Tomé é a comunidade que aparenta maior estabilidade ambiental, com menor pressão antrópica sobre a paisagem.

Nova Estrela, uma vicinal da Transamazônica, faz parte do município de Rurópolis. É um típico assentamento de imigrantes, principalmente nordestinos, sobretudo do Maranhão. Esta comunidade não possui contato com o Rio Tapajós e assim como em São Tomé, as atividades dos moradores são muito parecidas, exceto a pesca que não é exercida em Nova Estrela. Acredita-se que a comunidade tenha se estabelecido entre as décadas de 70 e 80, período de implantação da rodovia Transamazônica (BERÇOT, 2009). Provavelmente devido a construção da rodovia Transamazônica e da BR-163, associada ao processo de expansão territorial e ocupação do solo, fizeram com que o ambiente de Nova Estrela fosse fortemente transformado, com predominância de pastagens, capoeiras e pequenos fragmentos de florestas secundárias nos dias atuais.

A terceira comunidade, Agrovila-Araipá, ribeirinha do lago Araipá, é composta em sua maioria de paraenses e maranhenses. Os homens se ocupam do sustento familiar, cultivando, principalmente, arroz, feijão, mandioca, além da pesca. Araipá é a comunidade com maior pressão humana sobre o ambiente. O paisagem em Araipá é fortemente antropizada, basicamente com a predominância de pastagens.

A copa das palmeiras formam um ecossistema muito particular que servem de abrigo e proteção para uma enorme gama de animais vertebrados, os quais são fontes de alimentação para os vetores da doença de Chagas (DIAS *et al.*, 2008). Deve-se ressaltar também que as diversas espécies de palmeiras são uma importante fonte de recurso econômico para os moradores da Amazônia brasileira e de outras regiões do Brasil. Delas, os moradores podem extrair as folhas que servirão de telhado para as casas e/ou confecção de artesanatos, os frutos e o palmito para alimentação, além do estipe e das sementes. Nos últimos anos, diversas publicações têm demonstrado a ocorrência de vários surtos agudos da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Na maioria das vezes, estes casos, isolados ou em grupo, têm como causa a infecção via oral, associada a ingestão de suco de açaí. A palmeira *E. oleracea* possui grande distribuição na Amazônia brasileira (LORENZI *et al.*, 1996) e seus frutos são muito utilizados na alimentação. Até o momento não há indícios de infestação desta espécie de palmeira por triatomíneos. Porém os açaizeiros ocorrem em simpatria com outras espécies de palmeiras, como as do gênero *Attalea*, considerada ecótopo de muitas espécies de triatomíneos. Vale a pena ressaltar uma pesquisa realizada por VALENTE *et al.* (2009) sobre um surto de doença de Chagas aguda, no município de Mazagão, Amapá. Neste estudo, para a coleta de triatomíneos, foi instalada armadilha luminosa em uma cozinha comunitária de processamento do açaí, local onde foram coletados espécimes de *Rhodnius* infectados, atraídos pela luz. Este exemplo demonstra claramente o fator de risco de infecção pelo *T. cruzi* em comunidades que utilizam os frutos do açaí e fazem o processamento de forma artesanal sem qualquer tipo de cuidado. Assim, a prática extrativista

das palmeiras deve ser considerada um risco de infecção pelo *T. cruzi* aos humanos, como também já demonstrado por COURA *et al.* (1994) nas proximidades do Rio Negro, município de Barcelos, Amazonas. Esses autores descreveram o ataque às populações humanas por triatomíneos, em uma região onde há a predominância da palmeira *L. piassaba*, ecótopo natural de *R. brethesi*, de onde os moradores extraem as fibras da palmeira. Interessante que a relação de extrativismo humano-palmeiras, principalmente entre *L. piassaba* e *R. brethesi* na mesma região descrita por COURA *et al.* (1994), já havia sido relatada desde os tempos da descoberta desta espécie de triatomíneo (MATTA, 1922). De 1991 até 1997, três estudos de soroprevalência humana foram realizados na região, e os resultados demonstraram inicialmente, na região do Rio Negro, uma alta prevalência, em torno dos 13% (COURA *et al.*, 1999).

A Amazônia é considerada o bioma com a maior diversidade de animais do planeta. Com toda essa biodiversidade e exuberância das florestas, trabalhar nesta região exige cuidado e atenção. Durante o processo de dissecação das palmeiras foram observados uma infinidade de animais vertebrados e invertebrados co-habitando com os triatomíneos. Muitos destes nocivos e perigosos para o ser humano, como aranhas, escorpiões e cobras. Embora menos nocivo, outro fato interessante foi o encontro de um *Didelphis marsupialis* Linnaeus, 1758 em uma palmeira inajá em São Tomé. Neste animal ocorre o processo de metaciclogênese do *T. cruzi* nas glândulas anais, o que pode ser um fator de risco de infecção no momento da dissecação das palmeiras e busca ativa dos triatomíneos.

Os resultados de infestação demonstraram, de forma global, que mais da metade das palmeiras estavam infestadas por triatomíneos. No entanto, a comunidade com as menores taxas de infestação foi em Araipá. Praticamente a totalidade das palmeiras pesquisadas em Araipá encontravam-se em pastagens ou em capoeiras jovens e apresentavam marcas de fogo no estipe e próximo a copa. O uso do fogo pelos moradores é constante, o que possivelmente interferiu nos valores de infestação e, até mesmo, densidade triatomínica. Embora também foi possível observar

marcas de fogo nas palmeiras de Nova Estrela, a paisagem desta comunidade aparenta ser menos antropizada, com maior presença de capoeiras e fauna de animais vertebrados associada às palmeiras mais diversificada. Nova Estrela foi a única comunidade que o trabalho foi realizado somente em 2008, época coincidente ao final do período seco. Pela falta de infraestrutura local e dificuldade de locomoção, não foi possível a realização de uma segunda coleta de dados nesta comunidade.

Por outro lado, São Tomé parece ser a comunidade mais estável e com menor impacto antrópico. Lá é constante a presença de fragmentos florestais, capoeiras antigas e pastagens. Embora também tenha sido observada as marcas de fogo nas palmeiras, esta prática é menos comum. Em uma pastagem com grande número de palmeiras infestadas, elevadas densidades de triatomíneos e diversidade de vertebrados nas palmeiras, a última queimada havia sido realizada há mais de cinco anos. Portanto, pode-se perceber que embora o uso do fogo parece interferir negativamente na população dos triatomíneos, o re-estabelecimento parcial do ecossistema na copa de uma palmeira é inferior a cinco anos.

As palmeiras do gênero *Attalea* vem sendo investigadas durante muitos anos como ecótopos de triatomíneos (BARRETTO, 1979; ROMANA et al., 1999; DIAS et al., 2008). Como já demonstrado por DIAS et al. (2008), a arquitetura da copa de *A. speciosa* favorece a colonização dos triatomíneos, permitindo maior estabilidade microclimática e servindo de abrigo para diversas espécies de animais, incluindo vertebrados de grande porte, como *T. tetradactyla* Linnaeus, 1758 (DIAS et al., 2010). Com toda esta complexidade, TEIXEIRA et al. (2001) esquematizaram uma rede trófica de cinco níveis compreendendo as diferentes espécies de animais que habitam as palmeiras. No Panamá, devido as grandes densidade triatomínicas encontradas em *A. butyracea*, ROMANA et al. (1999) incriminaram esta palmeira como ecótopo natural para *R. pallens* Barber, 1932. Além disso, os autores sugeriram a utilização dessas palmeiras como o indicador ecológico de áreas de risco para a doença de Chagas. Neste estudo, ROMANA et al. (1999) encontraram média de 21 *R. pallens* em *A.*

butyracea contra 1,6 em *Copernicia tectorum* (Kunth) Mart., espécie de palmeira com a segunda maior densidade de triatomíneos. Na região do Tapajós, foram investigadas três espécies de *Attalea*. Os resultados estatísticos demonstraram menor densidade em *A. maripa*, principalmente pelo baixo número de palmeiras infestadas e densidade triatomínica em Araipá.

Ainda com relação a densidade de triatomíneos, houve predominância de ninfas nas palmeiras. Entre os 743 triatomíneos coletados, apenas 120 (16,1%) eram adultos. Fato curioso foi a quantidade de machos encontrados (n=85) em relação às fêmeas (n=35) nas palmeiras. Dados de 1985 e 1986 da vigilância epidemiológica do Estado de São Paulo demonstram maior infestação dos intradomicílios por fêmeas fertilizadas e capazes de formar colônias (WANDERLEY, 1991). Estudo de comportamento de voo têm demonstrado que *T. sordida* é capaz de voar mais de 100 metros (SCHOFIELD *et al.*, 1991). Em outro estudo, MINOLI & LAZZARI (2006) verificaram que fêmeas de *T. infestans* iniciam o voo mais frequentemente que os machos da mesma espécie. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que *R. prolixus* tem maior predisposição para voar quando comparado com *T. infestans*, comportamento que pode estar relacionado aos diferentes habitats que as espécies se encontram. NOIREAU & DUJARDIN (2001) avaliando o voo e o *status* nutricional de duas espécies de *Triatoma*, verificaram que fêmeas coletadas em armadilha luminosa apresentavam jejum mais prolongado em relação às fêmeas encontradas nos ecótopos naturais. Além disso, como discutido por MINOLI & LAZZARI (2006), se o voo é um mecanismo de dispersão/colonização dos triatomíneos, as fêmeas devem ser mais propensas a voar que os machos. Vale ressaltar que o único espécime de triatomíneo que foi encontrado no intradomicílio de Nova Estrela era uma fêmea de *R. robustus* que se encontrava em jejum muito prolongado. Assim, um fator que pode explicar o baixo número de fêmeas nas palmeiras do médio Tapajós deve ser, provavelmente, a dispersão ativa das mesmas para formação de colônias ou, até mesmo, para a procura de alimento atraídas à noite pela luz.

5.2 *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*

Acredita-se que a existência do *T. cruzi* seja muito antiga. GUHL *et al.* (1999) isolaram e amplificaram fragmentos de minicículo de kDNA do parasita em tecido mumificado datado de 4000 anos atrás, no Chile. Neste período, estima-se que a veiculação e manutenção do parasita esteja intimamente relacionada com animais silvestres (ARAÚJO *et al.*, 2009). Mais recentemente, também foram encontrados fragmento de DNA de *T. cruzi* em um sítio arqueológico no Vale do Peruaçu, Minas Gerais, Brasil (FERNANDES *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2008). Neste estudo, além de identificar a presença de DNA do parasito, os autores fizeram a genotipagem do isolado e observaram a presença de TCI. Assim, pelo encontro de DNA de *T. cruzi* em tecido mumificado, FERNANDES *et al.* (2008) sugerem que cepas de TCI já infectavam humanos antes do período pré colombiano e que a presença da doença de Chagas provavelmente é anterior a colonização européia.

Foi na década de 70 que grande parte dos trabalhos ligados a caracterização de *T. cruzi* começaram a surgir com o emprego de ferramentas bioquímicas e biológicas. Neste período, algumas designações foram criadas para classificar os isolados do parasita, como Zimodemas, Ribodemas e Tipos. Em seguida, na década de 80, com a descoberta da PCR, diversas técnicas apareceram (e.g. *Multilocus Enzyme Electrophoresis* [MLEE], *Random Amplification of Polymorphic DNA* [RAPD], mini-exon e sequências 24Sa do DNA ribossomal) e, com isso, outras designações para o parasito também surgiram, como Genótipo, Linhagem, Grupo, Esquizodemas, Clones e, mais recentemente, DTU's. Tamanha era a diversidade genética encontrada em *T. cruzi* que, no ano de 1999, um grupo de especialistas se reuniram no Simpósio de comemoração dos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, com o intuito de padronizar uma nomenclatura para o *T. cruzi*. Assim, os isolados do parasita foram divididos em dois grupos, denominados *T. cruzi* 1 e *T. cruzi* 2 (ANONYMOUS *et al.*, 1999). Mesmo assim, algumas classificações anteriormente estabelecidas não se

enquadraram nos grupos, sendo estas denominadas apenas como *T. cruzi*.

Mas a padronização estabelecida não foi suficiente, vista que a diversidade do parasita era ainda maior. Dez anos se passaram e uma segunda reunião foi realizada para a definição de um novo consenso de nomenclatura do *T. cruzi* (ZINGALES *et al.*, 2009). Nesta publicação, ZINGALES *et al.*, (2009) sugerem que a nova nomenclatura deve seguir o recente trabalho de LEWIS *et al.*, (2009), pelo fato dos autores utilizarem marcadores já disponíveis. Desta forma, hoje, um novo isolado de *T. cruzi* deve se enquadrar dentro de uma das seis DTU's, denominadas TCI à TC6 que consiste em uma metodologia proposta de um triplo ensaio. A combinação dos resultados obtidos pelo marcador da subunidade maior do rDNA (LSU rDNA) juntamente com dois ensaios de PCR-RFLP permitiu a classificação dos isolados de *T. cruzi* dentro das DTUs.

A tipagem e identificação de isolados de *T. cruzi*, tanto de triatomíneos e reservatórios infectados, quanto de humanos chagásicos é, geralmente, realizada por meio do isolamento e cultivo da cepa. O processo de isolamento de uma cepa de *T. cruzi* em meios de culturas e as passagens sucessivas no próprio meio podem selecionar populações de *T. cruzi*. Esta "seleção" pode gerar resultado que não necessariamente coincide com a real situação, principalmente em casos de infecções mistas.

No presente estudo, devido a grande mortalidade dos triatomíneos coletados, a tipagem e identificação de *T. cruzi* foi realizada sem o isolamento da cepa, ou seja, direto do triatomíneo morto. Assim, não houve qualquer tipo de seleção de populações do parasito. Embora a metodologia proposta por LEWIS *et al.*, (2009) pareça muito simples e de fácil reprodutibilidade, este triplo ensaio apresenta limitações que sequer foram discutidas em sua publicação. A amplificação do marcador LSU rDNA de *T. cruzi* apresenta resultados muito próximos (110pb, 117pb, 120pb ou 125pb), o que torna muito difícil a determinação e visualização do tamanho do fragmento, mesmo utilizando como referência um marcador de peso molecular de 25pb. Para solucionar esta limitação metodológica, foi

necessária a realização de uma etapa complementar: a clonagem dos fragmentos. Somente após a clonagem que foi possível identificar o tamanho dos fragmentos amplificados. Os resultados demonstraram a predominância de TCI na área de estudo, no entanto, também foi observada a presença de TCII e triatomíneos com infecção mista, ou seja, a presença de TCI e TCII no mesmo vetor. Estudo realizado na Amazônia equatoriana demonstrou além da presença de linhagens silvestres (TCI) em animais considerados domésticos, a ocorrência de infecções mistas com TCI e TCII, demonstrando uma via de conexão entre ambos os ciclos de transmissão do *T. cruzi*.

Ao comparar o perfil de bandas gerado pelo marcador GPI-HhaI (PCR-RFLP) nos triatomíneos com infecção mista (TCI e TCII), o perfil de bandas corresponderia a TC5 ou TC6 (figura 22, canaleta 1, página 105). Estes resultados reforçaram ainda mais a necessidade da clonagem para a correta identificação dos isolados, reafirmando as limitações desta metodologia.

Além disso, foi possível observar que os diferentes marcadores utilizados apresentam diferentes níveis de sensibilidade. Nos triatomíneos com infecção mista, o marcador LSU rDNA amplificou duas bandas correspondentes a TCI e TCII (110pb/117pb ou 110pb/120pb), enquanto o espaçador intergênico não transcrito do gene do mini exon amplificou somente um fragmento de 350pb, o que corresponde somente a TCI. Estes resultados evidenciaram maior sensibilidade na amplificação dos fragmentos do *T. cruzi* com o uso do LSU rDNA.

HERRERA *et al.*, (2007) estudando a variabilidade genética de isolados colombianos pertencentes ao grupo TCI verificaram uma divergência nucleotídica de 17,5%. A variabilidade encontrada nas cepas colombianas foi argumento suficiente para que HERRERA *et al.* (2007) propusessem uma divisão dentro do grupo TCI. Mais tarde, análises filogenéticas realizadas por FALLA *et al.* (2009), também com isolados colombianos (reservatórios, vetores e humanos), demonstraram que os quatro haplótipos de TCI podem estar

associados com os ciclos epidemiológicos de transmissão do *T. cruzi*. O haplótipo 1a estaria associado com isolados domésticos de *R. prolixus*; haplótipo 1b, com os ciclos doméstico e peridomésticos, principalmente associado com *T. dimidiata*; haplótipo 1c ainda não é considerado um grupo bem caracterizado, porém tem sido associado com o ciclo peridoméstico e, haplótipo 1d tem mostrado relação com o ciclo silvestre de transmissão do parasito. Apesar de ZINGALES *et al.*, (2009) admitirem a existência de um subgrupo dentro de TCI, o comitê não o integrou dentro da nova nomenclatura.

Dentre os 29 TCI caracterizados neste trabalho, 12 apresentaram dois fragmentos de tamanho inferior a 253pb, caracterizando uma variante dentro do grupo TCI, o que reafirma ainda mais presença dos subgrupos em TCI e demonstra, mais uma vez, a grande variabilidade que existe em *T. cruzi*. Dada toda a problemática, e apresentada algumas limitações da metodologia proposta por LEWIS *et al.* (2009), é extremamente necessário muito rigor e cuidado na interpretação dos resultados.

Na região de estudo, os resultados de infecção demonstraram a veiculação de mais de um DTU de *T. cruzi* (TCI e TCII) no mesmo inseto vetor e também a presença de *T. rangeli*. Recentemente LLEWELLYN & MILES (2010) (Nature Outlook Chagas Disease, 24 junho de 2010, página S9) elaboraram mapas com a distribuição geográfica aproximada dos diferentes genótipos de *T. cruzi*. Segundo estes autores, TCI possui uma ampla distribuição, sendo encontrado desde o sul dos Estados Unidos, passando por toda a América Central e maior parte da América do Sul. No Brasil, TCI engloba todo o território, sendo na região norte, responsável pela manutenção do ciclo de transmissão doméstico, enquanto no sudeste e sul do país, estaria ligado ao ciclo de transmissão silvestre do *T. cruzi*. No que diz respeito a distribuição de TCII, este genótipo também possui uma grande área de ocorrência no Brasil, porém está ausente na região norte, área de estudo deste trabalho. Desta forma, os resultados aqui apresentados não corroboram com a área de ocorrência do *T. cruzi* proposta por LLEWELLYN & MILES (2010), demonstrando

ser muito mais ampla a distribuição de TCII no Brasil.

No que diz respeito ao *T. rangeli*, o primeiro relato sobre a ocorrência deste parasito no Brasil foi descrito por DEANE (1958) em *D. marsupialis* no Estado do Pará. Da mesma forma que o *T. cruzi*, este parasito também possui uma ampla distribuição geográfica no Brasil, tendo sido relatada sua ocorrência nos Estados de Tocantins (DIOTAIUTI *et al.*, 1992), Ceará (DIAS *et al.*, 2007), Alagoas (LUCENA & VERGETTI, 1973), Bahia (BARRETT & OLIVEIRA, 1977), Distrito Federal (GURGEL-GONÇALVES *et al.*, 2004), Minas Gerais (RAMIREZ *et al.*, 2002) e Santa Catarina (STEINDEL *et al.*, 1991), infectando tanto triatomíneos como reservatórios animais. O *T. rangeli* é considerado um parasito de grande importância epidemiológica, pois devido às suas similaridades antigênicas com o *T. cruzi*, pode causar reações cruzadas em ensaios de sorologia (D'ALESSANDRO & SARAIVA, 1992). Além disso, é considerado a segunda espécie de tripanosoma que mais infecta humanos na América Latina (GUHL & VALLEJO, 2003). No Brasil, o primeiro relato sobre infecção humana por *T. rangeli*, deve-se a COURA *et al.* (1996) na Amazônia brasileira, sendo o *R. brethesi* considerado como o provável vetor de transmissão na região. Outras notificações de rangelirose humana têm sido descritas. DE SOUSA *et al.* (2008) identificaram a presença de *T. rangeli* em dois pacientes procedentes da Bahia, estando co-infectados com o *T. cruzi* e demonstrando também em humanos a presença de infecções mistas por estes parasitos, sendo a identificação dos tripanosomas realizadas tanto morfológica quanto molecularmente. Embora *T. rangeli* possua morfologia mais delgada quando comparada com o *T. cruzi*, este parasito pode ser facilmente confundido com *T. lewisi*. Além disso, URDANETA-MORALES & TEJERO (1992) demonstram que *T. rangeli* possui grande pleomorfismo, o que dificulta sua identificação pela morfologia. No presente trabalho, ao contrário da metodologia utilizada para *T. cruzi*, a amplificação do gene repetitivo de ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) de *T. rangeli* nos triatomíneos foi de fácil execução e interpretação dos resultados. Os controles usados nas reações de PCR demonstraram que os marcadores utilizados, tanto para *T. cruzi*, quanto para *T. rangeli* são espécie-específicos,

e permitiram a identificação da real taxa de infecção natural dos triatomíneos coletados pelos tripanosomatídeos.

Ao contrário do *T. cruzi* que a transmissão ocorre via posterior, por meio de fezes de triatomíneos infectados, o *T. rangeli* é um parasito que invade a hemocele e glândulas salivares dos vetores, e sua transmissão é via anterior – principalmente triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Atualmente 12 das 16 espécies de *Rhodnius* já foram encontradas naturalmente infectadas pelo *T. rangeli*, seis destas no Brasil, incluindo *R. robustus* e *R. pictipes* (GUHL & VALLEJO, 2003). Além disso, cinco ordens de animais (Edentata, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primates) também já foram relatadas com infecção pelo *T. rangeli*.

5.3 Fontes alimentares

Estudos sobre a identificação do sangue ingerido por artrópodes hematófagos é uma importante ferramenta para um melhor entendimento da epidemiologia das doenças transmitidas pelos vetores, compreensão dos aspectos relacionados com a ecologia das espécies e identificação dos possíveis reservatórios para implementação das estratégias de controle.

Durante muitos anos, várias técnicas vem sendo empregadas nos estudos das fontes alimentares. A reação de precipitina em tubos capilares, considerada um teste sorológico, foi uma das primeiras técnicas empregadas nos estudos de fontes alimentares. No entanto, esta metodologia possui limitações, pois é necessária a produção de anti-soros de animais para a obtenção dos resultados. Neste caso, o número de possíveis hospedeiros a ser testado é, normalmente, muito reduzido e generalizado, acarretando como “não reagente” o resultado de uma grande quantidade de amostras analisadas, provavelmente pela ausência de anti-soro de outros animais (LOROSA *et al.*, 1999; 2000; DIAS *et al.*, 2008). No mesmo período da descoberta da precipitina, outra técnica também estava disponível: a imunodifusão em gel de ágar. ANDRADE *et al.* (1975) comparando essas duas técnicas para identificação do sangue ingerido por triatomíneos

observaram maior sensibilidade da reação de precipitina. Neste estudo, utilizando como modelo a espécie *T. infestans*, a técnica de precipitina obteve uma discreta e maior sensibilidade contra o método de imunodifusão nos triatomíneos com 60 dias ou mais de jejum.

Em seguida, na década de 80, o teste ELISA foi empregado como uma alternativa para a identificação das fontes alimentares de vetores. GOMES *et al.*, (2001) utilizando como modelo mosquitos alimentados em laboratório, compararam a reação de precipitina com o teste ELISA com o objetivo de avaliar qual teste possui melhor sensibilidade e especificidade. Os resultados demonstraram que a reação de precipitina apresentaram maior sensibilidade e especificidade em relação ao teste ELISA, além de ser uma metodologia de fácil execução e baixo custo.

Com o advento da biologia molecular, outras técnicas surgiram, aumentando ainda mais a sensibilidade e especificidade. SANT'ANNA *et al.* (2008) empregaram o uso da multiplex PCR para detecção das fontes alimentares em flebotomíneos. A grande limitação desta metodologia foi o número de hospedeiros testados (humano, cão e galinha) e a interpretação dos resultados. A análise dos dados é realizada visualmente como em uma RAPD pelo padrão de bandas no gel. Resultados similares são obtidos com o uso de PCR Heteroduplex. BOSSENO *et al.*, (2006) avaliando as fontes alimentares de *Triatoma longipennis* Usinger, 1939, verificaram que esta espécie de triatomíneo é bem eclética. Neste estudo, *T. longipennis* apresentou em sua dieta alimentar, sangue de gambá, pato, humano e galinha. A dificuldade de interpretação da Heretoduplex PCR também está no padrão de bandas obtidos pela amplificação do fragmento do citocromo B. Alguns animais possuem o padrão muito parecido, com bandas muito próximas uma das outras, o que torna difícil e complicada a sua correta identificação. Além disso, BOSSENO *et al.*, (2006) encontraram 11 amostras com um complexo padrão de bandas que foi impossível identificar o hospedeiro, mesmo com o sequenciamento das amostras.

Mais recentemente uma nova ferramenta tem sido proposta para

identificação das fontes alimentares: o “barcode DNA” ou código de barras do DNA. Esta metodologia surgiu com o intuito de padronizar os métodos moleculares utilizados para identificar espécies de organismos vivos, e aumentar a escala com que identificações confiáveis possam ser realizadas. O *barcode* baseia-se na amplificação do gene da subunidade I da Citocromo Oxidase C (COI), pois apresenta um grande potencial informativo para a identificação de espécies de diferentes grupos animais, como já demonstrado na identificação de hospedeiros vertebrados de mosquitos (ALCAIDE *et al.*, 2009). Assim como para as milhões de sequências existentes e depositadas no GenBank, a idéia do uso do barcode é alimentar um outro banco de dados, denominado, *Barcode of Life Data Systems – BOLD Systems*.

No presente trabalho, para a identificação das fontes alimentares de *Rhodnius*, empregou-se pela primeira vez neste *Taxa*, um par de iniciadores que amplificam uma região altamente conservada do gene do citocromo B (KOCHER *et al.*, 1989). Estes iniciadores, considerados universais para vertebrados, possuem a vantagem de não amplificar o DNA presente no tecido abdominal dos insetos testados (MALMQVIST *et al.*, 2004). Embora seja uma técnica relativamente laboriosa, que exige a purificação do DNA e sequenciamento do produto amplificado, o resultado obtido é de grande especificidade. Todas as fontes de alimentação identificadas obtiveram índices de similaridade superior a 90% em comparação com o banco de dados do GenBank, garantindo assim, confiabilidade nos resultados. Os resultados demonstraram grande ecletismo dos *R. robustus* da região do médio Tapajós. Os triatomíneos alimentaram preferencialmente em animais de sangue quente (mamíferos e aves), e, além disso, também foram identificadas duas espécies de répteis, indicando que *R. robustus* também é capaz de se alimentar em animais de sangue frio. Dentro da classe Mammalia foram identificadas quatro ordens de animais, sendo: quatro espécies de primatas, três didelfídeos, sete roedores e um xenarthra. Alguns dos animais identificados, como *D. marsupialis*, *Coendou prehensilis* Linnaeus, 1758 e *Philander opossum* Linnaeus, 1758 são considerados hospedeiros com

altas taxas de prevalência pelo *T. cruzi* e sua associação com os triatomíneos também já tem sido demonstrada (COURA *et al.*, 2002).

Foi possível constatar a partir dos resultados obtidos da identificação das fontes alimentares, associados aos índices de infecção natural pelos tripanosomatídeos, que *T. tetradactyla* é um reservatório de *T. rangeli* na região do médio Tapajós e responsável pela veiculação deste parasito no ambiente silvestre (DIAS *et al.*, 2010). Dentre as 191 sequências obtidas e comparadas no GenBank, 62 (32,5%) amplificaram o fragmento de citocromo B desta espécie. Em uma palmeira uricuri na comunidade de São Tomé foi encontrado um espécime de *T. tetradactyla* habitando a copa da palmeira junto com os triatomíneos. Nesta palmeira, todos os *R. robustus* estavam ingurgitados, e o resultado da infecção por *T. rangeli* demonstrou que nas ninfas de primeiro estágio infectadas, o conteúdo estomacal revelou que o sangue ingerido tratava-se do tamanduá (DIAS *et al.*, 2010).

Como nas outras metodologias aplicadas para identificação das fontes alimentares, cabe ressaltar aqui uma limitação desta técnica. Um grande número de *Rhodnius* (n=313) não amplificaram o fragmento de citocromo B, provavelmente pela falta de fezes e/ou conteúdo estomacal dentro dos insetos, pois a grande maioria dos triatomíneos encontravam-se em um jejum prolongado. Em outros casos, a sequência obtida também não revelava resultado pelo BLAST, talvez por falta de sequências depositadas no GenBank, uma vez que na Amazônia é encontrada a maior biodiversidade do planeta. Mesmo assim, o resultado das 191 sequências comparadas no banco de dados, permitiu conhecer um pouco da fauna de vertebrados que estão associados aos *R. robustus* nas palmeiras da região. Além disso, também foi possível identificar os possíveis reservatórios do *T. cruzi* e do *T. rangeli*, o que demonstra grande importância para a epidemiologia da doença de Chagas e conhecimento sobre a ecologia de *R. robustus* com o uso deste marcador.

5.4 Cartografia das áreas de risco

A estruturação das atividades humanas nas áreas colonizadas não é similar nas três comunidades. Agrovila-Araipá por ser a comunidade com o menor tempo de colonização, ainda está em processo de antropização com desmatamento e constante uso do fogo para plantio. Essas atividades certamente possuem impacto negativo na população de triatomíneos, bem como na presença de reservatórios silvestres e sinantrópicos que promovem a manutenção e veiculação do *T. cruzi* na região. Por outro lado, a comunidade de São Tomé por ser mais antiga, não sofre grandes modificações na estruturação das paisagens. A ação humana sobre o ambiente é nitidamente reduzida, o que favorece a colonização das palmeiras pelos triatomíneos e pelos reservatórios do *T. cruzi*, garantindo, assim, a manutenção do ciclo enzoótico da doença de Chagas em várias localidades da comunidade. Já a comunidade Nova Estrela, por se tratar de um assentamento de terras e por estar localizada em uma vicinal da rodovia Transamazônica, a paisagem foi muito antropizada e apresenta uma configuração similar a uma "espinha" de peixe. Porém, como na comunidade São Tomé, o processo antrópico já foi exercido sobre as localidades de Nova Estrela, fazendo com que a presença de triatomíneos silvestres e a veiculação do *T. cruzi* entre os insetos e os mamíferos ocorram na região, mas em menor intensidade.

O uso de ferramentas de SIG vem sendo amplamente utilizado em estudos da área de saúde, especialmente em pesquisas relacionadas com doenças tropicais (GALVÃO *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; GUIMARÃES 2010). Com o uso destas ferramentas é possível fazer uma análise da distribuição geográfica de espécies, usando modelos de nichos ecológicos (SANDOVAL-RUIZ *et al.*, 2008) bem como avaliar o risco de infecção às populações e o seu controle (GUIMARÃES 2010, GUIMARÃES *et al.*, 2010). No presente estudo, os mapas gerados pela análise de Kernel e pelo Interpolador de Médias demonstraram que São Tomé é a comunidade que apresentou os maiores aglomerados (*hotspots*) de infestação das palmeiras e infecção dos triatomíneos pelo *T. cruzi*. Por outro lado, Nova Estrela

apresentou apenas um aglomerado, tanto nas análises de Kernel, quanto com o uso do Interpolador de Médias. Pela baixa densidade de triatomíneos e ausência de infecção pelo *T. cruzi*, a comunidade Araipá diferiu das demais, não apresentando aglomerados.

Embora a Amazônia seja considerada uma região emergente para a transmissão do *T. cruzi* às populações humanas, não há indícios de colonização dos vetores. O encontro de um *R. robustus* adulto em uma casa de Nova Estrela demonstra que, assim como em outras regiões do Brasil, estes insetos são atraídos pelas luzes das casas em busca de alimento (SARQUIS *et al.*, 2006). Este fato possui grande importância na epidemiologia da doença de Chagas, pois representa um risco de infecção às populações humanas e de colonização das habitações. Análises de SIG demonstraram que a palmeira dissecada mais próxima desta casa estava a 235m de distância. Certamente outras *Attalea* spp encontram-se no entorno das casas, provavelmente muito mais próximas à palmeira dissecada. Os resultados obtidos sugerem que a proximidade das florestas primárias possuem forte relação com a densidade de triatomíneos e manutenção do ciclo enzoótico do *T. cruzi* na região. Além disso, acredita-se que o risco de infecção do parasito às populações humanas deve ser maior em São Tomé, como demonstrado pelas análises de Kernel e do Interpolador de Médias. Os resultados obtidos com estas análises demonstraram de forma clara que, tanto em relação a densidade triatomínica, quanto a infecção dos triatomíneos por *T. cruzi* que São Tomé difere das demais comunidades em relação a intensidade dos *hotspots* e número de aglomerados.

5.5 Considerações finais

Os resultados aqui apresentados demonstraram a existência de uma grande população de *R. robustus* na região do médio Tapajós, Pará, Brasil. Foi possível observar que as diferentes formas de uso do solo interferem na infestação das palmeiras e densidade triatomínica: negativamente com o uso do fogo, e positivamente com a preservação do meio ambiente. Além

disso, os dados demonstram a manutenção do ciclo silvestre do *T. cruzi*, com a ocorrência de várias linhagens do parasita, inclusive com a presença de infecções mistas (TCI e TCII; *T. cruzi* e *T. rangeli*) no mesmo vetor. Estes achados indicam uma potencial conexão entre os ciclos silvestre e doméstico de transmissão da doença de Chagas, como já demonstrado na Amazônia equatoriana, que provavelmente não se consolidou nesta região do Tapajós pela pouca capacidade de colonização do ambiente artificial pelos vetores locais. No período analisado o encontro de um exemplar adulto dentro de uma casa ocorreu em uma única ocasião. O Estado do Pará tem sido palco de um crescente número de surto agudo de infecção humana pelo *T. cruzi* associados a transmissão oral, geralmente ligado ao consumo do suco de açaí e bacaba contaminados (BRASIL, 2006; NÓBREGA *et al.*, 2009, PEREIRA *et al.*, 2009). O açaí não está presente no rol das palmeiras da região aqui estudada, nem a população tem interesse em introduzi-la, uma vez que os moradores são basicamente migrantes originalmente de regiões que não tem o hábito de comer estes frutos. Igualmente em relação à bacaba, muito raramente vista na área, e também não utilizada na alimentação. Muito proximamente, entretanto, no município de Santarém, em 2006 foram notificados 17 casos agudos com transmissão associada ao consumo do suco de bacaba (BRASIL, 2006).

Os resultados sugerem que a doença de Chagas na região está intimamente relacionada com os animais silvestres, no entanto, a existência de um ciclo silvestre intenso demanda vigilância para prevenção da transmissão, seja pela presença ocasional de triatomíneos nas casas, seja pelo processo de contaminação de alimentos. As dificuldades de locomoção na região, a ausência do PCDCh na região associados à falta de estrutura dos serviços de saúde e assistência médica básica no entorno das comunidades são fatores primordiais que devem ser avaliados em primeiro plano de forma a manter a saúde e o bem estar destas populações amazônicas.

- *Rhodnius robustus* é a espécie de triatomíneo predominante na área de estudo. No entanto, na região também há a ocorrência das espécies *R. pictipes* e *Panstrongylus lignarius*;
- A identificação e caracterização dos tripanosomatídeos (*T. cruzi* e *T. rangeli*) foi possível mesmo em triatomíneos mortos, permitindo o reconhecimento do padrão molecular dos parasitas que circulam no ambiente, sem seleção de populações pelo processo de isolamento das amostras;
- Há predominância de *T. cruzi* 1 na região e isolados do grupo *T. cruzi* 2 também foram identificados, aumentando sua área de distribuição geográfica;
- A identificação das fontes alimentares dos triatomíneos pela caracterização de fragmento do Citocromo b foi possível e é recomendada para estudos de triatomíneos, possibilitando a identificação da fauna de vertebrados associada aos triatomíneos ao nível específico e as possíveis fontes de infecção dos tripanosomatídeos na região;
- *Tamandua tetradactyla* é um importante reservatório do *T. rangeli* na região;
- *R. robustus* pode ser considerado como um vetor de hábito alimentar eclético, alimentando inclusive em animais de sangue frio;
- Pela escassez de vertebrados nas palmeiras e ausência de tripanosomatídeos, Agrovila-Araipá é a comunidade com menor risco de transmissão silvestre;
- A Tripanossomíase Americana na região é considerada uma enzootia silvestre, no entanto, a proximidade do ciclo silvestre representa risco potencial de transmissão para os moradores da região, em especial para São Tomé, e mais secundariamente para Nova Estrela, como demonstrado nos resultados das análises de Kernel e do Interpolador de Médias;

7.1 Autorização do IBAMA para dissecação de palmeiras, coleta e transporte de triatomíneos



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16485-2	Data da Emissão: 27/06/2008 18:04	Data de Validade: 27/06/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 302215	Nome: José Augusto Leitão Drummond	CPF: 380.122.277-20
Título do Projeto: Mau uso da terra e saúde precária: prevenção em saúde por meio do uso adequado da terra por pequenos agricultores dos trópicos úmidos. Título Original: Poor Land Use and Poor Health (PLUPH): primary prevention of human health through sound land-use for small-scale farmers of the humid tropics.		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

Observações, ressalvas e condicionantes

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 passa de, 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	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe 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.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/sisbio . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	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.
6	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, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	A participação dos pesquisadores Frederique Sabine Vachald Seyler, Robert Davidson, Quartier Marion, Benjamin Grégoire, Marc Michel Lucotte, Harry Myriam, Annie Bélieveu, Guy Demostenes Mejia e Romana Christine nas atividades previstas nesta autorização dependerá de autorização a ser expedida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia, MCT. O pesquisador Frédéric Adelin Georges Mertens fica dispensado de autorização do Ministério da Ciência e Tecnologia.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Anderson Martins de Souza Braz	Estudante de mestrado, atuação no eixo meio ambiente (3.5)	591.356.542-87	2926941 SEGUP-PA	Brasileira
2	Frédéric Adelin Georges Mertens	Coordenador do eixo desenvolvimento subprojetos 3.4	148.068.648-46	V099418P SEDPMAFDPP-	Estrangeira
3	Anamaria de Fátima Venâncio	Pesquisador colaborador no eixo saúde (3.3)	470.839.309-10	987940007 SSP-BA	Brasileira
4	Carlos José Sousa Passos	Pesquisador colaborador do projeto 3.3 - Área de Saúde	437.358.192-49	2461794 SEGUP-PA	Brasileira
5	Frederique Sabine Vachald Seyler	Pesquisador colaborador no eixo meio ambiente (3.5) e saúde	715.737.801-97	P9965-00 Rai. Ext.-DF	Estrangeira
6	Juliana Valentini	Estudante de doutorado, atuação no eixo saúde subprojeto 3.3	725.472.270-53	9015506507 SSP-RS-RS	Brasileira
7	Robert Davidson	Líder do projeto 3.5 - Área de Meio Ambiente		BA134614 Canada-	Estrangeira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36893561



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16485-2	Data da Emissão: 27/06/2008 18:04	Data de Validade: 27/06/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 302215	Nome: José Augusto Leitão Drummond	CPF: 380.122.277-20
Título do Projeto: Mau uso da terra e saúde precária: prevenção em saúde por meio do uso adequado da terra por pequenos agricultores dos trópicos úmidos. Título Original: Poor Land Use and Poor Health (PLUPH): primary prevention of human health through sound land-use for small-scale farmers of the humid tropics.		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

8	RAIMUNDO COSME DE OLIVEIRA JUNIOR	Pesquisador colaborador no eixo meio ambiente (3.5)	106.087.702-30	4071-D CREA-AM	Brasileira
9	Lilêia Gonçalves Diotallevi	Pesquisador colaborador no eixo saúde (3.3) e orientadora de	250.335.656-72	M305938 SSPMG-MG	Brasileira
10	Quartier Marlon	Estudante de doutorado, atuação no subprojeto 3.3.1		-	Estrangeira
11	Benjamin Grégoire	Estudante de doutorado, atuação no eixo ambiente (3.5) e sa		-	Estrangeira
12	Henrique Marinho Leite Chaves	Pesquisador colaborador no eixo meio ambiente (3.5)	289.390.261-87	5819 CREA-DF	
13	Marc Michel Lucotte	Líder estrangeiro do Projeto. Coordenador do subprojeto 3.1		-	Estrangeira
14	Harry Myriam	Pesquisador colaborador do projeto 3.3 - Área da Saúde		-	Estrangeira
15	Annie Béhesau	Estudante de doutorado, atuação no eixo ambiente (3.5)		-	Estrangeira
16	LUIZ PARENTE DE SOUSA	Pesquisador colaborador no eixo meio ambiente (3.5)	092.727.712-34	2493692 SSP-PA	Brasileira
17	Fernando Braga Stehling Dias	Estudante de doutorado, atuação no eixo saúde (3.3)	047.263.046-66	MG 8.487.882 SSP-MG	Brasileira
18	Guy Demostenes Mejia	Estudante de doutorado, atuação no eixo saúde (3.3)	735.860.561-68	72173304 Colombi-	Estrangeira
19	Francisco de Assis OLIVEIRA	Colaborador nos subprojetos 3.5 eixo ambiente	022.966.082-72	20888137 SEGUP-PA	Brasileira
20	Daniela Monteiro da Cruz	Aluna de mestrado subprojeto 3.3. área saúde	685.781.302-78	3002481 SEGUP-PA	Brasileira
21	Romana Christine	Líder do projeto 3.3 - Área de Saúde		-	Estrangeira
22	Fábio Sidonio de Barros Evangelista	Estudante de doutorado, atuação no eixo ambiente (3.5) e sa	056.785.237-75	129700217 IFF-RJ	Brasileira
23	Jean Remy Davee Guimaraes	Pesquisador colaborador no eixo meio ambiente (3.5) e saúde	375.189.337-72	032744823 IFF-RJ	Brasileira
24	Ligia Meres Valadão	Estudante de mestrado, atuação nos subprojetos 3.2 e 3.4.1	282.752.788-06	322340123 SSP-TO	Brasileira
25	PAULA DURANTE TAGLIARI	Estudante de mestrado, atuação no subprojeto 3.5.3	988.741.361-53	1787842 SSP-DF	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	AVEIRO	PA	Aveiro	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36893561



Página 2/4



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16485-2	Data da Emissão: 27/06/2008 18:04	Data de Validade: 27/06/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 302215	Nome: José Augusto Leição Drummond	CPF: 390.122.277-20
Título do Projeto: Mau uso da terra e saúde precária: prevenção em saúde por meio do uso adequado da terra por pequenos agricultores dos trópicos úmidos. Título Original: Poor Land Use and Poor Health (PLUPH): primary prevention of human health through sound land-use for small-scale farmers of the humid tropics.		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

2	ALTAMIRA	PA	Altamira	Fora de UC
3	ITAITUBA	PA	Itaituba	Fora de UC
4	BELTERRA	PA	Belterra	Fora de UC
5	JACAREACANGA	PA	Jacareacanga	Fora de UC
6	PLACAS	PA	Placas	Fora de UC
7	RURUPOLIS	PA	Rurópolis	Fora de UC
8	SANTAREM	PA	Santarém	Fora de UC
9	URUARA	PA	Uruara	Fora de UC
10	TRAIROA	PA	Trairão	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Amphibia, Aves, Artiodactyla, Didelphimorphia, Rhynchocephalia, Testudinidae, Squamata, Chelidae, Dermatemnyidae, Reduviidae, Rodentia
2	Coleta de material botânico, fúngico ou microbiológico	Angiospermae (**Qlde: 80), Protozoa (**Qlde: 125)
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves, Artiodactyla, Didelphimorphia, Rhynchocephalia, Rodentia, Squamata, Amphibia, Chelidae, Dermatemnyidae, Reduviidae, Testudinidae, Xenarthra, Angiospermae
4	Manutenção temporária (até 24 meses) de invertebrados silvestres em cativeiro	Reduviidae

* Qlde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Sangue
3	Amostras biológicas (Plantas)	Folhas, Semente
4	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual, Outros métodos de captura/coleta(Explicações em "Dados Básicos")
5	Método de captura/coleta (Aves)	Captura manual, Outros métodos de captura/coleta(Explicações em "Dados Básicos")
6	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Captura manual, Armadilha luminosa, Outros métodos de captura/coleta/armadilha com isca)
7	Método de captura/coleta (Microorganismos)	Outros métodos de captura/coleta(Isolamento em meio de cultivo)
8	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Captura manual
9	Método de captura/coleta (Plantas)	Outros métodos de captura/coleta(Explicações em "Dados Básicos")
10	Método de captura/coleta (Répteis)	Outros métodos de captura/coleta(Explicações em "Dados Básicos"), Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Fundação Fiocruz	Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
2	Université Paris XII	Laboratório de Biologia das Populações e Funcionamento dos Solos
3	Fundação Fiocruz	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36893561



Página 3/4



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 16485-2	Data da Emissão: 27/06/2008 18:04	Data de Validade: 27/06/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 302215	Nome: José Augusto Leitão Drummond	CPF: 380.122.277-20
Título do Projeto: Mau uso da terra e saúde precária: prevenção em saúde por meio do uso adequado da terra por pequenos agricultores dos trópicos úmidos. Título Original: Poor Land Use and Poor Health (PLUPH): primary prevention of human health through sound land-use for small-scale farmers of the humid tropics.		
Nome da Instituição : FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA		CNPJ: 00.038.174/0001-43

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

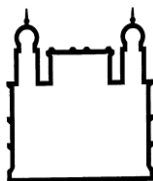
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na Internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 36893561



Página 4/4

7.2 Ficha de campo utilizada nas coletas dos triatomíneos



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou
Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas
FICHA DE COLETA DE TRIATOMÍNEOS EM CAMPO

Data: ____/____/____

Horário Início:

Término:

Condição Climática: Sol Parcial. Nublado Nublado Chuvoso

Localidade (município):

Ecótopo:

Número Ecótopo:

Silvestre: Espécie de Palmeira:

Tamanho da Palmeira:

Espécie de Palmeira mais próxima:

Altitude:

Referência Geográfica:

Fauna Associada à palmeira:

Ecótopo: Positivo

Negativo

Ovos: _____

1º estágio: _____

2º estágio: _____

3º estágio: _____

4º estágio: _____

5º estágio: _____

Fêmeas: _____

Machos: _____

Espécies de Triatomíneos Capturadas:

Observações:

7.3 Protocolo para preparação do meio de cultura SOC usado nas clonagens

Meio de Cultura SOC (Super Optimal Broth)

Bacto-tryptone	20g
Bacto-yeast extract	5g
NaCl	0.5g
KCl 1M	2.5mL
H ₂ O qsp	1000mL

Ajustar o pH para 7 com solução de NaOH 5N (~0,2mL). Autoclavar.

Adicionar 20mL de solução de glucose 1M (estéril) imediatamente antes do uso.

7.4 Protocolo para preparação do meio de cultura LB usado nas clonagens

Meio de Cultura LB (Lysogeny Broth)




Bacto-Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	5g
Bacto-yeast extract	2,5g
NaCl	5g
Ágar	3,75g
H ₂ O destilada qsp	250mL

Colocar todos os reagentes em garrafa de 500mL com tampa de rosca. Adicionar água para 250mL. Aquecer em microondas até completa dissolução dos sais.

Deixar resfriar em banho maria. Quando a temperatura chegar a 60°C, adicionar 20mg de X-Gal e 25mg de Ampicilina. Homogeneizar.

Em uma capela de fluxo, distribuir o meio de cultura em placas de petri descartáveis (~15mL por placa). Deixar as placas semi-tampadas até que todo o vapor condensado desapareça. Guardar em geladeira a 4°C.

7.5 Autorizações para exportação de material biológico

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70818-900 - Brasília-DF		 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA		1) Pag. Nº 1/1 2) Data Emissão/Issuing Date: 04/03/2009 3) Válido Até/Valid Until: 04/09/2009											
4) Licença nº/Permit n°: 09BR003007/DF		6) Selo nº/Stamp n°: *****		8) Controle/Check #: GLYBJFRW7CVEBP5V											
5) Licença de/Permit for Exportação		7) Selo/Stamp *****		9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority  Assinatura/Signature											
10) Importador/Importer Myriam Harry Avenue de la Terrasse, Bâtiment 13, Boite Postale 1 Paris - 91198 Gif sur Y fone: - França - FR			11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) Liléia Gonçalves Diotaluti Rua Simão Irffi 51 apt 201 BELO HORIZONTE - 30380270 fone: 33422346 - diotaluti@cpqrr.fiocruz.br Brasil - BR												
12) País Importador/Country of Import França - FR			13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Brasil - BR												
14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction S - Scientific/Fins científicos...															
15) Condições Especiais/Special Conditions For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations															
16) Dados do Transporte/Transportation Data Local/Place: ALF/AI Confins Data Provável/Probable Date: 02/03/2009 ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/ THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.															
17) Item		18) Produto/Product		19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit											
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		21) Anexo/Origem Appendix/Source		22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark											
23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date		24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date													
17) I		18) ANIMAL MORTO/BODY		19) -- 164,00 UN --											
20) 1. Rhodnius spp.		21) NC W		22) animal morto/body 164,00 UN -											
				23) - -											
				24) - -											
----- Fim dos Itens/Itens End -----															
<p>"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições /in situ/, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções /ex situ/, desde que coletados em condições /in situ/, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"</p> <p>"This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge e with potential commercial use."</p>															
25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement															
Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.
_____ ASSINATURA/SIGNATURE															
1 Verificar/Verify: http://ibama.gov.br/cites/verificar E-mail: cites.sede@ibama.gov.br 1ª Via - Original - Importador Exportador - Brasil Importer Exporter - Brazil 2ª Via - Exportador Importador - Estrangeiro / Exporter Importer - Other Country 3ª Via - Aduana / Customs 4ª Via - IBAMA															

(continuação...)



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
E DOS RECURSOS NATURAIS
RENOVÁVEIS - IBAMA
SCEN Trecho 2 - Ed. Sede - Caixa Postal nº 09870 - CEP 70818-900 - Brasília-DF



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE
E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA

1) Pag. Nº 1/1
2) Data Emissão/Issuing Date: 22/06/2009
3) Válido Até/Valid Until: 22/12/2009

4) Licença nº/Permit nº: 09BR003406/DF	6) Selo nº/Stamp nº: ***** 7) Selo/Stamp *****	8) Controle/Check 1: 5KBRICSC2W899UW7 9) Autoridade Adm. Emitente/Issuing Management Authority Assinatura/Signature
5) Licença de/Permit for Exportação		

10) Importador/Importer Myriam Harry Avenue de la Terrasse, Bâtiment 13, Boite Postale 1 Paris - 91198 Gif sur Y fone: - França - FR	11) Exportador(Re-exportador)/Exporter(Re-exporter) Liléia Gonçalves Diotaiuti Rua Simão Irffli 51 apt 201 BELO HORIZONTE - 30380270 fone: 33422346 - diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br Brasil - BR
12) País Importador/Country of Import França - FR	13) País Exportador(Re-exportador)/Country of Export(Re-export) Brasil - BR

14) Objetivo da Operação/Purpose of the transaction
S - Científico/Fins científicos...

15) Condições Especiais/Special Conditions
For live animals, this permit or certificate is only valid if the transport conditions conform to the Guidelines for Transport and preparation for shipment of live wild animals and plants or, in the case of air transport, to the IATA Live Animals Regulations

16) Dados do Transporte/Transportation Data
Local/Place: ALF/AI Confinis
Data Provável/Probable Date: 01/07/2009
ESTA LICENÇA É VÁLIDA SOMENTE PARA UMA OPERAÇÃO/
THIS PERMIT OR CERTIFICATE IS ONLY VALID FOR ONE SHIPMENT.

17) Item	21) Anexo/Origem Appendix/Source	18) Produto/Product	19) Quantidade-Unidade Medida/Quantity Unit
20) Espécie: nome científico nome vulgar/ Species: scientific name common name		22) Descrição: Parte Quantidade-Unidade-Marcação Description: Part Quantity-Unit-Mark	23) Cód. País de Origem-Comprovante-Data Country of Origin-Permit-Date 24) Cód. País de reexportador-Certificado-Data Country reexportation-Certificate-Date
17) I		18) ANIMAL MORTO/BODY	19) -- 400.00 UN --
20) 1. Rhodnius spp.	21) NC W	22) animal morto/body 400,00 UN -	23) - - 24) - -

Fim dos Itens/Items End

"Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informações de origem genética, contida no todo ou em parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições /in situ/, inclusive domesticada, ou mantidos em coleções /ex situ/, desde que coletados em condições /in situ/, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial"
"This permit does not extend to the use of biological material to access genetic information, contained in the whole or parts of plants, fungus, microorganisms or animals specimens; in substances derived from the metabolism of these living beings or from extracts obtained from live or dead specimens, occurring in situ conditions, including domestic ones, or kept in ex situ collections, if obtained in situ conditions, in national territory, the continental shelf or the exclusive economic zone, aiming at prospecting for identification of components of the genetic patrimony and/or information about associated traditional knowledge e with potential commercial use."

25) Endosso da Aduana/Customs Endorsement

Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.	Item	Qtd./Qty.
------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------	------	-----------

ASSINATURA/SIGNATURE

1 Verificar/Verify: <http://ibama.gov.br/cites/verificar> E-mail: cites.sede@ibama.gov.br
1ª Via - Original - Importador | Exportador - Brasil | Importer | Exporter - Brazil
2ª Via - Exportador | Importador - Estrangeiro | Exporter | Importer - Other Country
3ª Via - Aduana / Customs
4ª Via - IBAMA



Short communication

Tamandua tetradactyla Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon

Fernando Braga Stehling Dias^{a,d}, Marion Quartier^{b,c,d}, Christine A. Romaña^e, Liléia Diotaiuti^{a,1,*}, Myriam Harry^{f,1}

^a Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisa René Rachou, Av Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, Belo Horizonte, MG, CEP 30190-002, Brazil

^b Université Paris 12, Créteil, France

^c Laboratoire de Parasitologie Moléculaire, Institut de Biologie, Université de Neuchâtel, Suisse, Switzerland

^d LEGS, CNRS-IRD, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

^e Université Paris Descartes/Espace S140, IRD, France

^f Université Paris Sud-11, F-91 403 Orsay & LEGS, CNRS-IRD, F-91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2010

Received in revised form 24 June 2010

Accepted 28 June 2010

Available online 7 July 2010

Keywords:

Tamandua tetradactyla

Rhodnius robustus

Trypanosoma rangeli

Infection focus

Brazilian Amazon

ABSTRACT

A sylvatic infection focus of *Trypanosoma rangeli*, whose cycle involves the anteater *Tamandua tetradactyla* and triatomine insect *Rhodnius robustus* was observed in a pasture-dominated landscape of the rural riparian community of São Tomé located along the Tapajós river in the municipal district of Aveiro (State of Pará, Brazil), the Brazilian Amazon region. During a field work campaign with the objective of Chagas disease diagnosis in the Tapajós region, an anteater and 31 triatomines were found inhabiting in the same *Attalea phalerata* palm tree crown. Collected triatomines were identified as *R. robustus* with morphological and molecular procedures. The analysis of infection by *T. rangeli* using the repetitive ARN nucleolar Cl1 (sno-RNA-Cl1) gene showed that 25 triatomines of all stages were infected by *T. rangeli* (total infection rate of 80.6%). Infection by *Trypanosoma cruzi* using mini-exon markers was not identified. Examination of the digestive content of the triatomines demonstrated that the only feeding source found was the anteater. These results demonstrate that *T. tetradactyla* can be an important reservoir for *T. rangeli* and a good vehicle of the parasite within the Brazilian Amazon region.

Crown Copyright © 2010 Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, the ethiological agent of Chagas disease, are also vectors of the parasite *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, both of the Trypanosomatidae family (Euglenozoa, Kinetoplastida) and widely distributed throughout Central and South Americas.

T. cruzi and *T. rangeli* have a sympatric distribution in some areas producing mixed infections in vectors or in vertebrates. Moreover *T. rangeli* bears similarities with *T. cruzi* regarding surface antigens, impairing the diagnosis of Chagas disease when serological assays are carried out (D'Alessandro, 1976).

T. rangeli is mainly transmitted via saliva and occasionally by feces but is not pathogenic to vertebrates hosts where it is found in low density (D'Alessandro, 1976). However, in triatomines, *T. rangeli* is a good biological control because it can cause histopathological injuries, which can induce difficulties or even have lethal effects in moulting and feeding (Añez et al., 1987; Watkins, 1971). The species in the genus *Rhodnius* are considered the most important vectors of *T. rangeli*, being capable of transmitting the parasite both under natural and experimental conditions (Guhl and Vallejo, 2003). Unlike *T. cruzi* whose development in triatomines is entirely restricted to the gut, *T. rangeli* multiplies in the gut but completes its development in the insect salivary glands, where metacyclogenesis takes place (Añez and East, 1984; Guhl and Vallejo, 2003).

Like *T. cruzi*, *T. rangeli* also lacks mammalian host specificity and has been reported infecting a variety of mammals such Edentata, Rodentia, Carnivora, Primates and Marsupialia (D'Alessandro and Saraiva, 1992). The first report about the presence of *T. rangeli* in

¹ Corresponding author. Tel.: +55 31 33497762; fax: +55 31 32953115. E-mail address: diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br (L. Diotaiuti).
Co-last authors in alphabetical order.

Brazil was done by Deane (1958) in *Didelphis marsupialis* in the state of Pará. In the Brazilian Amazon, Miles et al. (1983) found the mammals *D. marsupialis*, *Metachirus nudicaudatus*, *Tamandua tetradactyla* and *Nasua nasua* infected by *T. rangeli*. However, various studies documented the occurrence of *T. rangeli* in different regions of Brazil – including tropical humid and dry forest (Barrett and Oliveira, 1977; Steindel et al., 1991; Diotaiuti et al., 1992; Ramirez et al., 1998; Dias et al., 2007) – especially in on-human primates like tamarins and marmosets (Maia da Silva et al., 2008).

In the present study, we report on *T. rangeli* sylvatic infection involving the vector *Rhodnius robustus* collected in the palm tree *Attalea phalerata* and the Edentata *T. tetradactyla*, in the Tapajós region of the Brazilian Amazon where natural habitats have been modified by humans. On the sampled vectors, we investigated both the molecular identification of the host-feeding sources and trypanosome infection using respectively sequences of mtDNA cytochrome b gene and ARN nucleolar Cl1 gene (sno-RNA-Cl1) for *T. rangeli* and non-transcribed intergenic region of mini-exon gene for *T. cruzi*.

2. Materials and methods

Triatominae were collected from a palm tree *A. phalerata*, named “uricuri” (S03.98715 W55.55081) in a cattle pasture along the Tapajós River in the community of São Tomé, municipal district of Aveiro, Pará, Brazil. The population of the community near the pasture is composed by 23 families native to the region. Generally, the population lives on self-subsistence, growing corn, rice, beans and manioc, practicing the cultivation after slash and burn. In the surrounding vegetation, *A. phalerata* is constantly associated with *Attalea maripa* (“inaja”) and *Attalea speciosa* (“babaçu”). Although a large part of the vegetation is composed by cleared land and pastures, it is still possible to find fragments of the Amazon forest.

The triatomines sampling and the observation of the anteatr *T. tetradactyla* was realized on May 13th 2009, using palm tree dissection according to Diotaiuti and Dias (1984). The anteatr was removed and walked to the closest palm tree, climbing to its crown.

The insects collected were transferred to the laboratory. Live insects were fed on hens and dead insects were placed in absolute alcohol. The identification of the triatomines was carried out morphologically according to Lent and Wygodzinsky (1979), and molecularly using cytochrome b mtDNA sequences according to Monteiro et al. (2003).

For each triatomines two DNA extractions were performed, first using the legs and thorax of the insects for molecular identification of the triatomines and to confirm infection for *T. rangeli* (DNA A).

A second extraction using the digestive tube containing blood meal was performed to identify the host-feeding sources and to confirm infection for *T. cruzi* (DNA B). This procedure was carried out for third instar nymphs to adults. For first and second instar nymphs, the DNA's extraction was performed with the whole insect (DNA AB). The DNA was extracted using DNease¹ Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA).

For the Polymerase Chain Reaction (PCR), we used DNA A and AB for Triatominae identification with CYTB7432F and CYTB7433R primers (Monteiro et al., 2003) amplifying a 510 bp fragment of cytochrome b gene and for the molecular characterization of *T. rangeli* with the TrF/TrR2 primers (Pavia et al., 2007) amplifying a 620 bp fragment of the sno-RNA-Cl1 gene. We also tested other primers for the characterization of *T. rangeli*, like TrINT/TrINT-1/ TrINT-2 primers for the amplification of the mini-exon gene (Grisard et al., 1999) and S35 and S36 primers that amplifying both kDNA of *T. rangeli* and *T. cruzi* (Sturm et al., 1989).

We used DNA B and AB for PCR targeted vertebrate hosts with the highly conserved primers L14841 (35mer) and H15149 (34mer) designated by Kocher et al. (1989) which amplified a 307 bp segment of cytochrome b gene (excluding primers) from a various panel of vertebrates and successfully used by Malmqvist et al. (2003) to identify the host species of blood feeding black flies. Bugs infection by *T. cruzi* was also checked in these DNA samples using a pool of three primers (TC/TC1/TC2) that amplify the non-transcribed intergenic region of *T. cruzi* mini-exon gene (Souto et al., 1996). DNA extracted from an individual of *Rhodnius prolixus* experimentally infected with *T. rangeli* (Choachi strain) and *T. cruzi* (CL strain) was used as positive controls. For blood meal identification, the PCR reaction was realized in a total volume of 25 mL, including 4–6 mL (20–50 ng) of genomic DNA, 5 mL of 5x Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega), 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTP, 1 U GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega) and 10 mM of each primer and were carried out on a thermal cycler Eppendorf Mastercycler EP Gradients. The others PCR reactions were carried out in a total volume of 10 mL, including 1 mL 5x Green GoTaq[®] Flexi Buffer (Promega), 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTP, 0.5 U GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega) 2 mM of each primer and it was carried out on a thermal cycler Biometra[®] T-1 Termoblock (Germany). The thermal profile for each PCR is found in Table 1. The amplified products were observed in 1% agarose gel, stained with ethidium bromid. PCR products were purified using the Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) and the DNA quantified on Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Termo Fisher Scientific Inc.).

For cytochrome b amplicons, sequence reactions were performed using Bigdye¹ Terminator v3.1 Matrix Standard Kit (Applied Biosystem, UK) and sequence data were obtained using an automatic DNA sequencer (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer sequencer, Applied Biosystem, UK). For the identification of the feeding source DNA

Table 1
The thermal profile for each Polymerase Chain Reaction, with the used primers.

Primers	Target	Thermal profile
L14841 and H15149 ^a S35 and S36 ^b	cyt b mtDNA – blood meal sources kDNA	93 8C/1 min, 30 cycles of 93 8C/1 min, 50 8C/1 min, 72 8C/3 min and 72 8C/5 min 95 8C/5 min, 30 cycles of 95 8C/1 min, 60 8C/1 min, 72 8C/1 min and 72 8C/5 min
TrINT/TrINT1/TrINT2 ^c	Mini-exon gene <i>T. rangeli</i>	94 8C/10 min, 6 cycles of 94 8C/30 s, 45 8C/2 min, 72 8C/30 s, 26 cycles of 94 8C 30 s, 50 8C/1 min, 72 8C/30 s and 50 8C/1 min, 72 8C/5 min
TC/TC1/TC2 ^d	Mini-exon gene <i>T. cruzi</i>	94 8C/5 min, 61 8C/30 s, 72 8C/30 s, 27 cycles of 94 8C 1 min, 61 8C/30 s, 72 8C/1 min and 94 8C/1 min, 61 8C/30 s, 72 8C/10 min
CYTB7432F and CYTB7433R ^e TrF and TrR2 ^f	Molecular characterization of triatomines sno-RNA-Cl1 gene <i>T. rangeli</i>	94 8C/3 min, 38 cycles of 94 8C/30 s, 47 8C/1 min, 72 8C/2 min and 72 8C/10 min 95 8C/5 min, 15 cycles of 95 8C/30 s, 63 8C/1 min, 72 8C/30 s. 20 cycles of 95 8C/30 s, 61 8C/1 min, 72 8C/30 s and 72 8C 5 min

^a Kocher et al. (1989).

^b Sturm et al. (1989) and Vallejo et al. (2002).

^c Grisard et al. (1999).

^d Thermal profile modified of Souto et al. (1996).

^e Monteiro et al. (2003).

^f Thermal profile modified of Pavia et al. (2007).

the sequences were compared to the sequences deposited on the database of GenBank by BLAST searches.

3. Results and discussion

Thirty-one triatomines were found: three first instar nymphs; nine second instar nymphs; seven third instar nymphs; two fourth instar and two fifth instar nymphs; one female and seven males. The cytochrome b DNA sequences from all insects collected in *A. phalerata* ($n = 31$) of the matched with 99% of similarity with that of roBR3m (access EF011714.1) a specimen of *R. robustus* collected in Apuí, Amazonas, Brazil (Monteiro et al., 2003), that confirm the morphological identification of the collected specimens based on the keys established by Lent and Wygodzinsky (1979).

Concerning the identification of the hosts of the bloodsucking insects, the BLAST results performed with the cytochrome b sequences ($n = 14$) obtained with the universal vertebrate primers showed 98% similarity with the *T. tetradactyla* cytochrome b sequence (access AJ421450.1). This Edentata was the role feeding source identified from the blood meal of the bugs collected from the palm tree. We cannot entirely discard multiple feeding sources but direct sequencing gave reliable sequences without profiles showing a mix of sequences. Moreover, the triatomines fed at the laboratory presented, as expected, 100% similarity with *Gallus gallus* cytochrome b sequence (access EU839454.1), demonstrating the accuracy at these primers for host-feeding source studies.

In the present study, we used molecular markers for the identification of the trypanosomes because the large morphological variability found among *T. rangeli* and *T. cruzi* is already known and could lead to misidentifications. Of the 31 triatomines collected, 25 amplified the fragment of 620 bp which corresponds to the ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) repetitive gene for *T. rangeli*, giving an infection rate of 80.6% (Fig. 1). Moreover, we tested the primers S35 and S36 designed on the *T. cruzi* kDNA minicircle conserved regions (Sturm et al., 1989), but it also hybridized with *T. rangeli* kDNA minicircles due to the high homology between these parasites (Vallejo et al., 2002). Nevertheless, the ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) repetitive gene showed more sensitivity to identifying infection for *T. rangeli* in the triatomines analyzed. However, no amplification of the non-transcribed intergenic region of *T. cruzi* mini-exon gene was observed in the *R. robustus* sample but just in positive controls.

Among the infected bugs, three first instar nymphs completely engorged exhibited *T. rangeli* infection. Since *T. tetradactyla* was the unique feeding source detected in the blood meal of these bugs, this Edentata is more likely the potential host of *T. rangeli* even if

the evaluation of infection by *T. rangeli* directly from this anteatr was not performed in this study.

T. tetradactyla is included in the list of sylvatic reservoirs of *T. cruzi* presented by Barretto (1979). However, the only report about the infection by *T. rangeli* of animals from the Xenarthra order in Brazil was published by Miles et al. (1983). These authors isolated 46 strains of *T. rangeli* from mammals and Triatominae, including *R. robustus*. The criteria adopted for identification of *T. rangeli* on the collected vectors were (i) natural or experimental infection of triatomines' salivary glands; (ii) inoculation of parasite through bite (via saliva) in mice; (iii) morphological parameters of parasitemia in mice and (iv) comparison of the isozymes profiles with a characterized strain of *T. rangeli*. However, three isolates, including the strain of *T. tetradactyla*, were characterized only based on the morphology of cultured parasites.

In the study region, palm trees are the dominant vegetation on cattle pastures. Thus, the palm trees are the only shelter for animals of larger size as anteatr. The presence of *T. tetradactyla* inhabiting the palm tree's crown, associated with the feeding sources of triatomines and the high infection rate by *T. rangeli*, suggests that the *T. tetradactyla* can be an important reservoir of *T. rangeli* and carry the parasite within the Brazilian Amazon region.

Because of the biological similarities between *T. rangeli* and *T. cruzi*, good taxonomical markers are needed in order to correctly evaluate the epidemiological risks and reduce difficulties for the diagnosis of Chagas disease. In this study, we showed that the ARN nucleolar C11 (sno-RNA-C11) repetitive gene gives reliable amplification of *T. rangeli* from dead triatomines kept in alcohol. The use of this molecular marker could enhance understanding of the geographical distribution of the parasite. Moreover, the identification of feeding sources of *R. robustus* helps to a better understanding of the transmission dynamics of the *T. rangeli* and of the role of the Edentata *T. tetradactyla* as reservoirs of trypanosomes in Amazon region. The epidemiology of *T. rangeli* will be improved with the analysis of more mammalian hosts and vectors especially from not yet investigated geographical areas.

Conflict of interest

No conflict of interest related to this article for all authors.

Ethical statement

This study strictly followed the ethical codes of Brazil. The sampling was carried out in full compliance with the Brazilian laws (IBAMA authorization no.: 16485-2, 27/06/2008).

Financial support

This study has been financed by the International Research Program, the "PLUPH" project (Poor land use, poor health: primary prevention of human health through sound land use for small-scale farmers of the humid tropics) supported by the Canadian Global Health Research Initiative and coordinated by M. Lucotte (Université du Québec, Montréal, Canada) and J. Drummond (Universidade de Brasilia, Brazil).



Acknowledgments

We thank the community in which this study was carried out for allowing the sampling and helping in the field work, Dra. Alessandra A. Guarneri for the triatomines infected in laboratory and Jordan Sky Oestreicher for revising the paper.

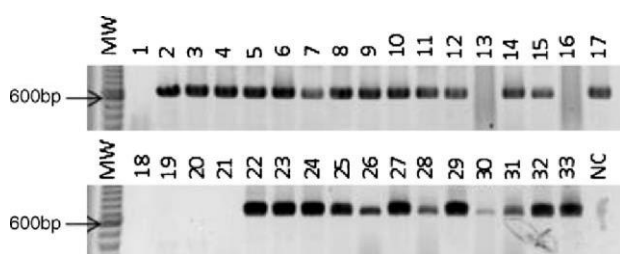


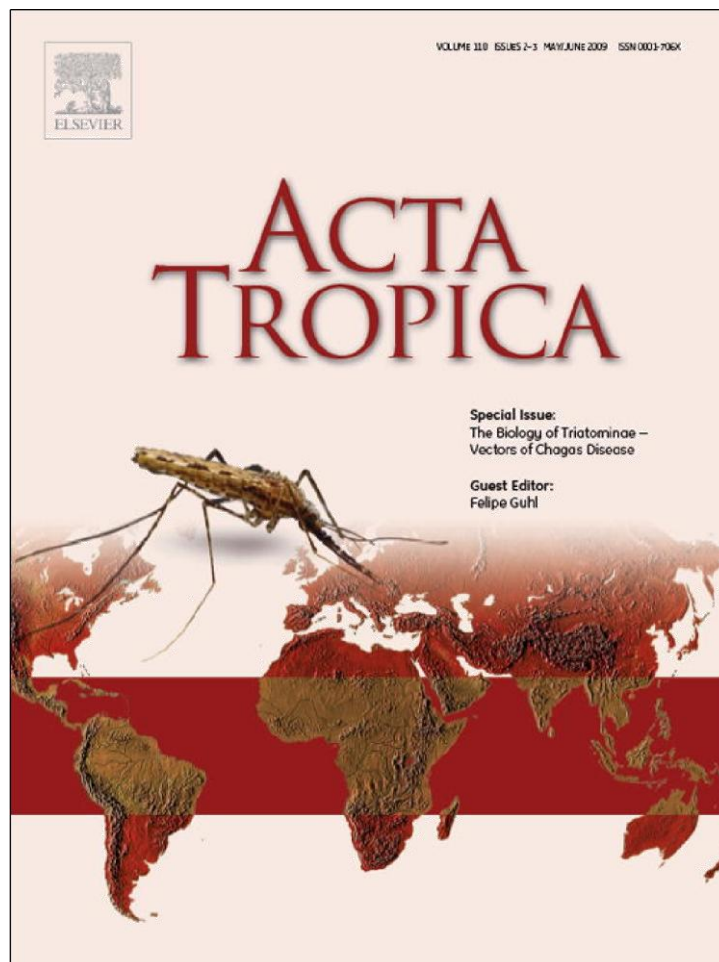
Fig. 1. Polymerase Chain Reaction amplification products using the primers TrF/ TrR2 for characterization of *T. rangeli*. MW – standard for molecular weight (Ladder 100 bp), lanes: 1 – *R. prolixus* infected in laboratory with *T. cruzi* (strain CL); 2 – *R. prolixus* infected in laboratory with *T. rangeli* (strain Choachi); lanes 3 a 33: *R. robustus* collected in the *A. phalerata* palm tree: 3–5 – 1st stage nymphs; 6–14 – 2nd stage nymphs; 15–20 and lane 33 – 3rd stage nymphs; 21 and 22 – 4th stage nymphs; 23 and 24 – 5th stage nymphs; 25 – female; 26–32 – males, NC – negative control of reaction (no DNA add); MW – molecular weight.

References

- Añez, N., East, J.S., 1984. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. II. Its effect on feeding behaviour of triatomine bugs. *Acta Trop.* 41, 93–95.
- Añez, N., Nieves, E., Cazorla, D., 1987. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 1–6.
- Barretto, M.P., 1979. Epidemiologia. In: Brener, Z., Andrade, Z. (Eds.), *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, (cap. 3), pp. 89–151.
- Barrett, T.V., Oliveira, T.S., 1977. A *Trypanosoma* indistinguishable from *Trypanosoma rangeli* in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 445–446.
- D'Alessandro, A., 1976. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of Kinetoplastida*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 327–403.
- D'Alessandro, A., Saraiva, N.G., 1992. *Trypanosoma rangeli*, Parasitic Protozoa, 2nd ed., vol. 2. Academic Press, San Diego, pp. 1–54.
- Deane, L.M., 1958. Novo marspedeiro de tripanosomas dos tipos *cruzi* e *rangeli* no Estado do Pará. O marsupial *Metachirops opossum opossum*. *Rev. Bras. Malar. D. Trop.* 10, 531–541.
- Dias, F.B.S., Diotaiuti, L., Romanha, A.J., Bezerra, C.M., Machado, E.M.M., 2007. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 643–645.
- Diotaiuti, L., Dias, J.C.P., 1984. Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 293–301.
- Diotaiuti, L., Silveira, A.C., Elias, M., Steindel, M., 1992. The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the state of Tocantins, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87, 451.
- Grisard, E.C., Campbell, D.A., Romanha, A.J., 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology* 118, 375–382.
- Guhl, F., Vallejo, G.A., 2003. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920—an updated review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 435–442.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6196–6200.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163 (New York).
- Maia da Silva, F., Naiff, R.D., Marcili, A., Gordoc, M., D'Affonseca Neto, J.A., Naiff, M.F., Franco, A.M.R., Campaner, M., Valente, V., Valente, S.A., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., Miles, M.A., 2008. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Saguinus bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop.* 107, 168–173.
- Malmqvist, B., Strasevicius, D., Hellgren, O., Adler, P.H., Bensch, S., 2003. Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* 271, 152–155.
- Miles, M.A., Arias, J.R., Valente, S.A.S., Naiff, R.D., Souza, A.A., 1983. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1251–1259.
- 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*. *Mol. Ecol.* 12, 997–1006.
- Pavia, P.X., Vallejo, G.A., Montilla, M., Nicholls, R.S., Puerta, C.J., 2007. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone h2a/sire and the sno-rna-cl1 genes. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49, 23–30.
- Ramirez, L.E., Machado, M.I., Maywald, P.G., Matos, A., Chiari, E., Silva, E.L., 1998. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31, 99–102.
- Souto, R., Fernandes, O., Macedo, A., Campbell, D., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152.
- Steindel, M., Carvalho-Pinto, J.P., Toma, H.K., Mangia, H.R., Ribeiro-Rodrigues, R., Romanha, A.J., 1991. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimys dasytrix*) in Santa Catarina island, Santa Catarina state: first report of this trypanosome in southern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 73–79.
- Sturm, N.R., Degraeve, W., Morel, C., Simpson, L., 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 205–214.
- Vallejo, G.A., Guhl, F., Carranza, J.C., Lozano, L.E., Sa'nchez, J.L., Jaramillo, J.C., Gualtero, D., Castañeda, N., Silva, J.C., Steindel, M., 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop.* 81, 77–82.
- Watkins, R., 1971. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J. Invertebr. Pathol.* 17, 59–66.

7.7 Outras Publicações

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae)

Fernando Abad-Franch^{a,*}, Fernando A. Monteiro^b, Nicolás Jaramillo O.^c,
Rodrigo Gurgel-Gonçalves^{d,e}, Fernando Braga Stehling Dias^f, Liléia Diotaiuti^f

^a Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia, Rua Teresina 476, CEP 69057-070 Manaus, Amazonas, Brazil

^b Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Av. Brasil 4365, CEP 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Sede de Investigaciones Universitarias – SIU, Calle 62, no. 52-59, Medellín, Colombia

^d Laboratório de Parasitologia Médica e Biologia de Vetores, Faculdade de Medicina, Área de Patologia, Universidade de Brasília, Asa Norte, CEP 70.910-900 Brasília, DF, Brazil

^e Laboratório de Zoologia, Universidade Católica de Brasília, QS 07 Lote 01 EPTC Bloco M, sala 331, CEP 72030-170 Brasília, DF, Brazil

^f Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, CEP 30190-002 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

article info

Article history:

Available online 21 June 2008

Keywords:

Rhodniini
Triatominae
Rhodnius neglectus
Rhodnius nasutus
Biogeography
Ecology
Species richness
Species composition
Evolution
Chagas disease surveillance

abstract

Chagas disease incidence has sharply declined over the last decade. Long-term disease control will, however, require extensive, longitudinal surveillance systems capable of detecting (and dealing with) reinvasion-reinfestation of insecticide-treated dwellings by non-domiciliated triatomines. Sound surveillance design calls for reliable data on vector ecology, and these data must cover different spatial scales. We conducted a multi-scale assessment of ecological and evolutionary trends in members of the tribe Rhodniini, including (i) a macroscale analysis of Rhodniini species richness and composition patterns across the Americas, and (ii) a detailed, mesoscale case-study of ecological and behavioural trends in *Rhodnius neglectus* and *R. nasutus*. Our macroscale overview provides some comprehensive insights about key mechanisms/processes probably underlying ecological and genetic diversification in the Rhodniini. These insights translate into a series of testable hypotheses about current species distributions and their likely causes. At the landscape scale, we used geometric morphometrics to identify dubious specimens as either *R. neglectus* or *R. nasutus* (two near-sibling species), and studied palm tree populations of these two vector taxa in five geographical areas. The data suggest that deforestation and the associated loss of habitat and host diversity might increase the frequency of vector–human contact (and perhaps *Trypanosoma cruzi* infection rates in vectors). Surveillance in central-northeastern Brazil should prioritise deforested land-scapes where large palm trees (e.g., *Attalea*, *Mauritia*, *Copernicia*, *Acrocomia* or *Syagrus*) occur near houses. We anticipate that, by helping define the distribution patterns and ecological preferences of each species, multi-scale research will significantly strengthen vector surveillance systems across Latin America.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a parasite transmitted by blood-sucking reduviid bugs (Triatominae) (Chagas, 1909; Coura, 2007). Human infection is endemic throughout Latin America, where its associated burden is larger than the combined burden of malaria, leprosy, leishmaniasis, filariasis, schistosomiasis, dengue, and the major intestinal nematode infections (WHO, 2004; Mathers et al., 2006). In the last 10–15 years, *T. cruzi* transmission to people has nonetheless been interrupted over vast areas of southern South America, with an estimated 73% reduction in incidence and sharp declines in burden figures

(World Bank, 1993; Morel and Lazdins, 2003; Mathers et al., 2006). These successful control programmes prioritised elimination of domestic triatomines (through the spraying of households with residual insecticides) and systematic serological screening of blood donations (Anonymous, 2007).

One major hindrance for the long-term consolidation of effective disease control is the widespread occurrence of native triatomine species that reinvade and sporadically reinfest insecticide-treated households (Miles et al., 2003; Coura, 2007). Both ecological and evolutionary factors are involved in these dispersion-colonisation dynamics, but their relative roles remain poorly understood (Abad-Franch and Monteiro, 2007).

In this paper we suggest that the complex interactions involved in sustained *T. cruzi* transmission by sylvatic triatomines are hierar-

* Corresponding author. Tel.: +55 92 36212401/36212323; fax: +55 92 36212363.
E-mail address: fernando@amazonia.fiocruz.br (F. Abad-Franch).

chically structured in space, and that considering different spatial scales may, therefore, significantly improve our ability to understand these transmission dynamics. Following this rationale, we present a multi-scale appraisal of ecological and evolutionary trends in a monophyletic group of triatomines, the tribe Rhodniini. This tribe encompasses species displaying different degrees of synanthropic behaviour, from primary domestic vectors to strictly sylvatic taxa. In the first part we present a macroscale (continental) analysis of Rhodniini diversity patterns across the Americas. The second part presents a detailed, mesoscale (ecoregional) case-study of ecological and behavioural trends in two secondary vectors of Chagas disease, the near-sibling *R. neglectus* and *R. nasutus*. Systematic, biogeographical, and ecological issues are discussed throughout the text. We argue that this multi-scale approach may substantially strengthen vector surveillance by helping allocate resources to priority areas; in more academic terms, it may at the same time prove crucial in fostering the emergence of a coherent account of the evolution and behavioural trends of the Triatominae.

1. Macroscale biogeographical patterns and ecology of the members of the tribe Rhodniini

1.1. Introduction

Species richness (the number of types in a given community or geographical region, or alpha-diversity) is a major component of biological diversity estimates (Gotelli and Colwell, 2001; Mittermeier et al., 2003). Information on the presence/absence of species (or other taxonomic units within a given lineage) over a set of different ecological regions may also be used, in combination with phylogenetic reconstructions, to derive and contrast biogeographical and evolutionary hypotheses regarding that lineage (e.g., Ribas et al., 2005; Conn and Mirabello, 2007). Conversely, species distribution data can provide insights on the patterns of current ecological relatedness among geographical areas (e.g., Ron, 2000; Porzecanski and Cracraft, 2005).

When the focus of research is a lineage of human disease vectors, the study of ecological and (current or historical) biogeographical patterns is not only of academic interest. For instance, it may also help define the potential geographical ranges of species that are more efficient vectors (or of the clades containing those species), and this information can in turn be used to stratify disease transmission risk in spatially explicit analytical frameworks (Ostfeld et al., 2005). Biogeographical-evolutionary analyses can also provide clues as to the evolution of disease vector traits (such as synanthropism, or the capacity of successfully adapting to breed in man-made ecotopes) that are spatially correlated with epidemiological indicators (such as disease prevalence in humans). In the case of triatomine bugs, the combination of long-lasting field research and novel analytical tools is opening research avenues that may lead to improved chances of effectively controlling Chagas disease transmission in the long term (Monteiro et al., 2001; Miles et al., 2003; Abad-Franch and Monteiro, 2005). One particularly difficult challenge to this goal is the persistent reinvasion and (more rarely) reinfestation of insecticide-treated households by sylvatic triatomines; understanding the ecological and evolutionary dynamics involved in these events may prove crucial for the design of adequate vector surveillance strategies, and the contribution of broad-scale biogeographical insights can be key to such efforts (Forattini, 1980; Miles et al., 2003; Schofield et al., 2006; Abad-Franch and Monteiro, 2007; de Paula et al., 2007).

The Rhodniini constitute a particularly interesting case-study lineage for biogeographical research. They are a monophyletic assemblage of 19 named species within two genera (the monophyletic

Psammolestes [three species] and the paraphyletic *Rhodnius* [16 species]) that occur naturally in 25–27 biogeographical provinces (*sensu* Morrone, 2006) in the Neotropical Region (Abad-Franch and Monteiro, 2007). They are arboricolous (tree-living), blood-sucking true bugs, most of them primarily associated with palm tree crown habitats. A few taxa occur in ecotopes other than palms; for instance, the three known *Psammolestes* species seem to have specialised to exploit bird nest microhabitats in open woodlands (Lent and Wygodzinsky, 1979). *R. prolixus*, the main vector of human Chagas disease in Central and northern South America (and probably worldwide after the elimination of domestic *Triatoma infestans* populations from large areas of South America), belongs to this tribe. Another moderately important, synanthropic vector is *R. ecuadoriensis*, and four species (*R. pallenscens*, *R. neglectus*, *R. nasutus*, and *R. stali*) invade and sporadically colonise human environments. In Amazonia, palm tree populations of *R. robustus sensu lato*, *R. pictipes*, and *R. brethesi* act as sources of adult adventitious bugs that invade (but do not colonise) houses, contaminate food-processing equipment, or attack forest workers (cf. Coura et al., 2002; Aguilar et al., 2007). Other species within the tribe seem to have little or no contact with humans (Barrett, 1991).

Here we present a broad-scale analysis of biogeographical patterns among members of the tribe Rhodniini across continental Latin America. Our (mostly descriptive) survey explores spatial trends of regional difference/similarity in terms of Rhodniini species richness and composition both for individual ecoregions and for larger ecoregion clusters matching previously postulated areas of endemism. The results, which are to be regarded as informed biogeographical hypotheses, are discussed in relation to the ecology of individual species and species groups and to the evolutionary history of each lineage.

1.2. Materials and methods

Presence records were compiled (and refined) from the literature (mainly Carcavallo et al., 1999 and Galvão et al., 2003, with newer data from Colombia [Guhl et al., 2007], Peru [Chávez, 2006], Central America [Zeledón et al., 2006], and Amazonia [Abad-Franch and Monteiro, 2007]), and from our field research activities, for each species within the tribe Rhodniini. Well-characterised mitochondrial lineages were treated as distinct entities whenever enough data were available. Following operational guidelines derived from DNA barcoding (e.g., Hebert et al., 2003a,b, 2004; Miller, 2007; Ratnasingham and Hebert, 2007), any mitochondrial cytochrome *b* (*cytb*) gene monophyletic lineage that differed by over 0.02 Kimura 2-parameter distance from its sister lineage was treated as a distinct operational taxonomic unit (OTU) (cf. Blaxter et al., 2005; see also Avise and Walker, 1999; Pons et al., 2006). Thus, *R. robustus* was treated as a complex of five OTUs (I–V) (Monteiro et al., 2003; Abad-Franch and Monteiro, 2007; Pavan and Monteiro, 2007), and *R. ecuadoriensis* was divided into two groups (I and II) (Abad-Franch et al., 2004). A novel, highly divergent *cytb* genotype recently isolated from bugs resembling *R. pictipes* and collected in the Colombian Sierra Nevada de Santa Marta (NJO and FAM, unpublished) was also treated as distinct (*Rhodnius* n.sp. aff. *pictipes*). An apparently new species from northwestern Amazonia (basal to the *robustus* species group), detected by DNA barcoding (Abad-Franch and Monteiro, 2005), was also considered as a separate entity (*Rhodnius* n.sp. aff. *robustus*). Recent data suggest that a similar treatment is valid for two well-differentiated *R. pallenscens* lineages (I and II) (NJO and FAM, unpublished). Thus, a total number of 27 OTUs was incorporated into our survey (Table 1).

We defined the distribution patterns of each OTU across the continental ecoregions of Latin America proposed by the World Wildlife Foundation (WWF-TNC, 2001; see also Olson et al., 2001).

Table 1

Biogeographical patterns of 27 species/taxonomic units within the tribe Rhodniini: presence/absence records across 68 Neotropical ecoregions and 11 areas of endemism.

Area	MN Ecoregion	Operational Taxonomic Units																											N		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
Trans-Andean	- Central American Atlantic m.f.	■																												1	
	- Isthmian-Pacific m.f.	■																													1
	- Chocó/Darién m.f.	■																													1
	- Magdalena/Urabá m.f.	■	■																												2
	1 Guajira/Barranquilla x.sc.		■	■					■	■																					3
	2 Santa Marta mn.f.		■	■	■				■	■																					3
	- Sinú Valley d.f.		■	■					■	■																					2
	- Cordillera Oriental mn.f. (T-A side)		■	■					■	■																					2
	- Magdalena Valley mn.f.		■	■																											2
	- Magdalena Valley d.f.		■	■																											2
	- Northwestern Andean mn.f.				■	■																									1
	- Western Ecuador m.f.					■	■																								1
	- Ecuadorian d.f.					■	■																								1
	- Tumbes/Piura d.f.					■	■																								2
	- Central Andean wet puna						■																								1
Orinoco	3 Paraguaná x.sc.							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5	
	4 Maracaibo d.f.							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5	
	5 Lara/Falcón d.f.							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5	
	6 La Costa x.s.							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	4	
	7 Catatumbo m.f.							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3	
	8 Venezuelan Andes mn.f.							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3	
	9 Apure/Villavicencio d.f.							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	6	
	10 Orinoco Delta swamps and wetlands							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	4	
	11 Llanos							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5	
	12 Cordillera Oriental mn.f. (Or side)							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	6	

F. Abad-Franch et al. / Acta Tropica 110 (2016) 159–177

Area	MN	Ecoregion	Operational Taxonomic Units																											N	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
Rondônia	31	Madeira/Tapajós m.f.										■	■			■						■	■			■	■			6	
Pará	32	Tapajós/Xingu m.f.									■	■										■	■							5	
	33	Xingu/Tocantins-Araguaia m.f.										■	■							■			■	■						6	
Belém	34	Mato Grosso tropical d.f.										■	■									■	■							5	
	35	Tocantins-Araguaia/Maranhão m.f.										■	■							■			■	■						8	
Open/Dry Corridor	36	Maranhão babaçu forests									■	■									■	■								7	
	37	Caatinga																												3	
Atlantic/Humid Corridor	38	Northeast Brazil d.f.																												3	
	39	Cerrado																					■	■			■	■		6	
	40	Chiquitania d.f.																												4	
	41	Pantanal																												5	
	-	Bolivian montane d.f.																												1	
	-	Chaco savannahs																												2	
	-	Andean yungas																												1	
	-	Pernambuco c. and i.f.																													1
	-	Bahia i.f.																													2
	-	Bahia c.f.																													1
-	Humid Chaco																													1	
-	Paraná/Paraíba i.f.																													3	
-	Brazilian <i>Aracaria</i> m.f.																													1	
-	Serra do Mar c.f.																													1	
-	Mesopotamian savannahs																													1	
Total			4	7	1	2	4	2	8	14	6	13	37	12	5	16	2	6	3	5	2	22	7	3	11	8	12	9	5		

Table 1 is a presence/absence matrix in which lines are ecoregions (following WWF-TNC, 2001) and columns are operational taxonomic units (OTUs) within the tribe Rhodniini. Ecoregions were grouped into larger areas of endemism (first column). Ecoregions where more than two OTUs have been recorded were numbered following the codes of Fig. 1 (second column, where "MN" means Map Number). OTUs are numbered (columns 1 to 27) as follows: (1) *Rhodnius pallescens* I, (2) *R. pallescens* II, (3) *Rhodnius* n.sp. aff. *pictipes*, (4) *R. colombiensis*, (5) *R. ecuadoriensis* I, (6) *R. ecuadoriensis* II, (7) *R. neivai*, (8) *R. prolixus*, (9) *Psammolestes arthuri*, (10) *R. robustus* I, (11) *R. pictipes*, (12) *R. robustus* IV, (13) *R. dalessandroi*, (14) *R. brethesi*, (15) *Rhodnius* n.sp. aff. *robustus*, (16) *R. robustus* V, (17) *R. amazonicus*, (18) *R. paraensis*, (19) *R. milesi*, (20) *R. robustus* II, (21) *R. robustus* III, (22) *R. nasutus*, (23) *R. neglectus*, (24) *R. stali*, (25) *Ps. tertius*, (26) *Ps. coreodes*, and (27) *R. domesticus*. Factual presence records are represented by black cells in the matrix; grey cells indicate that the OTU is probably present in the ecoregion, even if we could not find any factual records. The last column (labelled "N") is the total number of OTUs present (including those probably present) in each ecoregion. The last line (labelled "Total") is the total number of ecoregions where each OTU occurs (including those where it very probably occurs). The following abbreviations were used in ecoregion names: m.f., moist forests; d.f., dry forests; mn.f., montane forests; x.sc., xeric scrub; x.s., xeric shrublands; sw.f., swamp forests; c.f., coastal forests; i.f., interior forests; T-A, *trans*-Andean; Or, Orinoco (these two latter were used to indicate that the Cordillera Oriental montane forests occur on both the *trans*-Andean and the Orinoco [*cis*-Andean] sides of the northeastern Colombian Andes, especially between 5° and 7° N in the Departments of Santander and Norte de Santander). Further methodological details can be found in the main text of this paper.

Presence records were not available for several OTUs over their whole probable range. We overcame this limitation by deriving “probable presence” through interpolation (and in a few cases extrapolation) of factual records across contiguous ecoregions with similar overall ecological characteristics. This procedure was relatively straightforward in most instances but problematic in a few; the main adverse effect of these latter cases would be an unwarranted increase in similarity between areas because of spurious OTU sharing. In this sense, some of the results we present here must be viewed as proximal biogeographical hypotheses to be confirmed or rejected by further field data.

Raw OTU counts from each ecoregion were plotted onto a vegetation/elevation map of Latin America (TNC, 2001) to graphically display richness patterns (Fig. 1).

Ecoregions were grouped into eleven major clusters for Parsimony Analysis of Endemicity (PAE) (Rosen, 1988; Rosen and Smith, 1988) and phenetic analyses (e.g., Condit et al., 2002). Ecoregion groupings (Table 1) largely followed Haffer's (1969) centres of endemism for Amazonian lowland forests, which were used to derive the Refuge hypothesis of biotic diversification (Haffer, 1969, 1997). Ecoregions south of Amazonia were grouped into two clusters: the Open/dry and the Atlantic/humid corridors (see Porzecanski and Cracraft, 2005); finally, all *trans*-Andean ecoregions were treated as a single area. PAE is a procedure equivalent to phylogenetic cladistic analysis in which localities/areas are treated as taxa and OTUs as two-state (presence/absence) characters (e.g., Ron, 2000; Racheli and Racheli, 2004; Garzón-Orduná et al., 2007). Cladistic analysis of Rhodniini OTU presence/absence patterns was

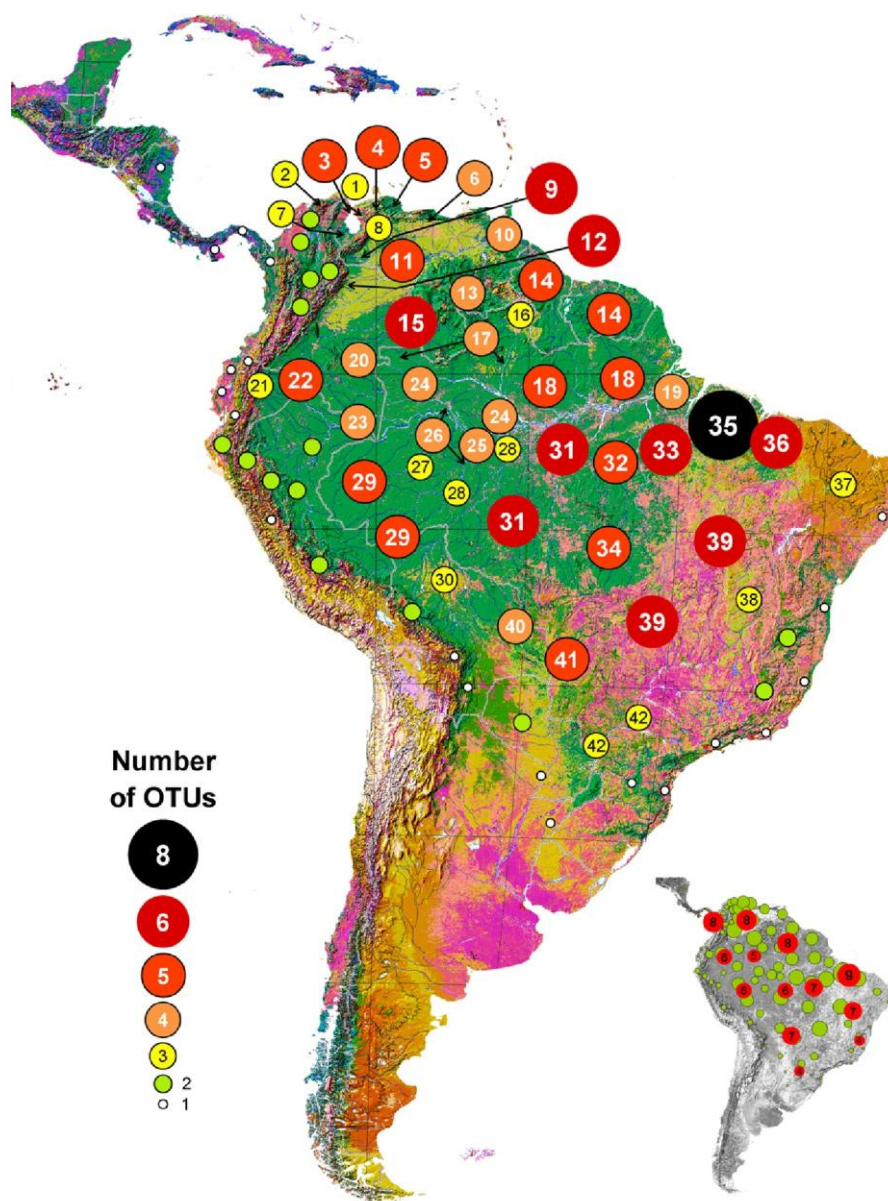


Fig. 1. Continental-scale alpha-diversity patterns of the Rhodniini: raw number of species/operational taxonomic units (OTUs) recorded (or probably present) in each of 68 Neotropical ecoregions. Ecoregion classification follows WWF-TNC (2001), and ecoregion identification numbers (inside circles) match those listed in Table 1. Circles were overlaid on the approximate core area of each ecoregion; arrows were used in the case of small ecoregions, and two circles were drawn in the case of particularly large ones. Circle size is proportional to the number of OTUs recorded in the corresponding ecoregion; for the sake of clarity, ecoregions where only one or two OTUs occur were not numbered (their names are presented in Table 1, and they can be located by consulting the original WWF-TNC map [WWF-TNC, 2001]). The small map summarises OTU richness by area of endemism (as defined in Fig. 2).

thus performed on an 11-area, 27-taxon matrix. We used standard maximum parsimony with a branch-and-bound search algorithm as implemented in Mega 3.1 (Kumar et al., 2004). Singletons in this kind of data matrix are species endemic to single regions (narrow endemics), while parsimony-informative “sites” are OTUs shared by two or more regions. Trees were rooted with a hypothetical all-absence outgroup region. Additionally, we calculated pairwise dissimilarity matrices among areas based on the Jaccard’s and Sorensen’s measures of the fraction of shared species (cf. Condit et al., 2002), and used them as input to derive cladograms using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Jaccard’s dissimilarity index is given by $DJ = 1 - [S_{12}/(S_1 + S_2 - S_{12})]$, and Sorensen’s index by $DS = 1 - [S_{12}/(0.5 [S_1 + S_2])]$; in both cases, S_{12} is the number of species shared by areas 1 and 2, S_1 is the total number of species in area 1, and S_2 is the total number of species in area 2.

1.3. Results and discussion

1.3.1. Patterns of OTU richness

The Rhodniini occur naturally from Central America (approx. 15° N) to northern Argentina (approx. 33° S). This tribe probably conceals more alpha-systematic diversity than described by the 19 species hitherto recognised (Galvão et al., 2003). We found phylogenetic evidence to define eight further taxonomic units for our biogeographical survey (Abad-Franch et al., 2003a,b; Abad-Franch and Monteiro, 2005, 2007; Monteiro et al., 2003; Pavan and Monteiro, 2007; FA-F, NJO and FAM, unpublished data). Some of these new taxonomic units indubitably deserve specific status, while others are relatively young monophyletic lineages that may be hypothesised to represent ‘good species’ or, for the purposes of our study, ‘good OTUs’ (see Hebert et al., 2003a,b; Blaxter et al., 2005; Pons et al., 2006; Ratnasingham and Hebert, 2007).

Overall, these 27 Rhodniini OTUs have been recorded to occur in 68 ecoregions—from the Central American Atlantic moist forests to the Mesopotamian savannahs of northeastern Argentina, and from very humid (e.g., the Napo moist forests) to very arid (e.g., the Peruvian coastal dry forests) ecoregions (Figs. 1 and 2). Visual inspection of Fig. 1 suggests that species (OTU) richness is higher in Amazonia (particularly in southeastern ecoregions) and in the two drier biomes adjacent to Amazonia to the north (the greater Orinoco) and to the south (the Cerrado). The main richness “hotspot” corresponds to the Tocantins-Araguaia/Maranhão moist forests, from where six OTUs have been recorded and where two more are likely to occur. The Belém area of endemism, which encompasses this ecoregion and the Maranhão babaçu forests (dominated by *Attalea speciosa* palm trees), probably harbours at least nine Rhodniini OTUs (Table 1). OTU numbers per ecoregion decrease substantially beyond the boundaries of the Orinoco-Amazonia-Cerrado area. There are also signals of heterogeneity within Amazonia, where a cluster of relatively species-poor ecoregions (numbers 17, 20 and 23–28 plus four ecoregions in the Peruvian Amazon) appears in the central/central-western subregion (Fig. 1). These ecoregions are related to several large rivers (Branco, Negro, lower Napo, upper Solimões-Marañón, Juruá, Purus, the left bank of the Madeira, and parts of the Amazon itself) and to extensive flooded forest regions within white-water systems (the várzea).

When sorted according to latitude, the distribution of OTU numbers across areas of endemism is bimodal, with lower values corresponding to (a) central/central-western Amazonia (Imeri, Inambari and Rondônia) and (b) the southeastern Atlantic/humid corridor, with one narrow endemic and three OTUs shared with the open/dry corridor (Fig. 2).

One interpretation of these patterns could be that richer areas (the Orinoco basin, southeastern Amazonia, and the Cerrado) correspond

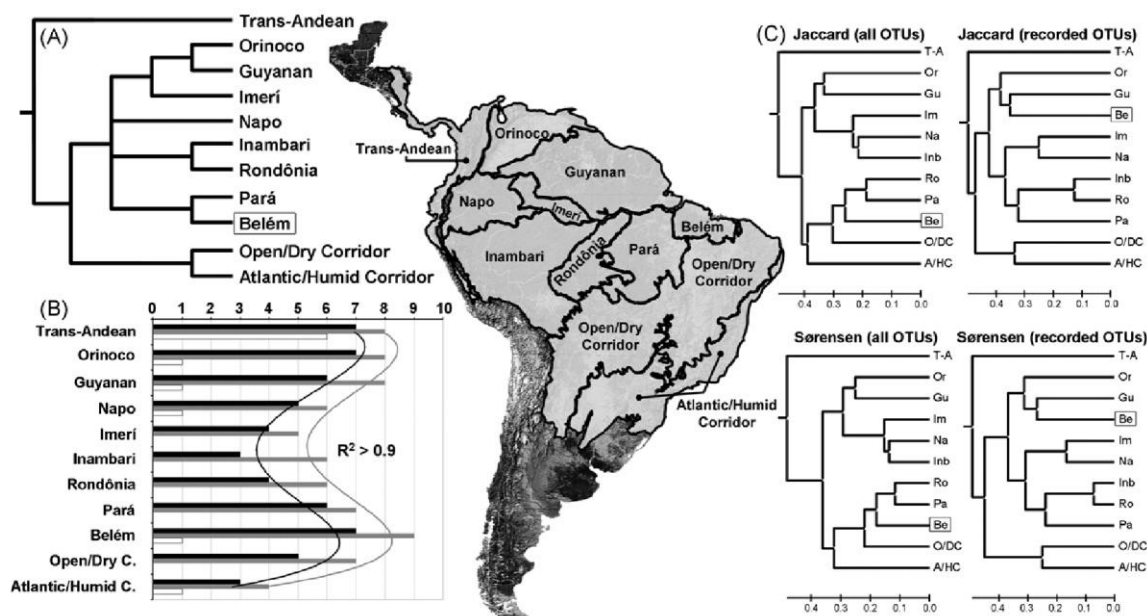


Fig. 2. Patterns of relatedness among eleven areas of endemism (AEs) in terms of the composition of Rhodniini species/operational taxonomic units (OTUs). The AEs are presented in the map. (A) Parsimony Analysis of Endemism (PAE): majority-rule consensus tree (from 102 equally parsimonious, 39-step trees found using a branch-and-bound search algorithm); only confirmed presence records were used for the analysis; consistency index was 0.69, and retention index 0.54. The basal split of the *trans*-Andean area was not resolved in the original cladogram, but clearly follows from the fact that six out of seven *trans*-Andean OTUs are narrow endemics. It should be noted that PAE cladograms depict mainly contemporary patterns of relatedness among areas—and not historical processes of diversification. (B) Raw OTU richness by AE: black bars indicate the number of OTUs recorded, and grey bars the number of OTUs present or probably present, in each AE (fourth-order polynomial fits are presented for each of these variables; R^2 was >0.9 for both fits); white bars represent the number of narrow endemics (‘autapomorphic OTUs’) in each AE. (C) UPGMA cladograms derived from Jaccard’s and Sorensen’s indices of dissimilarity: cladograms were produced for both the dataset with only confirmed records (“recorded OTUs”) and the dataset including also OTUs probably present in each area (“all OTUs”). The unstable position of the Belém area of endemism (the main OTU richness “hotspot”) is highlighted by a box.

to the centres of endemism where the parental lineages of extant OTUs diversified. This interpretation derives from the view that higher current diversity signals more dynamic past diversification, and that later events (emigration, immigration, and extinction) did not overwhelm that signal. Also plausible is the idea that at least some of these OTU rich-areas are contact zones where representatives of formerly allopatric or parapatric lineages live now in sympatry.

This latter view seems compatible with the observation that rich ecoregions (those with ≥ 6 OTUs) tend to share boundaries with areas of endemism other than the one they belong to; two apparent exceptions (out of seven) correspond to border ecoregions between Andean montane and lowland dry forests within the Orinoco system. All these “hotspot” ecoregions tend to contain OTUs that most likely evolved elsewhere and secondarily colonised them through dispersal (see below).

Under this scenario, the pattern of relatively low OTU richness in a cluster of central-western Amazonian ecoregions could be interpreted as the “null pattern” for large, relatively homogeneous ecoregion clusters. Extensive annual white-water floods across this subregion may also affect Rhodniini diversity by limiting the local diversity of large palms; thus, several *Attalea*, *Oenocarpus*, *Syagrus*, and (to a lesser extent) *Astrocaryum* species occur mainly in upland forests on well-drained soils and may be absent or rare in the várzea (Kahn, 1990). Finally, and perhaps most interestingly, this low-richness subregion visibly matches the location of the Miocene Lake Pebas, which was a major consequence of the Miocene/Pliocene marine transgression. The large Pebas zone is expected to harbour a limited number of OTUs derived from upland lineages—those with a history of diversification in areas that remained above inundation level during the late Tertiary (mainly the Guyanan and central Brazilian Precambrian shields plus the eastern Andes foothills) (cf. Nores, 1999; Aleixo, 2004; Aleixo and Rosetti, 2007; Conn and Mirabello, 2007). This was seemingly the case for several Rhodniini lineages (see below).

At this broad scale, the patterns described so far seem compatible with the hypothesis that the Rhodniini first evolved in the humid forests of the Amazon-Orinoco system (Abad-Franch and Monteiro, 2007). Ignoring OTUs not tightly associated with palms at present (the *Psammolestes*, *R. paraensis*, *R. neivai*, *R. domesticus*, and the central Peruvian forms [group II] of *R. ecuadoriensis*), there also seems to be a rough parallel between Rhodniini OTU counts and Neotropical palm species richness (cf. Bjorholm et al., 2005, 2006). The most conspicuous exceptions (palm-rich/Rhodniini-poor regions) to this trend are the Chocó (the most palm-rich area in the Americas) and the Brazilian Atlantic moist forests, both far from the Amazon-Orinoco core region. This view also receives support from the observation that different Rhodniini species have been recorded from representatives of all four Neotropical palm sub-families (see Asmussen et al., 2006). The Arecoideae are thought to be of Neotropical origin; many widespread Rhodniini-palm tree associations involve genera within this subfamily (*Attalea*, *Syagrus*, *Oenocarpus*, *Leopoldinia*, *Acrocomia*, *Astrocaryum*, *Elaeis*, or *Cocos*), whose current broad-scale patterns of species richness closely match those of the Rhodniini in humid ecoregions. Associations involving Ceroxyloideae (*Phytelephas aequatorialis*-*R. ecuadoriensis* and *Ph. tenuicaulis*-*R. pictipes* in western and eastern Ecuador, respectively) and Coryphoideae (*Copernicia*-*R. nasutus/neglectus* in the Brazilian Caatinga-Cerrado, and *Copernicia*-*R. prolixus/robustus* I in the Orinoco) seem to be geographically more restricted. Rhodniini infestation of the widespread *Mauritia flexuosa* (Calamoideae) appears to be conditioned to the presence of vertebrate nests on the palm crowns (Gurgel-Gonçalves et al., 2004a); the more restricted, fibre-rich *M. carana* can also harbour *R. robustus* populations (Barrett, 1991).

Finer-grained diversification patterns can only be described, and their likely causes hypothesised, by carefully assessing OTU composition across individual ecoregions/areas of endemism and the distribution of each lineage; a plausible description of historical processes at the origin of the observed relationships between areas and lineages may then be derived.

1.3.2. Major biogeographical clusters—and a widespread OTU (or two)

R. pictipes is the most widespread of the OTUs we analysed. It has been reported to occur in 36 ecoregions across eight areas of endemism, and could have an even wider range. This atypical pattern (the second most widespread OTUs, *R. robustus* II and *R. prolixus*, have been recorded in only 13 ecoregions each) may be an artifact caused by our as yet limited knowledge of population-level diversity in *R. pictipes*. Thus, before Monteiro et al. (2003) uncovered the hidden variation within “*R. robustus*”, the species was also considered as a single entity; had we treated all “*R. robustus*” records as such (*R. robustus* s.l.), our analysis would have disclosed a pattern similar to that observed for *R. pictipes*—species presence in 27 ecoregions (perhaps up to 41) across the same eight areas of endemism (and perhaps in the open/dry corridor too). Because both groups (*R. pictipes* and *R. robustus* s.l.) are congeneric, largely sympatric, and ecologically similar, we may hypothesise that they must have followed parallel diversification routes under the influence of similar evolutionary stressors. A prediction of this hypothesis is that, for a given molecular marker (and similar sampling coverage), the overall topology of phylogenetic trees of both lineages should be largely comparable, with relatively young (Pleistocene) sub-clades also within *R. pictipes*; in that case, our current view of this species as a widespread, homogeneous taxon would have to be revised. The alternative view implies a recent (post-speciation) range expansion of *R. pictipes*, which would then be a truly widespread species; this hypothesis predicts relatively low genetic diversity with shallow geographical structuring and a unimodal, left-skewed distribution of pairwise mismatch frequencies among mitochondrial gene sequences (Rogers and Harpending, 1992). The recent discoveries of phenotypic and genotypic variants in Venezuela and Colombia (see below) may signal preliminary support for the hypothesis of hidden variation, but the data are still inconclusive.

1.3.2.1. The trans-Andean lineage. Six Rhodniini OTUs (22%) are exclusively trans-Andean (*Rhodnius* n.sp. aff. *pictipes*, *R. pallescens* I and II, *R. colombiensis*, and *R. ecuadoriensis* I and II). *R. neivai* occurs naturally on both sides of the Andes across the arid ecoregions of the transitional Maracaibo biogeographical province (*sensu* Morrone, 2006). The rest of OTUs (74%) are exclusively cis-Andean, with the exception of *R. prolixus*, which was accidentally introduced into trans-Andean subregions (in Colombia, Central America, and southern Mexico) (Dujardin et al., 1998; Monteiro et al., 2003). We thus consider this species as cis-Andean; a possibility exists, however, that natural populations occur in the xeric Guajira-Barranquilla ecoregion.

The diversity within the trans-Andean *Rhodnius* lineage is only beginning to be ascertained. Mitochondrial *cytb* sequence data support the existence of two main clades (the northern *R. pallescens-colombiensis* clade and the southern *R. ecuadoriensis* clade) within this lineage, and suggest that they are sister taxa to the *pictipes* group of species (Abad-Franch et al., 2003b; Abad-Franch and Monteiro, 2007). The ancestors of the lineage probably dispersed across the northern part of the (then low) Eastern Cordillera of the Colombian Andes in the Miocene, and became isolated with the subsequent rapid uplift ~5 million years ago (Gregory-Wodzicki, 2000; Abad-Franch et al., 2003b; Ribas et al., 2005).

R. pallescens belongs to a complex of three moderately divergent lineages: one mainly from northern Colombia, one mainly from Central America, and an apparently endemic species from the Magdalena Valley dry forests known as *R. colombiensis* (Abad-Franch et al., 2003b; NJO and FAM unpublished). All these lineages share their preferred ecotope, the palm *Attalea butyracea*.

R. ecuadoriensis occurs only in Ecuador and northern Peru, where it survives under a wide range of climatic conditions (Abad-Franch et al., 2001; Cuba Cuba et al., 2002). Northern populations have adapted to *Phytelephas aequatorialis* palms, which are endemic to the Western Ecuador moist forests but also occur in the southern half of the Northwestern Andean montane forests. The two sister clades within the *trans*-Andean *Rhodnius* lineage (*pallescens-colombiensis* and *ecuadoriensis*) are, therefore, apparently allopatric, probably as a consequence of Pliocene orogenic vicariance (Gregory-Wodzicki, 2000; Abad-Franch et al., 2003b; Ribas et al., 2005). Southern Ecuadorian populations of *R. ecuadoriensis* are strongly synanthropic, especially across the inter-Andean temperate valleys (Grijalva et al., 2005). Peruvian populations south of the Tumbes/Piura dry forests belong to a distinct, relatively young (Pleistocene) lineage whose sylvatic ecotopes in the semi-arid Andean ecoregions (and perhaps the northernmost wet Puna), where native palms are rare or absent, remain to be described. They are commonly found infesting households, and a few records suggest that they may also occupy hollow trees (Cuba Cuba et al., 2002).

1.3.2.2. Orinoco-Guyana-Imerí. One particular trait of the Orinoco area of endemism is its ecoregional diversity. Small, well-differentiated ecoregions cluster around the geologically and climatically complex northern and eastern limits of the Orinoco system (WWF-TNC, 2001). Ecological segregation, eventually leading to speciation, can, therefore, be postulated to have had an important role in this subregion. A prediction of this hypothesis is that a relatively large amount of endemic species should occur in the area, and the Rhodniini dataset provides partial support to this view.

Apart from *R. neivai* (endemic to the Maracaibo system), three representatives of the 'robustus lineage' occur in the Orinoco: *R. prolixus*, *R. robustus* I, and *R. robustus* IV (Monteiro et al., 2003; Pavan and Monteiro, 2007). The distribution and relationships of these *robustus* genotypes suggest that *R. robustus* IV evolved in the Guyanan area of endemism and later colonised the northern Orinoco system. *R. prolixus* (which occurs in both *Copernicia* and *Attalea* palms) and *R. robustus* I seem on the contrary to share a recent common ancestor that lived in the seasonally dry Orinoco lowlands; they are closely related to the newly discovered *R. robustus* V from Imerí (Abad-Franch and Monteiro, 2007). A vicariant *Psammolestes* population (*Ps. arthuri*) is a narrow endemic to the Orinoco system open woodlands and savannahs.

The relationships between natural populations of *R. pictipes* from northwestern Venezuela (particularly from areas north of the Cordillera de Mérida) and *Rhodnius* n.sp. aff. *pictipes* (from the relatively nearby Sierra Nevada de Santa Marta) have not been determined, but it would not be surprising if they belonged to the same taxon, which would then count as a subregional endemism. A recent revision showed that several morphological and chromatic traits, including male genitalia structures, separate northwestern Venezuelan "*pictipes*" material (originally from the state of Lara) from descriptions based on Amazonian specimens (Aldana et al., 2003).

At least three OTUs occur in both the Orinoco and the Guyanan areas of endemism: *R. robustus* (IV), the widespread *R. pictipes*, and *R. prolixus* (which occurs in the transitional zones between the Llanos and the Guyanan moist forests). *R. robustus* V may be present along the boundary between the Imerí and the Guyanan

areas, but the potential barrier effect of the Negro River has not been evaluated. *R. amazonicus* appears on the other hand to be a narrow Guyanan endemic. *R. paraensis* occurs both in the Guyanan area and in eastern ecoregions south of the Amazon, and *R. brethesi* has often been recorded in the Negro River campinaranas, where it infests piac, ava fibre palms (*Leopoldinia piassaba*).

The Imerí area of endemism corresponds to a single ecoregion that encompasses the moist forests between the Negro and the Japurá/Solimões Rivers. Only one Rhodniini OTU (*R. robustus* V) may be suspected of representing a narrow endemic to this area, but we have no information as to its actual distribution patterns (cf. Abad-Franch and Monteiro, 2007). *R. pictipes* and *R. brethesi* also occur in Imerí. It seems likely that *R. robustus* IV is present as well in this ecoregion, but the considerations on the barrier effect of the Negro River (above) also apply here. The presence of *R. robustus* II in the easternmost part of the Imerí is also plausible.

2 Napo. Apart from what appears to be an evolutionarily old narrow endemic (*Rhodnius* n.sp. aff. *robustus*) and a widespread species (*R. pictipes*), the OTU composition of the Napo area of endemism seems to be transitional between the Orinoco-Guyanan-Imerí and the Inambari-Rondônia clusters. It shares 1-3 OTUs with the former (*R. brethesi* and perhaps *R. dalessandroi* and *R. robustus* V) and 1-2 OTUs (*R. robustus* II and perhaps *R. robustus* V) with the latter.

3 Inambari-Rondônia. The presence of *R. brethesi* in areas south of the Marañón/Solimões/Amazonas River (Lent and Wygodzinsky, 1979; Galvão et al., 2003) is somewhat dubious; this species seems to be associated with *L. piassaba* palms, which seem in turn restricted to the upper-middle Negro and upper Orinoco rivers (Henderson et al., 1995). *Ps. tertius* is present in the Mato Grosso dry forests and the Cerrado, which border the Rondônia area of endemism to the east and southeast. *Ps. coreodes* may occur in southern Inambari, particularly along the boundary with the Chiquitania dry forests. *R. pictipes* is present in most of this area cluster, but appears to be progressively substituted by *R. stali* in the southwestern fringe, which corresponds to the western limit of the central Brazilian shield. There, *R. stali* appears to be associated with *Attalea phalerata* palms (cf. Matías et al., 2003). *R. robustus* II is widespread across Inambari-Rondônia, and *R. robustus* III is also present in the northeastern tip (Pavan and Monteiro, 2007).

4 Pará-Belém. The rich Rhodniini fauna of the Pará-Belém ecoregional cluster seems to be largely the result of secondary immigration of OTUs evolved elsewhere, with a relatively small contribution, if any, of local diversification. The specific status of the only narrow endemic, *R. milesi*, needs to be confirmed; the original description emphasised diagnosis based upon comparison with *R. dalessandroi* while ignoring obvious similarities with members of the *robustus-neglectus-nasutus* group (Valente et al., 2001). *R. robustus* III appears to be native of this area, but occurs also in the Maderia-Tapajós forests (see above). Other species are shared with either the Guyanan area (*R. paraensis*, *R. robustus* IV), with the open/dry corridor (*R. neglectus*, *R. nasutus*, *Ps. tertius*), with Inambari-Rondônia (*R. robustus* II), or with most of Amazônia (*R. pictipes*). These patterns of OTU sharing results in the unstable position of the Belém area of endemism in the cladograms of Fig. 2(C), where it appears as a sister area to either the Guyanan or the Pará-Rondônia clade, depending upon which OTUs are analysed (only those actually recorded in each area vs. those recorded and those probably also present).

5 Open/dry corridor. At least four species of Rhodniini (*R. neglectus*, *R. nasutus*, *Ps. tertius*, and *Ps. coreodes*) probably evolved

in the vast 'arid diagonal' of central South America (Ab'Sáber, 1977), but none of them remained restricted to it to become a narrow endemic. *R. neglectus* is widespread across the Cerrado and the dry forests of this corridor, where it occupies palms of at least five genera and bird nests but may also invade and sporadically colonise artificial structures (Gurgel-Gonçalves et al., 2008; see below). There are indications that geographic populations of this species are genetically very little structured, which could be explained by either a recent range expansion of a formerly localised, homogeneous gene pool or by an extreme vagility of the species (perhaps related to the passive carriage of eggs or small nymphs by dispersing birds) (RG-G, unpublished data). *R. nasutus* seems to be endemic to the Caatinga xeric shrublands, where *Copernicia* palms are often infested, but may also occupy other palm genera in more humid ecoregions and in the relict premontane forest on the Caatinga crystalline ridges and inselbergs (Costa, 2003; Dias, 2007; see below). The two southern *Psammolestes* species (*Ps. tertius* in the Cerrado and *Ps. coreodes* in the Chaco) are closely related to each other, and probably share a common ancestor with the northern *Ps. arthuri* (see below). *Trans-Amazonian* vicariants have been identified in several taxonomic groups (e.g., Quijada-Mascareñas et al., 2007), and are probably also present in other triatomines (e.g., *T. maculata*; see dos Santos et al., 2007; Abad-Franch and Monteiro, 2007). Indeed, the sister-group relationship of *R. neglectus* and the Orinoco-northern Amazon clade (*R. prolixus*-*R. robustus* l-*R. robustus* V) (Monteiro et al., 2000 and unpublished data) suggests that a similar mechanism, even if perhaps over different time-frames, underlies the evolution of these vicariant groups. Under this scenario, *R. nasutus* would have become isolated from its stem lineage before the diversification of the *robustus-prolixus-neglectus* clade got started (Monteiro et al., 2000). The open/dry corridor appears as basal to the rest of *cis-Andean* areas (together with the Atlantic/humid corridor, below) when area relationships are estimated using only factual OTU records [Fig. 2(A) and (C)]; less restrictive analyses (using all OTUs) tend to cluster these southern corridors with neighbouring Amazonian areas [Fig. 2(C)], likely because of spill-over of species across transitional border zones.

1.3.2.7. Atlantic/humid corridor (and a closing note on the *Psammolestes*). *R. domesticus* is the only narrow endemic to this area. It seems to represent an old lineage that evolved independently for several million years in the moist Atlantic forests of central-southern Brazil (mainly along the Serra do Mar range), which were connected to Amazonian lowland moist forests until increasing aridity began to foster the expansion of open formations in the Miocene (Cox and Moore, 2000; Monteiro et al., 2000; Costa, 2003; Abad-Franch and Monteiro, 2007). Southern and southeastern populations of *R. neglectus* also occur in the fringes of this corridor, particularly in the interior forests that border the Cerrado to the east.

Ps. coreodes is the southernmost representative of the Rhodniini; it has been recorded in the humid Chaco and in the savannahs of the Argentinean Paraná-Uruguay interfluvial. As for the other two species of this genus, it appears to have specialised in exploiting protected bird nest habitats. Available records suggest a preference for the nests of the ovenbirds (Furnariidae) *Phacellodomus* spp. (all three *Psammolestes*), *Anumbius* sp. (*Ps. tertius*), and *Pseudoseisura* sp. (*Ps. coreodes*), even if other nests (of Dendrocolaptidae, Psittaciidae and, more rarely, Emberizidae) may also be colonised occasionally (Lent and Wygodzinsky, 1979; Carcavallo and Martínez, 1985; Gurgel-Gonçalves et al., 2004a). *Phacellodomus*, *Anumbius*, and *Pseudoseisura* all build large, enclosed vegetative nests in the open, a trait most likely derived and relatively recently evolved within the highly diverse family Furnariidae (among which cavity nests are probably plesiomorphic) (Irestedt et al., 2006). *Phacellodomus* and *Anumbius*

belong to the subfamily Synallaxinae, the former being basal, and phylogenetic reconstructions suggest that *Pseudoseisura*, classically ascribed to the Phylidorinae, also belongs to a derived synallaxine clade (Irestedt et al., 2006). Today, the *Psammolestes* and the synallaxines are both *trans-Amazonian* vicariants. We may, therefore, tentatively propose that the *Psammolestes* arose as an individual lineage in association with ancestral synallaxine furnariids building large vegetative nests in open, semi-arid woodland and savannahs.

1.4. Conclusions

Albeit still incomplete, our coarse-grained overview of macroscale biogeographical and ecological patterns among the Rhodniini provides some comprehensive insights as to what major mechanisms and processes probably underlie biogeographical, ecological, and genetic diversification in this tribe of triatomines. Acknowledging that we traded detail for generality, and that many of our proposals are 'mere' hypotheses, we now summarise the seven main points we derive from our results.

- (1) The Rhodniini (which should be considered as a single genus) first evolved in the humid forests corresponding to the contemporary Amazon-Orinoco meta-system, probably in association with palms and palm tree fauna (Gaunt and Miles, 2000, 2002; Abad-Franch and Monteiro, 2007). Two major extant lineages derived from this ancestral stock: the 'pictipes lineage' (including the *trans-Andean* endemic taxa) and the '*robustus* lineage' (including the *Psammolestes*) (Abad-Franch and Monteiro, 2007).
- (2) OTU counts per ecoregion suggest (without conclusively supporting) that particularly dynamic diversification events took place on non-flooded areas during the Miocene/Pliocene marine transgression, with secondary colonisation of suitable lowland forest ecoregions (particularly in western Amazonia) by several lineages. Most of the observed OTU richness "hotspot" ecoregions seem to correspond to contact zones where dispersing taxa became sympatric after having evolved elsewhere.
- (3) Ecological segregation/diversification was probably important along the northern tip of the Andes and in the neighbouring savannahs and dry lowland forests on both sides of the cordillera. The clearly vicariant clade of endemic *trans-Andean* species probably originated in this subregion in the late Miocene and subsequently colonised a variety of ecoregions from Central America to northern Peru, diversifying under the influence of Miocene/Pliocene Andean orogeny and, subsequently, of Pleistocene climatic fluctuations (Abad-Franch et al., 2003a,b; Nores, 2004; Ribas et al., 2005).
- (4) Even if still speculative, we may put forward the hypothesis that the 'pictipes lineage' first arose in the Orinoco-Guyanese area of endemism in the Miocene, gave rise to the ancestors of the *trans-Andean* lineage, and later dispersed southwards. The lineages that gave rise to *Rhodnius* n.sp. aff. *pictipes* (Sierra Nevada de Santa Marta and perhaps Cordillera de Mérida), to *R. amazonicus*, *R. paraensis*, and *R. brethesi* (Guyanan-Imeri), and to *R. stali* (westernmost central Brazilian shield) could have become isolated as a consequence of the Miocene/Pliocene marine transgression (Nores, 1999, 2004). The wide distribution of *R. pictipes* may be the result of a real post-speciation range expansion or may be an artifact caused by an as yet inadequate sampling of the diversity within this taxon; each of these alternative hypotheses imply testable predictions that can be suitably addressed by phylogenetic and population genetics analyses of molecular data (Abad-Franch and Monteiro, 2005).

- (5) Several relatively old (probably starting in the late Miocene and stretching into the Pliocene) vicariant events led to the isolation of endemic 'robustus lineage' taxa in the Brazilian Atlantic forests (*R. domesticus*), the Maracaibo basin (*R. neiva*), the equatorial Andes foothills (*Rhodnius* n.sp. aff. *robustus*), and the Caatinga (*R. nasutus*). All these peripheral isolates correspond to deep branches within the lineage (Monteiro et al., 2000 and unpublished data); the fact that each of these branches has only one terminal taxon suggests a role for local extinction of former sister lineages. A trans-Amazonian vicariant lineage, *Psammolestes*, probably predates these early events and may have evolved in association with synallaxine ovenbirds (Furnariidae).
- (6) More recent (late Pliocene-Pleistocene) cladogenetic events led to the splitting of the *robustus-neglectus-prolixus* group, giving rise to (i) a second trans-Amazonian vicariant (*R. neglectus* + [*R. prolixus*-*R. robustus* I-*R. robustus* V]); (ii) a western clade (*R. robustus* II, which would have colonised Inambari-Rondônia secondarily); and (iii) a younger Guyanan-southeastern Amazonian clade (*R. robustus* IV and *R. robustus* III). These patterns were interpreted as providing support to the Pleistocene refugia hypothesis (Monteiro et al., 2003) and, in a later reassessment, as compatible with the marine transgression hypothesis (Conn and Mirabello, 2007); they might in fact be a combination of both, with early cladogenesis related to the marine transgression and later diversification related to climate shifts and their consequences on the relative distribution, size, and connectivity of moist forests and open formations (Hooghiemstra and Van Der Hammen, 1998).

The overall biogeographical-evolutionary patterns of the Rhodniini are complex but not necessarily unintelligible. As more data on the phylogenetic relationships among OTUs accrue (including data from rare species such as *R. paraensis* or *R. amazonicus*, from populations of widespread species from as yet unsampled areas, and more precise dating of nodes in phylogenetic trees), our ability to relate their patterns of descent with the historical biogeography of the areas they live in will keep improving. The relative roles of vicariance, long-distance dispersal, range expansion, and local extinction will be progressively clarified, and a coherent picture will emerge against which to test new discoveries and theoretical elaborations. The information conveyed by this picture (where there are more species, where do certain species occur and where they do not, and why) will certainly help define more efficient vector control and surveillance strategies. The recent proposal that ecological and evolutionary factors should be partitioned to suitably investigate the process of adaptation of sylvatic triatomines to human environments (Abad-Franch and Monteiro, 2007) is an example of how these efforts may foster our ability to confront the challenge of keeping Chagas disease incidence below acceptable rates in the long run. On the other hand, it is important to recognise that the ecological processes probably involved in the onset of triatomine synanthropism (habitat loss, food shortage, host switch, or a higher frequency of flight dispersal by adult bugs), and the responses we can devise in order to lessen human-vector contact, all share the attribute of being mesoscale phenomena. Triatomine populations adapt to anthropogenic environmental changes at the landscape level, and vector control-surveillance systems are designed and put into practice at the landscape level. It follows that many of the questions we should ask (and help answer) to improve the odds of successful disease control are mesoscale (landscape) ecological questions: what vector species are present in a given locality or subregion?; which of those species can invade or colonise human environments, and where?; what are the main ecotopes where natural populations occur?; what are the main behavioural traits of

those populations?; and, finally, where and how should entomological surveillance resources be allocated? We now present an example of mesoscale investigation that addresses this sort of questions, focusing on two secondary vectors that occur through-out the open/dry corridor of northeastern and central Brazil, the near-sibling *R. neglectus* and *R. nasutus*.

2. Vector systematics, ecology, and behaviour at the mesoscale: *Rhodnius neglectus* and *R. nasutus* in palm trees of semi-arid Brazilian ecoregions

2.1. Alpha-systematics of near-sibling taxa: geometric morphometrics of *Rhodnius neglectus* and *R. nasutus*

2.1.1. Introduction

R. neglectus and *R. nasutus* are two near-sibling species belonging to the 'robustus lineage'. Both are primarily associated with palm trees in open formations with long dry seasons in central and northeastern Brazil, and both invade and sporadically colonise human environments. *R. neglectus* occurs across the open/dry corridor (mainly in the Cerrado) and in several neighbouring ecoregions. *R. nasutus* is apparently endemic to the drier Caatinga of north-eastern Brazil, but has also been collected in the Maranhão babaçu forests (southeastern Amazonia) and in the Northeast Brazil dry forests (Table 1). These two species may, therefore, occur in sympatry in transitional areas between their respective core ecoregions.

R. neglectus and *R. nasutus* can be identified by comparing chromatic patterns (of the body and antennae), and also differ in their overall size (Lent and Wygodzinsky, 1979). Chromatic variation is, however, present in both species (Barrett, 1996), and size-related traits are known to be sensitive to environmental stress in triatomines (Dujardin et al., 1999; Abad-Franch et al., 2003a). Finally, Harry (1993) detected no clear-cut differences in male genitalia structures between *R. neglectus* and *R. nasutus*. A variety of molecular markers can be used to identify dubious specimens, but costly and complex procedures are involved that make these techniques unlikely to become routinely applied in vector surveillance in the near future. Problematic triatomine species pairs can also be separated by numerical analysis of quantitative phenotypic traits. Multivariate analyses of morphometric data can also be complex, but have the key advantage of making use of digital pictures of anatomical structures (wings and/or heads) that can be taken by surveillance teams and sent by electronic media to a reference laboratory. There, the analyses can be run and a response produced within a few hours. Several recent studies show how geometric morphometric approaches provide particularly valuable tools for triatomine alpha-systematics, and suggest that they could significantly strengthen vector surveillance systems (e.g., Matias et al., 2001; Villegas et al., 2002; Gumiel et al., 2003; Schachter-Broide et al., 2004; Dujardin et al., 2007; Feliciangeli et al., 2007; Gurgel-Gonc, alves et al., in press).

We tested the performance of geometric morphometrics in identifying adult bugs collected from palms in the state of Bahia (where Cerrado-Caatinga ecotones are common) as *R. neglectus* or *R. nasutus*. We compared these specimens with reference populations of known specific status, assessing whether size and shape patterns can be used as taxonomic markers for this species pair.

2.1.2. Materials and methods

Wings ($n = 172$) and heads ($n = 180$) from three *R. neglectus* and two *R. nasutus* populations were analysed (Table 2). *R. neglectus* samples were collected from *Mauritia flexuosa* palm trees (see Gurgel-Gonçalves et al., 2003, 2004a for details). The *R. neglectus* reference sample came from a colony founded with topotype specimens

Table 2

Origin, habitats, geographic coordinates and number of wings and heads of *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, and *Rhodnius* sp. populations used in geometric morphometric analyses.

Population	Origin ^a	Habitat	Coordinates	Wings	Heads
<i>Rhodnius neglectus</i> ^b	Araguaína, TO	Palm trees (<i>Mauritia flexuosa</i>)	07° 28' S, 48° 22' W	25	32
<i>Rhodnius neglectus</i> ^b	Alto Paraíso, GO	Palm trees (<i>M. flexuosa</i>)	14° 09' S, 47° 33' W	26	32
<i>Rhodnius neglectus</i> ^b	Buritizal, SP	Palm trees (<i>M. flexuosa</i>)	20° 11' S, 47° 42' W	29	31
<i>Rhodnius neglectus</i> ^c	Uberaba, MG	Laboratory colony	19° 32' S, 48° 01' W	11	6
<i>Rhodnius nasutus</i> ^d	Meruoca, CE	Palm trees (<i>Attalea speciosa</i>)	03° 31' S, 40° 25' W	28	30
<i>Rhodnius nasutus</i> ^d	Sobral, CE	Palm trees (<i>Copernicia prunifera</i>)	03° 47' S, 40° 24' W	27	30
<i>Rhodnius</i> sp. ^d	Curaçá, BA	Palm trees (<i>C. prunifera</i>)	08° 59' S, 39° 54' W	17	10
<i>Rhodnius</i> sp. ^b	São Desidério, BA	Palm trees (<i>M. flexuosa</i>)	12° 22' S, 45° 51' W	9	9

^a Locality and state: TO Tocantins, GO Goiás, SP São Paulo, MG Minas Gerais, CE Ceará, and BA Bahia.

^b Sylvatic populations.

^c Colony from the Instituto René Rachou, Fiocruz (founder specimens collected in the type locality).

^d F1 generation from sylvatic populations.

and kept at the Centro de Pesquisas René Rachou (Fiocruz, Brazil). Other bugs unambiguously identified as *R. neglectus* (from the states of Tocantins, São Paulo, and Goiás) were also used in the comparisons. *R. nasutus* populations were collected from either *A. speciosa* or *Copernicia prunifera* palms in the core area of the species range (state of Ceará). Bugs were identified after Lent and Wygodzinsky (1979), with the exception of the samples whose specific status we aimed at testing (from Curaçá and São Desidério, state of Bahia), which were treated as 'unidentified specimens' in the analyses (*Rhodnius* sp. in Table 2).

Right forewings were mounted on microscope slides and digitally scanned. Six type I (venation intersection) and one type II landmarks (Bookstein, 1991) were digitised. Heads were photographed with a digital camera adapted to a stereomicroscope (25× magnification). Eight head landmarks were used in morpho-metric analyses. Landmark coordinates were recorded using the software *tpsDig* 1.18 (Rohlf, 1999a).

We used "centroid size" (CS), an isometric size estimator derived from coordinate data (Bookstein, 1991), to analyse size variation. CS values were extracted from coordinate matrices using *tpsRelw* version 1.18 (Rohlf, 1999b) and log-transformed. The generalised Procrustes analysis superimposition algorithm (Rohlf, 1996) was used to compute non-uniform (partial warps) and uniform components, which measure the deformation of each individual structure in relation to a least-squares consensus configuration. Both uniform and non-uniform components were used in subsequent statistical comparisons of the shape patterns of both species. Shape variables were computed using *tpsRelw* 1.18 (Rohlf, 1999b).

Size variation (wing and head CS values) among populations was explored by means of ANOVA and Tukey tests ($\alpha = 0.01$). Shape variables derived from partial warps were used as input for multivariate Discriminant Function Analysis (DFA). We explored the relationships between unidentified specimens and our *R. neglectus* and *R. nasutus* reference populations in terms of shape patterning. Populations of known status (*R. neglectus* and *R. nasutus*) were grouped *a priori* for computing discriminant scores, while unidentified specimens from the state of Bahia were incorporated *a posteriori* into the analyses. Discriminant scores were then used to construct factorial maps displaying the distribution of specimens and populations in the shape space defined by the two discriminant factors. Convex hulls (polygons enclosing all specimens within each group) were overlaid on the plots and individual dots removed—except for unidentified specimens whose position we wanted to examine. Finally, we measured the contribution of size to shape variation (allometry) using multiple regression of shape discriminant factors against CS values (wings and heads). We used contingency table analysis and Kappa statistics (Landis and Koch, 1977) to assess reclassification of specimens to their original putative groups. DFA, ANOVA, multiple regression, and Tukey tests were computed with Statistica®

(StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Kappa statistics were computed with JMP 4.0.2® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.1.3. Results and discussion

Clear size differences were detected among *Rhodnius* species/populations for both wings and heads and for both males and females (wings: ♂ ANOVA $F_{7,86} = 15.1$; $p < 0.01$; ♀ ANOVA $F_{7,70} = 28.5$; $p < 0.01$; heads: ♂ ANOVA $F_{6,76} = 13.7$; $p < 0.01$; ♀ ANOVA $F_{6,75} = 39.8$; $p < 0.01$). Average CS was larger in *R. neglectus* (CSwing = 0.68 ± 0.03 and CShead = 0.58 ± 0.03) than in *R. nasutus* (CSwing = 0.66 ± 0.03 and CShead = 0.55 ± 0.02) (t -test; $p < 0.01$). *Rhodnius* sp. specimens from Curaçá were markedly smaller than those from São Desidério (t -test; $p < 0.01$). Further analyses (see below) suggested, however, that the Curaçá sample encompassed more than a single species.

Both wing (Fig. 3) and head shape patterning revealed significant differences between *R. neglectus* and *R. nasutus*. DFA-derived correct reclassification scores were high for both head (Kappa = 0.90) and wing (Kappa = 0.88) shape variables. Unidentified specimens from São Desidério were all indistinguishable from our *R. neglectus* reference populations, including the Fiocruz topo-typic stock. Some specimens from Curaçá fell also within the *R. neglectus* cluster, while others were more similar to *R. nasutus* and a few had an intermediate shape pattern (Fig. 3). This is compelling evidence that both species are sympatric (and infest *C. prunifera* palms) in Curaçá, and calls for research on between-species ecological interactions. We found no significant allometric trend in wings ($R^2 = 0.02$; $p < 0.01$), but the second head shape discriminant factor (DF2) was significantly correlated with CS ($R^2 = 0.29$; $p < 0.01$).

Entomologists working in Chagas disease vector surveillance in northeastern Brazil should be aware that *R. neglectus* and *R. nasutus* can occur in sympatry in the state of Bahia and probably in other transitional zones between the Cerrado and the Caatinga. Our geometric morphometric analyses could be envisaged as an example of how these tools can be used to optimise surveillance systems. The results show how species-level determination in the context of vector surveillance could be significantly enhanced if a reference morphometric dataset were built against which unidentified specimens could be compared.

2.2. The ecology and behaviour of *Rhodnius neglectus* and *R. nasutus* in palms trees of the Brazilian open formations

2.2.1. Introduction

Lent (1954) described *R. neglectus* based on bugs collected from *Attalea* palms in central Brazil (Uberaba, Minas Gerais) that had been previously identified as *R. prolixus*. Subsequently, several studies showed that the species was common in palm trees across central Brazil, and particularly in the Cerrado (Barretto, 1979; Diotaiuti and Dias, 1984; Teixeira et al., 2001; Gurgel-Gonçalves et al., 2003, 2004a).

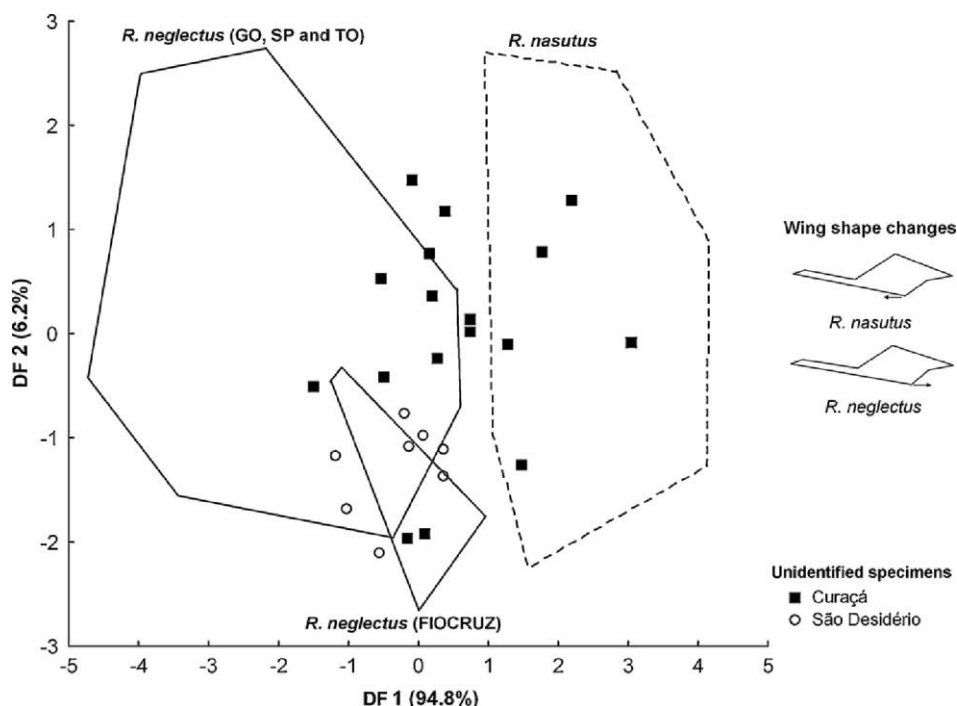


Fig. 3. Geometric morphometrics of near-sibling triatomine species: factorial map on the plane defined by the two discriminant factors of wing shape variation (DF1 and DF2). The distribution of *Rhodnius neglectus* specimens from Goiás (GO), São Paulo (SP), Tocantins (TO) and the Fio Cruz reference stock (FIOCRUZ); of *R. nasutus* specimens from the state of Ceará; and of unidentified *Rhodnius* specimens from the state of Bahia (black squares and empty circles) is presented. The percent contribution of each DF to total shape variation is shown on the axes (in parentheses). Polygons (convex hulls) enclose individual points (which were deleted for the sake of clarity) corresponding to specimens of known specific status. The least-squares consensus wing configuration for each species is shown on the right; arrows indicate the main difference in wing shape (end of the postcubital vein) between *R. neglectus* and *R. nasutus*.

The species has since then been reported from 12 Brazilian states (Carcavallo et al., 1999; Galvão et al., 2003). Its synanthropic behaviour was described in early works—even before its description, when it was reported as *R. prolixus* (e.g., Martins et al., 1940; Pellegrino, 1950; Correa, 1968). Most specialists agree that *R. neglectus* is not a major vector of human Chagas disease, in spite of its wide distribution and its ability to colonise artificial environments (mainly chicken houses and dovecotes) (Barretto et al., 1968; Barretto, 1976; Diotaiuti and Dias, 1984). *R. neglectus* appears in the list of triatomine species more frequently collected in house-holds by Chagas disease control agents in eight Brazilian states (Dias, 2002), and plays an important role in the maintenance of *T. cruzi* transmission in the wild (Gurgel-Gonçalves et al., 2004b). In the periphery of Belo Horizonte (a 2.5 million-people city in Minas Gerais), up to 60% of the dominant *Acrocomia aculeata* palms may be infested by *R. neglectus*, with a rate of *T. cruzi* infection approaching 16%; the finding of bugs within households is nonetheless considered rare in the region (Diotaiuti and Dias, 1984).

The first evidence of widespread synanthropism in *R. neglectus* was provided by Silveira and coworkers, who surveyed 630 households (130 municipalities) of the Brazilian states of Goiás and Tocantins (Silveira et al., 1984). *R. neglectus* specimens were collected in 271 households (93 municipalities); peridomestic structures were infested in 57% of the households, and bugs were found inside 43% of houses. Intra-domiciliary colonies were first detected in 1978, and became more common until extensive insecticide spraying campaigns began in 1983. *R. neglectus* is currently a candidate vector in Goiás (Oliveira and Silva, 2007) and over the Pará-Maranhão border (where the landscape is dominated by extensive palm forests frequently infested by *R. neglectus*), but may also be of some importance in other Brazilian states (Silveira et al., 1984; Silva et al., 1999; Guilherme et al., 2001).

Much less is known about the ecology of *R. nasutus*. Its geographical distribution is restricted to the Brazilian northeastern region, including the states of Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, and Rio Grande do Norte (Lucena and Lima-Borba, 1977; Carcavallo et al., 1999; Galvão et al., 2003). The core area of this range corresponds to the semi-arid Caatinga, probably the least studied of all Brazilian biomes. *Copernicia prunifera* (the ‘carnaúba’ wax palm) is thought to represent the primary natural ecotope of *R. nasutus*, which feeds mainly on birds (Lent and Wygodzinsky, 1979; Forattini et al., 1981; Alencar, 1987; Sarquis et al., 2004). As with *R. neglectus*, this species sporadically invades houses and often colonises peridomestic structures, particularly thatched hen-houses (Alencar, 1987; Dias et al., 2000; Sarquis et al., 2004, 2006). In the 1970s–1980s, *R. nasutus* ranked fourth among six triatomine species found in artificial environments in the state of Ceará - and became third after the elimination of *T. infestans* in the 1990s (Forattini et al., 1981; Alencar, 1987; Dias, 2007). Because the rates of *T. cruzi* infection tend to be low in this largely ornithophilic species, the contribution of *R. nasutus* to human Chagas disease transmission is generally thought to be minor (Forattini et al., 1981; Alencar, 1987). More recent surveys suggest, however, that over 27% of *R. nasutus* can be infected by *T. cruzi* in the state of Ceará, a higher rate than that recorded for other synanthropic vectors such as *T. brasiliensis* (15%) or *T. pseudomaculata* (18%) (Sarquis et al., 2004).

In an attempt to improve our understanding of the main ecological features of these two near-sibling *Rhodnius* species, we determined infestation rates in a sample of 282 palm trees in five localities within the two major semi-arid ecoregions of central-northeastern Brazil: the Cerrado and the Caatinga. We aimed at describing the patterns of palm tree infestation in these two open formations, preliminarily testing the null hypothesis that infestation rates are homogeneous among palm species and across localities and ecoregions.

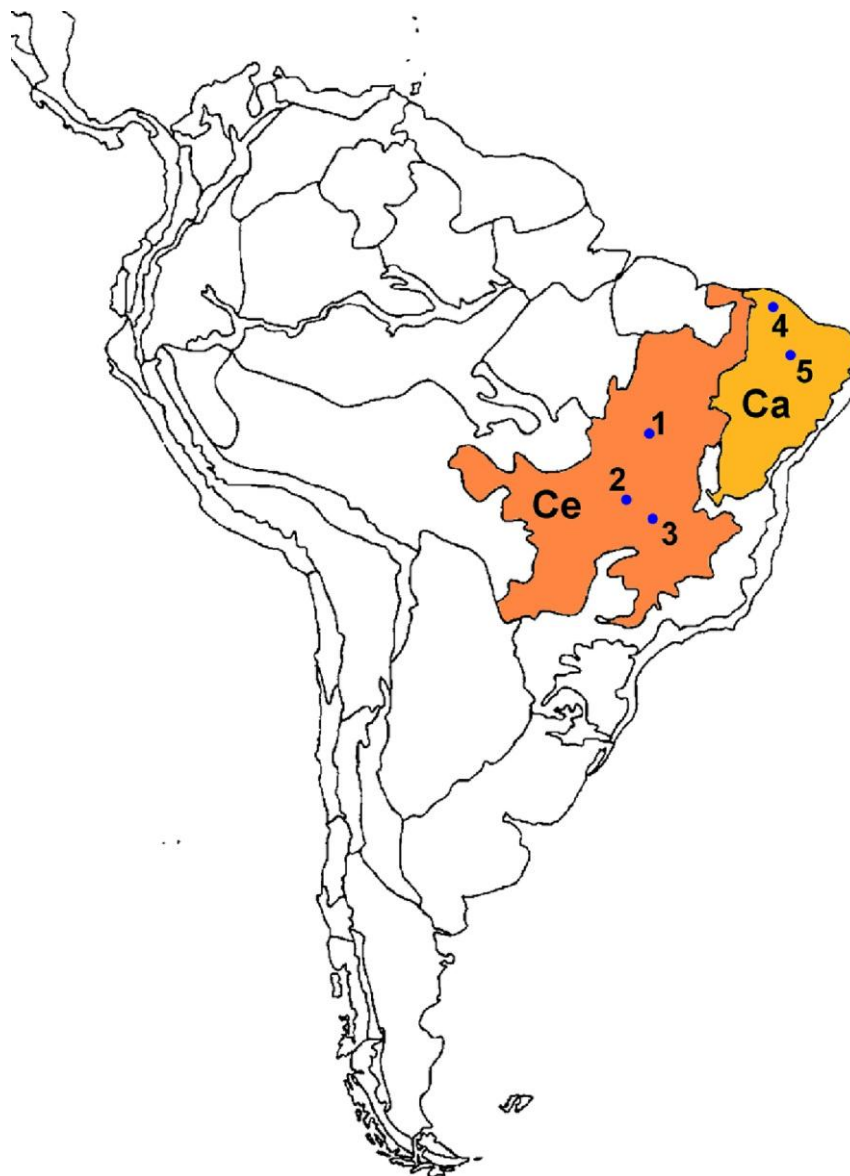


Fig. 4. Mesoscale ecological features of *Rhodnius neglectus* and *R. nasutus* in the open/dry corridor of central-northeastern Brazil: fieldwork localities in the Cerrado (Ce) and the Caatinga (Ca). (1) Ponte Alta (state of Tocantins), (2) Jaraguá (state of Goiás), (3) Montes Claros (state of Goiás), (4) Sobral (state of Ceará), and (5) Chapada do Araripe (state of Ceará).

2.2.2. Materials and methods

In central Brazil, we surveyed three municipalities where *R. neglectus* displays different degrees of synanthropic behaviour: Jaraguá (state of Goiás), where *R. neglectus* has been reported to breed within houses; Montes Claros (Goiás), where the species was found in peridomestic environments but never inside dwellings; and Ponte Alta (state of Tocantins), from where *R. neglectus* had never been reported. All three sites are located within the limits of the Cerrado, but Ponte Alta is closer to the Mato Grosso tropical dry forests and southeastern Amazonia (Fig. 4). Most of the municipality of Jaraguá is heavily deforested; native forests are restricted to small pockets within an extensive matrix of crops and pastures from which some palm tree species seem to have become extinct. In contrast, anthropic environmental disturbance has been less extensive in Montes Claros and Ponte Alta, where preserved landscapes are still relatively common.

In northeastern Brazil, two areas within the state of Ceará were investigated (Fig. 4). The first study area (municipality of Sobral) is representative of the semi-arid Caatinga, with extensive low-land (<100 m altitude) open formations dominated by *Copernicia prunifera* palms; more humid forests grow on the slopes and hill-tops of crystalline ridges, where Atlantic winds provide moisture throughout the year; *A. speciosa* substitutes *C. prunifera* as the dominant palm in these relict moist forests. The second site (Chapada do Araripe) is also a mountainous area within the Caatinga; the altitudinal gradient is paralleled by vegetation changes from the arid lowlands to the more humid upland forests. The diverse flora of this subregion includes species and communities typical of the Cerrado, Caatinga, and moist Atlantic forests.

In each study site, a sample of dominant palm tree species was felled and dissected for manual collection of triatomines (Diotaiuti and Dias, 1984). A total number of 282 palms of eight species was

Table 3

Infestation of palm trees by *Rhodnius* spp. in the localities of Ponte Alta (state of Tocantins), Jaraguá and Montes Claros (state of Goiás), and Sobral and the Chapada do Araripe (state of Ceará), Brazil.

Palm tree species	Ponte Alta ^a			Jaraguá ^a			Montes Claros ^a			Sobral ^b			Araripe ^b			Total		
	S	I	%	S	I	%	S	I	%	S	I	%	S	I	%	S	I	%
<i>Attalea speciosa</i>	20	16	80	0	–	–	20	17	85	9	8	88.9	10	10	100	59	51	86.4
<i>Attalea phalerata</i>	20	0	0	9	4	44.4	20	9	45	0	–	–	0	–	–	49	13	26.5
<i>Oenocarpus distichus</i>	20	1	5	0	–	–	0	–	–	0	–	–	0	–	–	20	1	5
<i>Mauritia flexuosa</i>	20	19	95	0	–	–	20	14	70	0	–	–	10	9	90	50	42	84
<i>Syagrus oleracea</i>	0	–	–	10	2	20	0	–	–	0	–	–	10	9	90	20	11	55
<i>Acrocomia aculeata</i>	20	8	40	7	4	57.1	20	10	50	0	–	–	0	–	–	47	22	46.8
<i>Acrocomia intumescens</i>	0	–	–	0	–	–	0	–	–	0	–	–	10	7	70	10	7	70
<i>Copernicia prunifera</i>	0	–	–	0	–	–	0	–	–	17	10	58.8	10	8	80	27	18	66.7
Total	100	44	44	26	10	38.5	80	50	62.5	26	18	69.2	50	43	86	282	165	58.5

^a Localities where only *Rhodnius neglectus* was collected.

^b Localities where only *R. nasutus* was found; S = number of palm trees surveyed; I = number of palm trees infested; % = percent palm infestation.

surveyed: *A. phalerata* ('aricuri'), *A. speciosa* ('babaçu'), *Oenocarpus distichus* ('bacaba'), *Mauritia flexuosa* ('buriti'), *Acrocomia aculeata* ('macaúba'), *Acrocomia intumescens* ('macaúba-barriguda'), *Syagrus oleracea* ('guariroba'), and *Copernicia prunifera* ('carnaúba') (Table 3). Palm identification followed Lorenzi et al. (1996). Infestation rates were tested for random variation among palm species and localities using contingency table analysis and Chi-squared tests as implemented in JMP 4.0.2[®] (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Bugs were identified after Lent and Wygodzinsky (1979) and their gut contents and salivary glands examined for trypanosomatids under a light microscope. We performed precipitin reactions (Siqueira, 1960) to identify bloodmeals in a subset of 351 bugs using a battery of nine antisera (human, bird, cat, opossum, dog, pig, bat, rodent, and lizard).

2.2.3. Results and discussion

We collected triatomines in all five study areas. They were identified as either *R. neglectus* (bugs from Goiás and Tocantins) or *R. nasutus* (bugs from Ceará). Overall palm infestation index was 58.5% (95% confidence interval = 53%–64%), with highly significant differences between palm species (Pearson $\chi^2 = 80.6$, 7 d.f., $p < 0.0001$) and across study sites (Pearson $\chi^2 = 30.3$, 4 d.f., $p < 0.0001$ for localities, and Pearson $\chi^2 = 23.7$, 2 d.f., $p < 0.0001$ for states). The same was true when comparing our two study ecoregions, with significantly higher palm infestation rates in the Caatinga than in the Cerrado (80.3% vs. 50.5%; Pearson $\chi^2 = 20.3$, 1 d.f., $p < 0.0001$). *A. speciosa* was the palm species most frequently infested (86.4%), followed by *Mauritia flexuosa* (84%) (Table 3). These two palm species were common in at least some parts of all our study sites, and were infested by *R. neglectus* (in Cerrado localities) and *R. nasutus* (within the Caatinga ecoregion); *Syagrus oleracea* did also harbour both triatomine species, but was absent from our survey locality in Tocantins. Infestation rates were highest in palms of the Chapada do Araripe (86%), and lowest in Jaraguá (38.5%). This trend was reflected in the summary infestation rates by state, which were significantly higher in Ceará (80.3%) than in Tocantins (44%) or Goiás (56.6%).

R. neglectus was frequently found in *A. speciosa* and *M. flexuosa*, with an infestation rate of 82.5% in both palm species. The density of *R. neglectus* colonies seems to be higher in *Ac. aculeata* and *A. speciosa* palms (with an average of 13 and 10.8 bugs/infested palm, respectively) than in other palm species, but may also be close to 7 bugs/infested palm in *M. flexuosa* (Table 4; see also Gurgel-Gonc, alves et al., 2004a). All these palm species have wide geographical ranges in Brazil, and are commonly found in anthropic landscapes. Both *A. speciosa* and *M. flexuosa* were, however, absent from our sampling area in the municipality of Jaraguá, where *R. neglectus* has been found infesting houses and the landscape in characterised by extensive deforestation. In fact, only three large palm species were seen in Jaraguá, whereas five of them were common in Ponte Alta (where the bugs are still strictly sylvatic) and four were identified in Montes Claros (where peridomestic infestation is not rare). These observations suggest that deforestation reduces the diversity of palm tree habitats available to the bugs and their vertebrate hosts, thereby increasing the probability of dispersing adult bugs reaching households. Palms tended to be closer to households in Jaraguá than in either Ponte Alta or Montes Claros (mean distances <350, >420, and >760 m, respectively), a fact that could ease household invasion. Finally, the rates of natural infection by *T. cruzi* were also higher in Jaraguá (about 6%), but infected bugs were found in all three survey localities and in all but one palm species (Table 5). Infection by *T. rangeli* was only detected in bugs from *M. flexuosa* palms collected in Ponte Alta (Diotaiuti et al., 1992).

The results of precipitin tests agree with the view that *R. neglectus* is mainly ornithophilic but may also feed on mammals (Table 6). The fact that a large proportion of samples did not react against our limited (see above) antisera battery (up to >80% in Ponte Alta) suggests that these bugs may be much more eclectic in their feeding tastes than previously thought. The high fraction of non-reactive samples in Ponte Alta seems to parallel the locally higher diversity of palms, which might perhaps provide shelter to a more diverse vertebrate fauna.

Table 4

Rhodnius neglectus in palm trees of the Brazilian Cerrado: World Health Organisation density and crowding indices.

Palm species	Number of palms		Number of bugs			WHO entomological indices ^a	
	Surveyed	Infested	Adult	Nymph	Total	Density	Crowding
<i>Attalea speciosa</i>	40	33	138	219	357	8.93	10.82
<i>Attalea phalerata</i>	49	13	10	38	48	0.98	3.69
<i>Oenocarpus distichus</i>	20	1	1	0	1	0.05	1
<i>Acrocomia aculeata</i>	47	22	145	141	286	6.09	13
<i>Syagrus oleracea</i>	10	2	1	10	11	1.1	5.5
<i>Mauritia flexuosa</i>	40	33	90	139	229	5.73	6.94
Total	206	104	385	547	932	4.52	8.96

^a Density = number of bugs collected/number of palms surveyed; crowding = number of bugs collected/number of infested palms.

Table 5
Natural infection by *Trypanosoma cruzi* among *Rhodnius neglectus* collected from six palm tree species in the municipalities of Ponte Alta (state of Tocantins) and Jaraguá and Montes Claros (state of Goiás), Brazil.

Palm species	Bugs examined and Natural Infection Index ^a						Total	
	Ponte Alta		Jaraguá		Montes Claros			
<i>Acrocomia aculeata</i>	83	0	47	2.1	156	1.3	286	1.05
<i>Attalea speciosa</i>	145	1.4	0	–	212	3.3	357	2.52
<i>Attalea phalerata</i>	0	–	10	20	38	0	48	4.17
<i>Syagrus oleracea</i>	0	–	11	9.1	0	–	11	9.09
<i>Mauritia flexuosa</i>	150	2	0	–	79	0	229	1.31
<i>Oenocarpus distichus</i>	1	0	0	–	0	–	1	0
Total	378	1.3	68	5.9	485	1.9	932	1.93

^a Natural Infection Index = percentage of bugs in which infection by *Trypanosoma cruzi* was detected.

Table 6
Feeding preferences of palm tree-living *Rhodnius neglectus* (Jaraguá and Montes Claros, state of Goiás; and Ponte Alta, state of Tocantins) and *Rhodnius nasutus* (Chapada do Araripe, state of Ceará): results of precipitin reaction tests; all samples tested negative against human, dog, rodent, pig, and lizard antisera.

Species and locality	Stage	Antisera and % reactive samples				Non-reactive samples (%)	Number of samples examined
		Bird	Cat	Bat	Opossum		
<i>Rhodnius neglectus</i> Jaraguá	Adult	31.25	0	0	0	68.75	16
	Nymph	34.48	0	0	3.45	62.07	29
	Total	33.33	0	0	2.22	64.44	45
<i>Rhodnius neglectus</i> Montes Claros	Adult	56.78	0.85	1.69	0	40.68	118
	Nymph	71.43	0	0	0	28.57	7
	Total	57.60	0.8	1.6	0	40	125
<i>Rhodnius neglectus</i> Ponte Alta	Adult	9.38	0	0	0	90.63	32
	Nymph	29.63	0	0	0	70.37	27
	Total	18.64	0	0	0	81.36	59
<i>Rhodnius neglectus</i> (total)	Adult	45.18	0.60	1.20	0	53.01	166
	Nymph	36.51	0	0	1.59	61.90	63
	Total	42.79	0.44	0.87	0.44	55.46	229
<i>Rhodnius nasutus</i> Chapada do Araripe	Adult	15.2	0	Nt	37	48.9	30 ^a
	Nymph	20	0	Nt	63.3	23.3	92 ^a
	Total	16.4	0	Nt	43.4	42.6	122

Nt = not tested.

^a Three *R. nasutus* specimens (two nymphs and one adult) tested positive for both bird and opossum blood.

Natural infection by *T. cruzi* was more frequent in *R. nasutus* than in *R. neglectus*. Almost 17% of *R. nasutus* from the Chapada do Araripe were infected, with a maximum rate of 21.5% in bugs collected in *A. speciosa* palms (Table 7). These triatomines appeared to be only partially ornithophilic, with a high proportion of samples reacting against opossum antisera (>43%) in precipitin tests; a similar number of samples (42.6%) did not react against our antisera battery (Table 6). A detailed comparison of phenotypic traits revealed striking chromatic and size-related variation in *R. nasutus* collected from either *A. speciosa* or *C. prunifera* palms in Ceará. While the latter match the original description by Stål (small, brown-reddish

Table 7
Natural infection by *Trypanosoma cruzi* among *Rhodnius nasutus* collected from five palm tree species in the Chapada do Araripe (state of Ceará), Brazil.

Palm species	Bugs		NII ^a
	Examined	Infected	
<i>Attalea speciosa</i>	144	31	21.5
<i>Mauritia flexuosa</i>	15	1	6.7
<i>Copernicia prunifera</i>	16	0	0
<i>Syagrus oleracea</i>	148	29	19.6
<i>Acrocomia intumescens</i>	59	3	5.1
Total	382	64	16.8

^a NII, Natural Infection Index (percentage of bugs in which infection by *Trypanosoma cruzi* was detected).

bugs), the former tend to be larger on average (but with similar overall head and wing shape) and markedly darker (Diotaiuti et al., 2005; Dias, 2007). Both chromatic and size variation in the absence of shape divergence may be explained by adaptive phenotypic plasticity related to microhabitat features, with the fixation of substrate-matching hues (light-reddish in *Copernicia* and dark-brown in *Attalea*) driven by predation pressure and size variation by palm crown microclimate (drier-hotter in *Copernicia* than in *Attalea*) (Gaunt and Miles, 2000; Abad-Franch et al., 2003a; Lorenzo et al., 2003).

2.2.4. Conclusions

Taken as a whole, the results of our mesoscale ecological survey suggest the following:

- (1) *R. neglectus* is an ecologically versatile species capable of exploiting diverse palm tree habitats and vertebrate hosts (preferentially birds) in the wild.
- (2) *R. nasutus* is more eclectic and ecologically diverse than previously thought. It was only known to occur in *C. prunifera* and *A. speciosa*, but we detected infestation of three further palm species: *Ac. intumescens*, *M. flexuosa*, and *S. oleracea*; unpublished observations (LD) indicate that it can also infest the nests of furnariid birds built on trees in the Caatinga. We also confirmed that this species is common in the humid premontane formations that punctuate the semi-arid Caatinga in northeastern Brazil. *R. nasutus* palm populations exploit both avian and mammalian

blood sources. Finally, our data suggest that micro-habitat adaptations probably underlie phenotypic diversity in *R. nasutus*, with chromatic and size variants associated with different palm species. The patterns of palm tree infestation by sylvatic populations of *R. neglectus* and *R. nasutus* are heterogeneous at the landscape scale; in our sample, palm infestation rates were higher in the state of Ceará, intermediate in Goiás, and lower in Tocantins. Palm trees were significantly more likely to harbour sylvatic *Rhodnius* breeding colonies in the Caatinga than in the Cerrado.

- (3) Species-specific palm traits also seem to modulate the likelihood of infestation; architectural complexity, microclimate traits, and host abundance/diversity are all possible (and very probably not mutually exclusive) causes (Romaña et al., 1999; Lorenzo et al., 2003; Abad-Franch et al., 2005).
- (4) Finally, deforestation and habitat loss may result in a higher likelihood of contact between infected *R. neglectus* and humans in central Brazil; vector surveillance efforts should, therefore, concentrate in heavily deforested areas (rural or peri-urban) where large palms are common near households. These dynamics may very well not be restricted to our survey sites and our target palm and triatomine species; other palms and other *Rhodnius* species are probably subject to similar ecological stressors in other subregions of Latin America, and may be responding in similar ways.

3. Final considerations

Integrating different spatial scales into a comprehensive framework represents a major challenge in ecological research (Levin, 1992; Leibold et al., 2004). It entails the recognition that many, highly diverse factors and processes contribute to shape the patterns of biological diversity, and that, as S.A. Levin (1992; abstract) put it, “there is no single natural scale at which ecological phenomena should be studied”. However modest, our present contribution to this undertaking consists in highlighting the importance of explicitly considering different spatial scales in infectious disease ecology research. Each of these scales calls for specific questions, and this translates into such crucial methodological issues as the formulation of hypotheses, the deduction of predictions, the choice of variables to be measured, the design of sampling strategies, the analytical treatment of the data, and the extension and depth of the derived inferences and interpretations. In other words, we stress the fact that ecological dynamics are strongly dependent on the scale at which the phenomena of interest are considered, and that a coherent view of those phenomena can only be derived from the understanding of multi-scale patterns (Levin, 1992).

In practical terms, we suggest that the development of epidemiological risk management tools is also scale-dependent. First, both macro- and mesoscale eco-epidemiological knowledge can be used for spatially explicit disease transmission risk modelling; the derived risk maps may help optimise resource allocation for disease control-surveillance. Second, the identification of mesoscale (landscape) factors that can result in higher likelihood of contact between infected vectors and susceptible humans (e.g., biodiversity loss, species-specific palm traits, and demographic or behavioural shifts in vectors or reservoirs) can guide the design of site-specific surveillance systems and, perhaps, also of environmental management strategies to aid vector control (Abad-Franch et al., 2005). Finally, evidence-based eco-epidemiological wisdom can stimulate (and perhaps orient) the debate over the need for development policies that acknowledge the predictable effects of anthropic environmental transformations on public health. We anticipate that, by helping define the distribution patterns and ecological preferences

of each vector species, multi-scale research will significantly strengthen disease control-surveillance systems across Latin America.

Acknowledgements

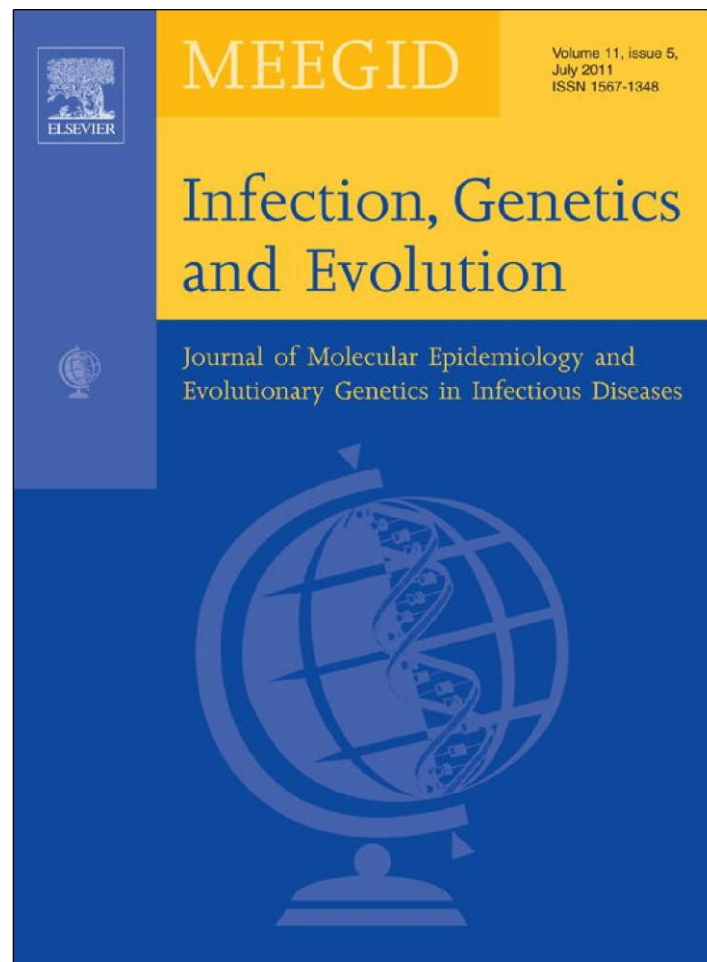
Different parts of this work were funded by the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO TDR Special Programme (ID#A20441), the agreements Fiocruz-CNPq and Fiocruz-FAPEAM, FAP-DF, FAPEMIG, CNPq, and the CPqRR. This work also benefited from international collaboration through the ECLAT Network. FA-F's contribution to this work derives from the activities of the Research Programme on Infectious Disease Ecology in the Amazon (RP-IDEA) of the Instituto Leônidas & Maria Deane; this paper is, in this sense, publication number 5 of the RP-IDEA.

References

- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An. Acad. Bras. Ciências* 77, 437–454.
- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., 2007. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1), 57–69.
- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., Aguilar, H.M., Miles, M.A., 2004. Population-level mitochondrial DNA sequence diversity in *Rhodnius ecuadoriensis*. In: Programme and abstracts, IX European Multicolloquium of Parasitology, Valencia, Spain, July 2004, p. 201.
- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., Patterson, J.S., Aguilar, H.M., Beard, C.B., Miles, M.A., 2003a. Population phenotypic plasticity linked to ecological adaptations in Triatominae. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 45 (Suppl. 13), 199–200.
- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., Patterson, J.S., Miles, M.A., 2003b. Phylogenetic relationships among members of the Pacific *Rhodnius* lineage (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Infect. Genet. Evol.* 2, 244–245.
- Abad-Franch, F., Palomeque, F.S., Aguilar, V.H.M., Miles, M.A., 2005. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Trop. Med. Int. Health* 10, 1258–1266.
- Abad-Franch, F., Paucar, C.A., Carpio, C.C., Cuba Cuba, C.A., Aguilar, V.H.M., Miles, M.A., 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 611–620.
- Ab'Saber, A.N., 1977. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. *Geomorfologia* 52, 1–21.
- Aguilar, H.M., Abad-Franch, F., Dias, J.C.P., Junqueira, A.C.V., Coura, J.R., 2007. Chagas disease in the Amazon region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1), 47–55.
- Aldana, E., Lizano, E., Valderrama, A., 2003. Revisión del estatus taxonómico de *Rhodnius pictipes* Stål 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Bol. Malariol. Salud Amb.* 43, 31–38.
- Aleixo, A., 2004. Historical diversification of a “terra-firme” forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* 58, 1303–1317.
- Aleixo, A., Rosetti, D.F., 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *J. Ornithol.* 148 (Suppl. 2), S443–S453.
- Alencar, J.E. 1987. História natural da doença, a de Chagas no Ceará. Imprensa Universitária, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 341 pp.
- Anonymous, 2007. Workshop on epidemiology and social determining factors of Chagas disease. Basic information for surveillance and control policy in Latin America. Introduction, regional context, precedents, and recommendations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1), 5–10.
- Asmussen, C.B., Dransfield, J., Deickmann, V., Barfod, A.S., Pintaud, J.C., Baker, W.J., 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Bot. J. Linn. Soc.* 151, 15–38.
- Avise, J.C., Walker, D., 1999. Species realities and numbers in sexual vertebrates: Perspectives from an asexually transmitted genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 992–995.
- Barrett, T.V., 1991. Advances in triatomine bug ecology in relation to Chagas disease. *Adv. Dis. Vector Res.* 8, 143–176.
- Barrett, T.V., 1996. Species interfertility and crossing experiments in triatomine systematics. In: Schofield, C.J., Dujardin, J.P., Jurberg, J. (Eds.), Proceedings of the International Workshop on population genetics and control of Triatominae. Santo Domingo de los Colorados, Ecuador, September 1995. INDRE, Mexico City, pp. 72–77.
- Barretto, M.P., 1976. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 10, 339–353.
- Barretto, M.P., 1979. Epidemiologia. In: Z. Brener and Z. Andrade (Eds.) *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 89–151.
- Barretto, M.P., Siqueira, A.F., Ferrioli, F.F., Carvalho, J.R., 1968. Estudos sobre reservatórios e vetores do *Trypanosoma cruzi*. XXIII. Observações sobre criadouros do

- Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em biótopos artificiais (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 10, 163–170.
- Bjorholm, S., Svenning, J.C., Baker, W.J., Skov, F., Balslev, H., 2006. Historical legacies in the geographical diversity patterns of new world palm (Arecaceae) subfamilies. Bot. J. Linn. Soc. 151, 113–125.
- Bjorholm, S., Svenning, J.C., Skov, F., Balslev, H., 2005. Environmental and spatial controls of palm (Arecaceae) species richness across the Americas. Global Ecol. Biogeogr. 14, 423–429.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., Abebe, E., 2005. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 360, 1935–1943.
- Bookstein, F.L., 1991. Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge University Press, Cambridge, xvii + 435 pp.
- Carcavallo, R.U., Galíndez-Girón, I., Jurberg, J., Lent, H. (Eds.) 1999. Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Vol. III. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 393 pp.
- Carcavallo, R.U., Martínez, A. 1985. Biología, ecología y distribución geográfica de los triatomíneos americanos. In: R.U. Carcavallo, J.E. Rabinovich and R.J. Tonn (Eds.), Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas, Vol. II. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud OPS/OMS – Servicio Nacional de Chagas, Ministerio de Salud y Acción Social, Buenos Aires, pp. 149–208.
- Chagas, C.R.J., 1909. Nova Trypanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159–218.
- Chávez, J., 2006. Contribución al estudio de los triatomíneos del Perú: distribución geográfica, nomenclatura y notas taxonómicas. An. Fac. Med. Lima 67, 65–76.
- Condit, R., Pitman, N., Leigh Jr., E.G., Chave, J., Terborgh, J., Foster, R.B., Nuñez, P., Aguilar, S., Valencia, R., Villa, G., Muller-Landau, H.C., Losos, E., Hubbell, S.P., 2002. Beta-diversity in tropical forest trees. Science 295, 666–669.
- Conn, J.E., Mirabello, L., 2007. The biogeography and population genetics of Neotropical vector species. Heredity 99, 245–256.
- Correa, R.R., 1968. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil, e em especial no Estado de São Paulo. Rev. Bras. Malariol. Doenc. Trop. 20, 39–81.
- Costa, L.P., 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. J. Biogeogr. 30, 71–86.
- Coura, J.R., 2007. Chagas disease: what is known and what is needed—a background article. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102 (Suppl. 1), 113–122.
- Coura, J.R., Junqueira, A.C.V., Fernandes, O., Valente, S.A.S., Miles, M.A., 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 18, 171–176.
- Cox, C.B., Moore, P.D., 2000. Biogeography. An Ecological and Evolutionary Approach. Blackwell Science, Oxford, 298 pp.
- Cuba, C.A., Abad-Franch, F., Roldán, R.J., Vargas, V.F., Pollack, V.L., Miles, M.A., 2002. The triatomines of northern Peru, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 175–183.
- de Paula, A.S., Diotaiuti, L., Galvão, C., 2007. Systematics and biogeography of *Rhodnius* (Heteroptera: Reduviidae: Triatominae) based on 16S mitochondrial rDNA sequences. J. Biogeogr. 34, 699–712.
- Dias, F.B.S. 2007. Ecologia de *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) em palmeiras da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. MSc. Thesis, Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, 121 pp.
- Dias, J.C.P. 2002. O controle da doença de Chagas no Brasil. In: A.C. Silveira (Ed.) El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa internacional. 1991/2001. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro—Pan American Health Organization, Uberaba, pp. 145–250.
- Dias, J.C.P., Machado, E.M.M., Fernandes, A.L., Vinhaes, M.C., 2000. Esboço geral e perspectivas da doença de Chagas no Nordeste do Brasil. Cad. Saúde Públ. 16 (Suppl. II), 13–34.
- Diotaiuti, L., Dias, J.C.P., 1984. Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 79, 293–301.
- Diotaiuti, L., Lorenzo, M.G., Dias, F.B.S., Bezerra, C.M., Garcia, M.H., Paula, A.S., 2005. Influência da espécie de palmeira sobre o tamanho de *Rhodnius nasutus* (Stål, 1859) provenientes de carnaúbas ou babaçus do Ceará, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38 (Suppl. 1), 44.
- Diotaiuti, L., Silveira, A.C., Elias, M., Steindel, M., 1992. The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the state of Tocantins, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87, 451.
- dos Santos, S.M., Lopes, C.M., Dujardin, J.P., Panzera, F., Pérez, R., Carbajal de la Fuente, A.L., Pacheco, R.S., Noireau, F., 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). Infect. Genet. Evol. 7, 469–475.
- Dujardin, J.P., Beard, C.B., Ryckman, R., 2007. The relevance of wing geometry in ento-mological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. Infect. Genet. Evol. 7, 161–167.
- Dujardin, J.P., Munoz, M., Chávez, T., Ponce, C., Moreno, J., 1998. The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America. Med. Vet. Entomol. 12, 113–115.
- Dujardin, J.P., Panzera, F., Schofield, C.J., 1999. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94 (Suppl. 1), 223–228.
- Feliciangeli, M.D., Sánchez-Martín, M., Marrero, R., Davies, C., Dujardin, J.P., 2007. Morphometric evidence for a possible role of *Rhodnius prolixus* from palm trees in house re-infestation in the State of Barinas (Venezuela). Acta Trop. 101, 169–177.
- Forattini, O.P., 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. Rev. Saúde Públ. 14, 265–299.
- Forattini, O.P., Barata, J.M.S., Santos, J.L.F., Silveira, A.C., 1981. Hábitos alimentares, infecção natural e distribuição de triatomíneos domiciliados na região Nordeste do Brasil. Rev. Saúde Públ. 15, 113–164.
- Galvão, C., Rocha, D.S., Carcavallo, R.U., 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.
- Garzón-Orduña, I.J., Miranda-Esquivel, D.F., Donato, M., 2007. Parsimony analysis of endemism describes but does not explain: an illustrated critique. J. Biogeogr. 35, 903–913, doi:10.1111/j.1365-2699.2007.01842.x.
- Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2000. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95, 557–565.
- Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. Mol. Biol. Evol. 19, 748–761.
- Gotelli, N.J., Colwell, R.K., 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. Ecol. Lett. 4, 379–391.
- Gregory-Wodzicki, K.M., 2000. Uplift history of the central and northern Andes: a review. GSA Bull. 112, 1091–1105.
- Grijalva, M.J., Palomeque-Rodríguez, F.S., Costales, J.A., Dávila, S., Arcos-Terán, L., 2005. High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. J. Med. Entomol. 42, 68–74.
- Guhl, F., Aguilera, G., Pinto, N., Vergara, D., 2007. Updated geographical distribution and ecopidemiology of the triatomine fauna (Reduviidae: Triatominae) in Colombia. Biomédica 27 (Suppl. 1), 143–162.
- Guilherme, A.L., Pavanelli, G.C., Silva, S.V., Costa, A.L., de Araújo, S.M., 2001. Secondary triatomine species in dwellings and other nearby structures in municipalities under epidemiological surveillance in the state of Paraná, Brazil. Rev. Panam. Salud Públ. 9, 385–392.
- Gumiell, M., Catalá, S., Noireau, F., Rojas de Arias, A., García, A., Dujardin, J.P., 2003. Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanostoma* Martínez, Olmedo and Carcavallo (Hemiptera, Reduviidae). Syst. Entomol. 28, 173–179.
- Gurgel-Gonçalves, R., Abad-Franch, F., Ferreira, J.B.C., Santana, D.B., Cuba, C.A.C., 2008. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in Central Brazil? Acta Trop. 107, 90–98.
- Gurgel-Gonçalves, R., Duarte, M.A., Ramalho, E.D., Romão, C.A., Cuba, C.A.C., 2004a. Distribuição espacial de populações de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito Federal, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 37, 241–247.
- Gurgel-Gonçalves, R., Palma, A.R.T., Menezes, M.N.A., Leite, R.N., Cuba, C.A.C., 2003. Sampling *Rhodnius neglectus* (Triatominae) in *Mauritia flexuosa* palm trees (Arecaceae): a field study in the Brazilian Savanna. Med. Vet. Entomol. 17, 347–349.
- Gurgel-Gonçalves, R., Ramalho, E.D., Duarte, M.A., Palma, A.R.T., Abad-Franch, F., Caranza, J.C., Cuba, C.A.C., 2004b. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 46, 323–330.
- Haffer, J., 1969. Speciation in Amazonian forest birds. Science 165, 131–137.
- Haffer, J., 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. Biodiv. Conserv. 6, 451–476.
- Harry, M., 1993. Use of the median process of the pygophore in the identification of *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae). Ann. Trop. Med. Parasitol. 87, 277–282.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R., 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B 270, 313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., de Waard, J.R., 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc. R. Soc. Lond. B 270 (Suppl.), S96–S99.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemlak, T.S., Francis, C.M., 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biol. 2, 1657–1663.
- Henderson, A.J., Galeano, G., Bernal, R., 1995. Field Guide to the Palms of the Americas. Princeton University Press, Princeton, NJ, 352 pp.
- Hooghiemstra, H., Van Der Hammen, T., 1998. Neogene and Quaternary development of the Neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. Earth Sc. Rev. 44, 147–183.
- Irestedt, M., Fjeldså, J., Ericson, P.G.P., 2006. Evolution of the ovenbird-woodcreeper assemblage (Aves: Furnariidae)—major shifts in nest architecture and adaptive radiation. J. Avian Biol. 37, 260–272.
- Kahn, F., 1990. Clave para diferenciar los géneros de Palmae en la Amazonia a partir del aparato vegetativo, complementada por una breve descripción de los géneros, la distribución geográfica y ecológica, y los nombres vernáculos más comunes. Bull. Inst. Fr. Études Andines 19, 351–378.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5, 150–163.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33, 159–174.
- Leibold, M.A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J.M., Hoopes, M.F., Holt, R.D., Shurin, J.B., Law, R., Tilman, D., Loreau, M., González, A., 2004. The metacommunity concept: a framework for multi-scale community ecology. Ecol. Lett. 7, 601–613.
- Lent, H., 1954. Comentários sobre o gênero *Rhodnius* Stål com descrição de uma nova espécie do Brasil (Hemiptera, Reduviidae). Rev. Bras. Biol. 14, 237–247.

- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163, 520–529.
- Levin, S.A., 1992. The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology* 76, 1943–1967.
- Lorenzi, H., Souza, H.M., Medeiros-Costa, J.T., Cerqueira, L.S.C., Behr, N., 1996. Palmeiras no Brasil, nativas e exóticas. Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, 303 pp.
- Lorenzo, M.G., Minoli, A.S., Lazzari, C.R., Paula, A.S., Diotaiuti, L., 2003. O microclima dos ecótipos naturais das espécies do gênero *Rhodnius* no município de Tocantinópolis, estado de Tocantins, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (Suppl. 1), 425.
- Lucena, D.T., Lima-Borba, H., 1977. *Panstrongylus megistus leucofasciatus* Lucena, 1959 e *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Triatominae) em Pernambuco, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19, 332–334.
- Martins, A.V., Versiani, V., Tupinambá, A.A., 1940. Estudos sobre a tripanosomíase Americana em Minas Gerais, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 35, 285–301.
- Mathers, C.D., Lopez, A.D., Murray, C.J.L., 2006. The burden of disease and mortality by condition: data, methods, and results for 2001. In: Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Murray, C.J.L., Jamison, D.T. (Eds.), *Global Burden of Disease and Risk Factors*. Oxford University Press-World Bank, New York, NY, pp. 45–234.
- Matias, A., De La Riva, J., Martínez, E., Torrez, M., Dujardin, J.P., 2003. Domiciliation process of *Rhodnius stali* (Hemiptera: Reduviidae) in Alto Beni, La Paz. *Bolivia. Trop. Med. Int. Health* 8, 264–268.
- Matias, A., De La Riva, J., Torrez, M., Dujardin, J.P., 2001. *Rhodnius robustus* in Bolivia identified by its wings. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 947–950.
- Miles, M.A., Feliciangeli, M.D., Rojas de Arias, A., 2003. Science, medicine, and the future: American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 326, 1444–1448.
- Miller, S.E., 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4775–4776.
- Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Brooks, T.M., Pilgrim, J.D., Konstant, W.R., da Fonseca, G.A.B., Kormos, C., 2003. Wilderness and biodiversity conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10309–10313.
- Monteiro, F.A., Barrett, T.V., Fitzpatrick, S., Córdón-Rosales, C., Feliciangeli, M.D., Beard, C.B., 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol. Ecol.* 12, 997–1006.
- Monteiro, F.A., Escalante, A.A., Beard, C.B., 2001. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends Parasitol.* 17, 344–347.
- Monteiro, F., Wesson, D.M., Dotson, E.M., Schofield, C.J., Beard, C.B., 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 460–465.
- Morel, C.M., Lazdins, J., 2003. Chagas disease. *Nature Rev. Microbiol.* 1, 14–15.
- Morrone, J.J., 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 467–494.
- Nores, M., 1999. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *J. Biogeogr.* 26, 475–485.
- Nores, M., 2004. The implications of tertiary and quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecol. Biogeogr.* 13, 149–161.
- Oliveira, A.W.S., Silva, I.G., 2007. Distribuição geográfica e indicadores entomológicos de triatomíneos sinantrópicos capturados no Estado de Goiás. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 204–208.
- Olson, D.M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E.D., Burgess, N.D., Powell, G.V.N., Underwood, E.C., D'Amico, J.A., Itoua, I., Strand, H.E., Morrison, J.C., Loucks, C.J., Allnutt, T.F., Ricketts, T.H., Kura, Y., Lamoreux, J.F., Wettengel, W.W., Hedao, P., Kassem, K.R., 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: a new map of life on Earth. *Bioscience* 51, 933–938.
- Ostfeld, R.S., Glass, G.E., Keesing, F., 2005. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol. Evol.* 20, 328–336.
- Pavan, M.G., Monteiro, F.A., 2007. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Trop. Med. Int. Health* 12, 751–758.
- Pellegrino, J., 1950. Novos dados sobre a distribuição de triatomíneos e sua infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* no estado de Minas Gerais (Brasil). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 48, 639–667.
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gómez-Zurita, J., Cardoso, A., Durán, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D., Vogler, A.P., 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Syst. Biol.* 55, 595–609.
- Porzecanski, A.L., Cracraft, J., 2005. Cladistic analysis of distributions and endemism (CADE): using raw distributions of birds to unravel the biogeography of the South American aridlands. *J. Biogeogr.* 32, 261–275.
- Quijada-Mascareñas, J.A., Ferguson, J.E., Pook, C.E., Salomão, M.D.G., Thorpe, R.S., Wüster, W., 2007. Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. *J. Biogeogr.* 34, 1296–1312.
- Racheli, L., Racheli, T., 2004. Patterns of Amazonian area relationships based on raw distributions of papilionid butterflies (Lepidoptera: Papilionidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 82, 345–357.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., 2007. BOLD: the barcode of life data system (www.barcodinglife.org). *Mol. Ecol. Notes* 7, 355–364.
- Ribas, C.C., Gaban-Lima, R., Miyaki, C.Y., Cracraft, J., 2005. Historical biogeography and diversification within the Neotropical parrot genus *Pionopsitta* (Aves: Psittacidae). *J. Biogeogr.* 32, 1409–1427.
- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552–569.
- Rohlf, F.J., 1996. Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. In: Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P., Slice, D. (Eds.), *Advances in Morphometrics*. NATO ASI, Series A, Life Sciences. Plenum Publication, New York, NY, pp. 117–129.
- Rohlf, F.J., 1999a. *tpsDig*, version 1.18. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
- Rohlf, F.J., 1999b. *tpsRe/w*, version 1.18. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/>).
- Romaña, C.A., Pizarro, J.C., Rodas, E., Guilbert, E., 1999. Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 594–595.
- Ron, S.R., 2000. Biogeographic area relationships of lowland Neotropical rainforest based on raw distributions of vertebrate groups. *Biol. J. Linn. Soc.* 71, 379–402.
- Rosen, B.R., 1988. From fossils to Earth history: applied historical biogeography. In: Myers, A.A., Giller, P.S. (Eds.), *Analytical Biogeography: An Integrated Approach to the Study of Animal and Plant Distributions*. Chapman and Hall, London, pp. 437–481.
- Rosen, B.R., Smith, A.B., 1988. Tectonics from fossils? Analysis of reef-coral and sea-urchin distributions from late Cretaceous to recent, using a new method. In: Audley-Charles, M.G., Hallman, A. (Eds.), *Gondwana and Tethys*, 37. Special Publication of the Geological Society of London, pp. 275–306.
- Sarquis, O., Borges-Pereira, J., Mac Cord, J.R., Gomes, T.F., Cabello, P.H., Lima, M.M., 2004. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 263–270.
- Sarquis, O., Sposina, R., de Oliveira, T.G., Mac Cord, J.R., Cabello, P.H., Borges-Pereira, J., Lima, M.M., 2006. Aspects of peridomiciliary ecotopes in rural areas of North-eastern Brazil associated to triatomine (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 143–147.
- Schachter-Broido, J., Dujardin, J.P., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2004. Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *J. Med. Entomol.* 41, 643–649.
- Schofield, C.J., Jannin, J., Salvatella, R., 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 22, 583–588.
- Silva, R.A., Bonifácio, P.R., Wanderley, D.M.V., 1999. Doença de Chagas no estado de São Paulo: comparação entre pesquisa ativa de triatomíneos em domicílios e notificação de sua presença pela população em área sob vigilância entomológica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32, 653–659.
- Silveira, A.C., Feitosa, V.R., Borges, R., 1984. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1975/83, Brasil. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.* 39, 15–312.
- Siqueira, A.F., 1960. Estudos sobre a reação de precipitina aplicada à identificação de sangue ingerido por triatomíneos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2, 41–53.
- TNC (The Nature Conservancy) 2001. Latin America and the Caribbean—vegetation and elevation. http://conserveonline.org/docs/2001/06/lac_veg.jpg.
- Teixeira, A.R.L., Monteiro, P.S., Rebelo, J.M., Arganaraz, E.R., Vieira, D., Lauria-Pires, L., Nascimento, R., Vexenat, C.A., Silva, A.R., Ault, S.K., Costa, J.M., 2001. Emerging Chagas disease: trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 100–112.
- Valente, V.C., Valente, S.A.S., Carcavallo, R.U., Rocha, D.S., Galvão, C., Jurberg, J., 2001. Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius* Stål, do estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol. Vect.* 8, 65–80.
- Villegas, J., Feliciangeli, M.D., Dujardin, J.P., 2002. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). *Infect. Genet. Evol.* 2, 121–128.
- WHO (World Health Organisation) 2004. The World Health Report 2004: Changing History. World Health Organisation, Geneva, xvii + 170 pp.
- World Bank, 1993. World Development Report 1993. Investing in Health. Oxford University Press, New York, NY, 329 pp.
- WWF-TNC (World Wildlife Fund and The Nature Conservancy) 2001. Ecoregions of Latin America and the Caribbean. http://conserveonline.org/docs/2001/06/lac_ecoregions.jpg.
- Zeledón, R., Marin, F., Calvo, N., Lugo, E., Valle, S., 2006. Distribution and ecological aspects of *Rhodnius pallescens* in Costa Rica and Nicaragua and their epidemiological implications. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 75–79.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Influence of the palm tree species on the variability of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Fernando Braga Stehling Dias^a, Alexandre Silva de Paula^b, Carlota Josefovicz Belisário^a,
Marcelo Gustavo Lorenzo^a, Cláudia Mendonça Bezerra^c, Myriam Harry^d, Liléia Diotaiuti^{a,*}

^a Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas, Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715 Barro Preto, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente, Campus Morro do Cruzeiro, s/n - 35400-000 Ouro Preto, MG, Brazil

^c Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, Brazil

^d LEGS, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex & Université Paris sud-11, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2010

Received in revised form 31 January 2011

Accepted 8 February 2011

Available online 16 February 2011

Keywords:

Rhodnius nasutus

Ceará

Palm trees

Morphometry

Microclimatic data

Microsatellites

ABSTRACT

This work evaluated the occurrence and genetic structure of *Rhodnius nasutus* sampled in two sites using morphometry and microsatellites. These sites, presented distinct abiotic features and palm trees: (i) nine *Attalea speciosa* palm trees, so called babaçu, were sampled from the Meruoca Mountain Ridge, a sloping region of remnant forest in the state of Ceará, Brazil, and (ii) 17 *Copernicia prunifera* palm trees, so called carnaúba, were sampled in the scrub savanna region (Sobral district) that surrounds the mountain ridge. Of the twenty-six palm trees dissected, 70.6% of carnaúba and 88.9% of babaçu were infested by *R. nasutus*. The micro-climatic data where *R. nasutus* were sheltered demonstrated that the babaçu and carnaúba palm trees presented significant differences ($p < 0.05$) in relation to the external environment, except for temperature and relative humidity regulation, suggesting that the architecture of the babaçu crown keeps a more stable micro-environment. The morphometric studies of the F1 generation demonstrated that insects from the babaçu (*A. speciosa*) were significantly larger ($p = 0.000$) than those collected in carnaúba (*C. prunifera*) palm trees. Also, microsatellite analysis demonstrated a high genetic differentiation between the two groups of *R. nasutus* ($R_{st} = -0.77$). Our results suggest that the difference in size between the populations is probably related to an incipient process of genetic drift in populations associated to each palm tree, probably also driven by the different climatic features observed in these micro-environments.

©2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Triatominae of the *Rhodnius* Stål genus are generally associated with birds' nests and different species of palm trees (Lent and Wygodzinsky, 1979). *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 has a distribution restricted to the Northeast of Brazil, an area composed of a semi-arid biome called Caatinga (Carcavallo et al., 1998). This Triatominae is closely related to the carnaúba palm tree (*Copernicia prunifera*), which is characteristic of this biome (Alencar, 1987; Lucena and Lima-Borba, 1977; Sarquis et al., 2004), although the insect has also been found infesting other palm tree genera in the state of Ceará (Dias et al., 2008). Moreover, *R. nasutus* is found naturally infected by *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* (Dias et al., 2007). The presence of this Triatominae is relatively frequent in artificial environments, especially in the peri-domicile area, being reported as the fourth most

captured species by the Chagas Disease Control Program (PCDCh) in the Northeastern region and the third most captured in the state of Ceará. These data evidence the potential of *R. nasutus* as a Chagas disease vector in the Brazilian Caatinga.

The state of Ceará is almost completely covered by Caatinga vegetation (92%). The Caatinga biome is of great biogeographical interest because it is related to the origin and the past of the forestal connection between the Amazon and the Atlantic Forest, which covered the whole east coast of South America (Behling et al., 2000). Among 15,500 and 11,500 years ago, South America underwent a period of greater humidity, allowing for a marked expansion of the gallery and mountain ridge forests. Later, due to coastal winds, the top of the mountain ridges and the slopes of the state of Ceará maintained the humidity conditions of the past, preserving the species of the humid forest and establishing what would become the so-called enclaves of the Brazilian Semi-Arid Humid Forest. As such, Ceará mountain ridges can present dense vegetation with residual elements of the Atlantic Forest and the Amazon, such as the babaçu palm tree

*Corresponding author. Tel.: +55 31 33497762; fax: +55 31 32953115.
E-mail address: diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br (L. Diotaiuti).

(*Attalea speciosa*) (Monteiro and Kaz, 1994). Some studies have demonstrated that palm trees of this genus represent one of the main natural ecotopes of the *Rhodnius* species, presenting higher infection rates and triatomine density, in comparison to other palm trees (Romaña et al., 1999; Dias et al., 2008; Abad-Franch et al., 2009).

In this study, the infestation of babaçu palm trees by *R. nasutus* in the Meruoca Mountain Ridge, a forested enclave region in Ceará, is described. *R. nasutus* collected from carnaúba palm trees, derived from the Caatinga that surrounds the Meruoca Mountain Ridge, were compared to specimens captured from babaçu palms occurring in this region. The comparisons were performed by morphometric analysis. We also evaluate the genetic structure of both groups of *R. nasutus* with microsatellite markers with specimens from the first generation of *R. nasutus* obtained by laboratory rearing. In addition, the micro-climatic characteristics of both species of palm trees were analyzed and the relevance of temperature and relative humidity, as potential

promoters of the observed variances between the populations of *R. nasutus* in both palm trees, were examined.

2. Materials and methods

2.1. Sampling of *R. nasutus*

The occurrence of *R. nasutus* was comparatively studied between the Meruoca Mountain Ridge, in the municipal district of Meruoca (S3°31'39"/W40°25'50", 650 m), which is densely populated by babaçu palm trees, and the scrub savanna region that surrounds this mountain ridge, in the municipal district of Sobral (S3°47'42"/W40°23'45", 90 m), where there are an extensive amount of carnaúba palm trees (Figs. 1 and 2). Two captures were performed in 2003. The first sampling occurred between July 19th and 23rd, representing the humid period or the rainy season.

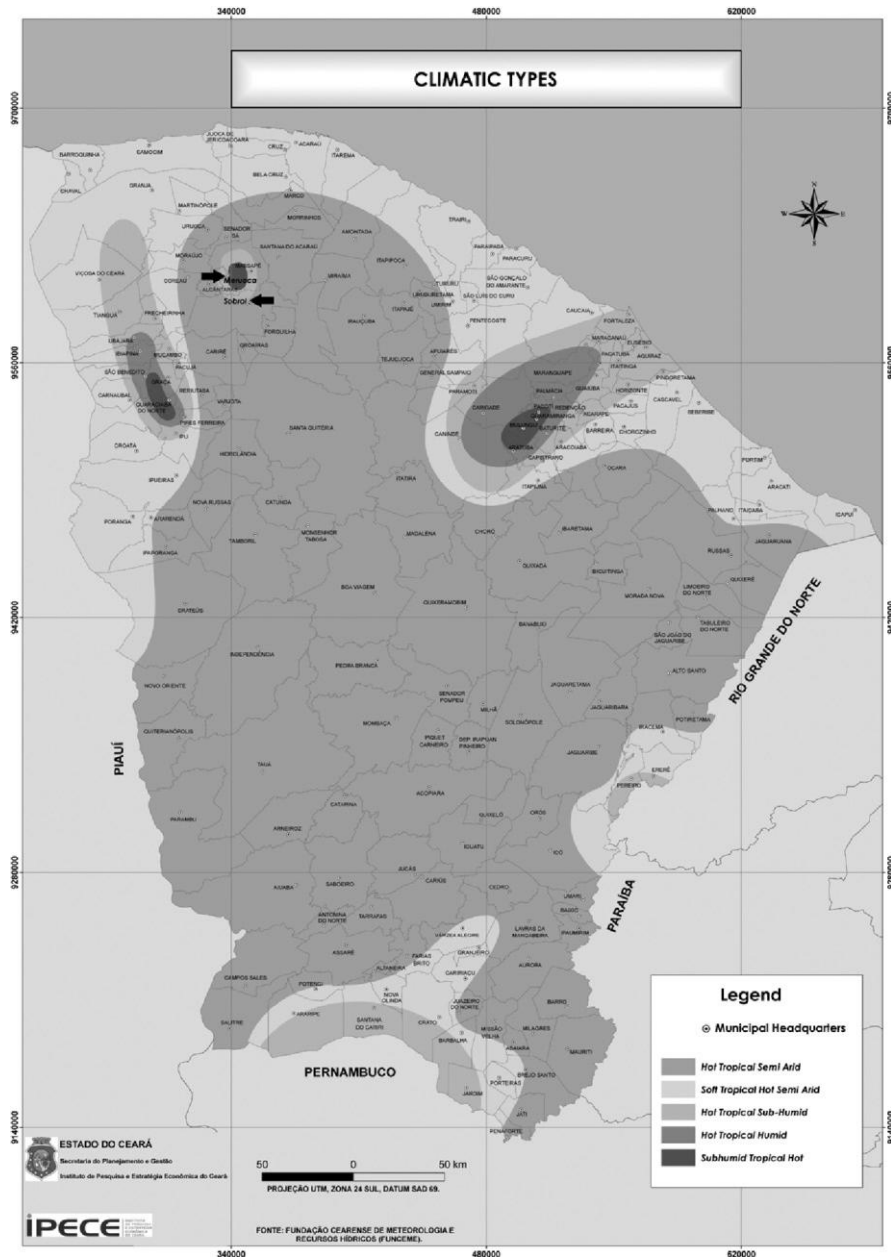


Fig. 1. Meruoca and Sobral shown by arrows over the map of climatic types from Ceará, Brazil. Elevation range from 650 m in Sobral to 90 m in Meruoca. The climatic types are showed in the legend. There is more climatic variability related with the altitude than with the distance between localities.

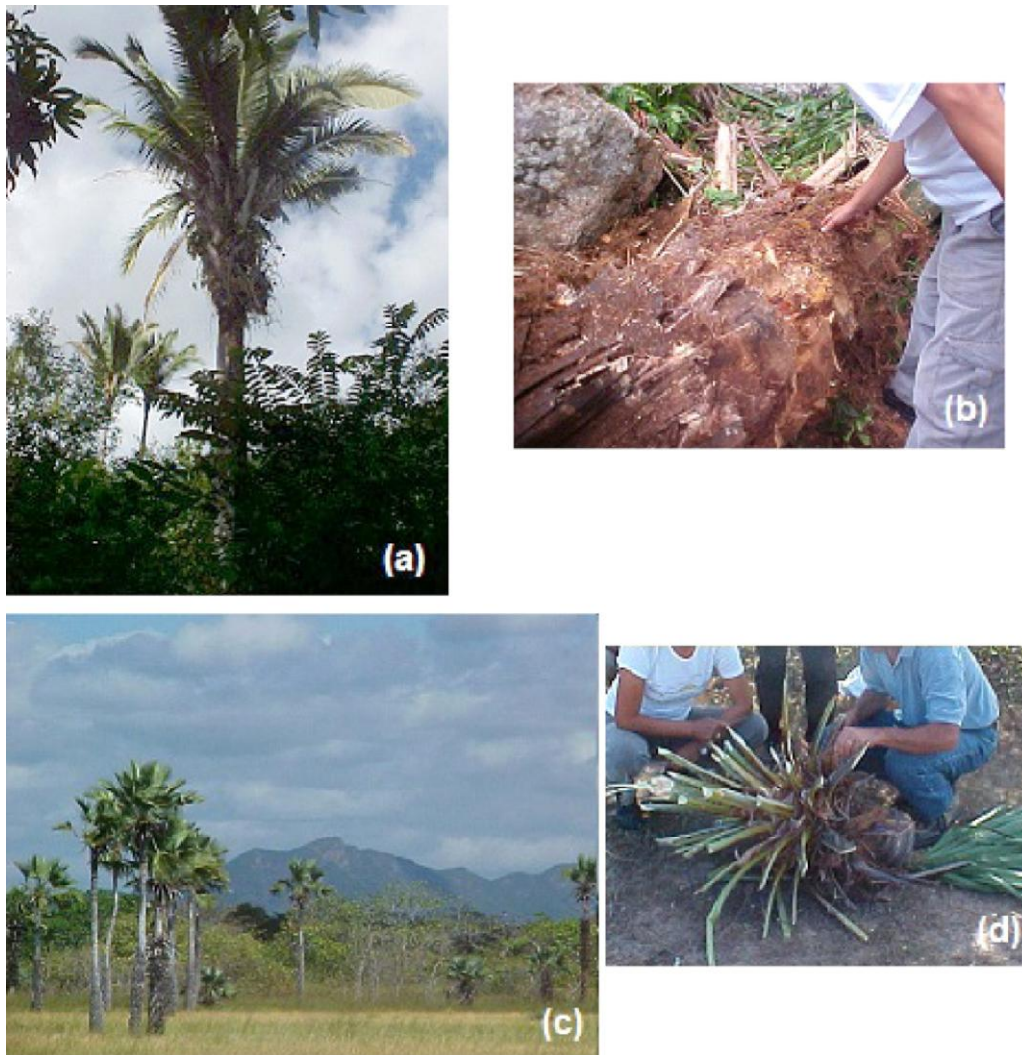


Fig. 2. Palm trees comparatively studied in relation to the infestation by *R. nasutus*, in the Ceará State, Brazil, showing the entire palm and the detail of the crown. Triatomines were found in areas where the leaves overlap. (a) and (b) babaçu palm; (c) and (d) carnaúba palm.

The second sampling was performed between November 17th and 21st, corresponding to the dry period or dry season. The methodology proposed by Diotaiuti and Dias (1984) was used for the collection of *R. nasutus*, after authorization by IBAMA (authorization number 007/2002-COMAF; process 02001.001333/02-71). The palm trees were cut down and dissected for insects. The triatomines collected were taken to the laboratory for constitution of colonies, to be used in the molecular and morphometric analysis. The founder colony was obtained from fertilized females collected in the field, inside the leaves of the palm trees, or fertilized by males filed in the laboratory. The colony was reared under the same environmental condition and food source. The average temperature was 24–26 °C and the mean humidity 70%.

2.2. Microclimatic data

The registration of temperature and relative humidity of the axils of palm trees' leaves, which is the shelter for *R. nasutus*, was measured with programmed Hobo sensors (Hobo® RH, Temp, Light External – Onset Computer Corporation). During each capture period or season (July and November), the micro-climatic data were registered in three babaçu (*A. speciosa*) and three carnaúba palm trees (*C. prunifera*). A reference sensor was placed in the external environment close to the

palm trees and under the shadow. The Hobo® readings were performed during three consecutive days, registering the temperature and relative humidity data at 15 min intervals. For data analysis, the mean values of the three palm trees from each species were used. The mean values of temperature and relative humidity of each palm tree species were compared to the values of the reference Hobo® sensors through a paired t test (Quinn and Keough, 2002). The inferior (25%) and superior (75%) percentiles of the reference sensors' measures were also compared to the palm trees' values, through a paired t test, in order to evaluate the variations of temperature and relative humidity extremes of babaçu and carnaúba species.

2.3. Morphometric analysis

Morphometric studies were carried out on reared insects from the F1 generation – 15 females and 15 males from Meruoca (babaçu) and 15 females and 15 males from Sobral (carnaúba). As per the methodology of Dujardin et al. (1998), six head measurements were taken from each specimen using an image analyzer system (KONTRON KS300): width of anteclypeus (AC), length of antenniferous tubercle (AT), antecular distance (AO), external distance between ocelli (EO), external distance between eyes (OE), and post ocular distance excluding neck (PO) (Fig. 3).

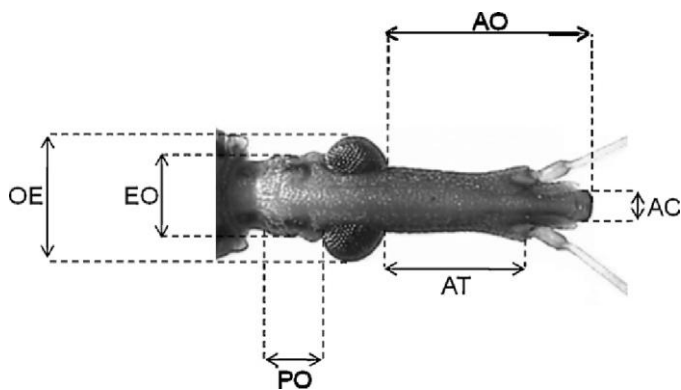


Fig. 3. Head of a *R. nasutus* indicating the measures used for the morphometric analysis. AC: width of anteclypeus; AT: length of antennal tubercle; AO: anteocular distance; EO: external distance between ocelli; OE: external distance between eyes; PO: postocular distance excluding neck.

The measurements were made using the KS/300 computerized image analysis system, with a Carl Zeiss KONTRON Electronic GMBH model at a magnification of 20x. Observations were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov Test and were also used for multivariate analysis (discriminant analysis). Homogeneity of variances (homoscedasticity) was tested using the Levene Statistic. Wilks' Lambda was performed to test the null hypothesis that the groups have the same mean discriminant function scores and to conclude that the model is discriminating (Wilks, 1932). Pairwise group comparisons were done using Mahalanobis distances. All calculations for multivariate analysis were made using the software package SPSS 16.0. The Kolmogorov–Smirnov Test was done using the software package StatView 5.0.1.

2.4. Molecular analysis – microsatellites

The genomic DNA of *R. nasutus* was extracted from one leg of a first generation adult insect, obtained in the laboratory. For the extraction, a simplified protocol with STE solution (0.1 M NaCl; 10 mM Tris/HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0) was used according to the technique standardized by Balbino et al. (2006).

We used 12 females and 12 males from each group (babaçu and carnaúba) and tested 10 loci designed for *R. prolixus* (Harry et al., 2008), six of which are genotyped (R4, R8, R17, R26, R30 and R31). The “forward” primer of each pair marked the 5' extremity with fluorescein.

The PCR amplifications were performed in a Mastercycler Gradient™ (Eppendorf, Germany) thermo-cycler in a total volume of 15 mL, containing 1 mL of 10x Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 0.4 or 0.6 mL of 50 mM MgCl₂, 20 mM of each dNTP, 10 mM of each primer, 2 mL of genomic DNA and 0.5 U Taq DNA Polymerase (Invitrogen). The PCR cycle consisted of an initial

denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 30 s; 52 °C for 30 s and 72 °C for 30 s and final extension at 72 °C for 5 min.

The amplified products were visualized in a polyacrylamide gel at 8% in a mini-gel system (BIO-RAD), stained with 0.2% silver nitrate. Then, the PCR products were diluted at 1:10 in Milli-Q water and genotyped in a MEGABace (Amersham Biosciences) sequencer. The size of the PCR products was estimated in comparison with a standard size marker (ET-400, GE Health Care) and the genotypes were read using the software Fragment Profiler™. The genetic variability between populations and among individuals was calculated by AMOVA test and using R_{st} index like the method of distances. This procedure was carried out using the software Arlequin 3.1.

3. Results

3.1. Index of infestation and population density

Twenty-six palm trees were dissected, 17 carnaúbas (*A. speciosa*) and nine babaçus (*C. prunifera*). All palm trees were adult specimens, with an average size of 9.6 m for babaçu and 7.8 m for carnaúba. The global infestation index was of 76.9%. In total, 12 carnaúbas and eight babaçus were infested by *R. nasutus*, with a global infestation index of 70.6% and 88.9%, respectively. All of the 87 collected Triatominae were identified as *R. nasutus* according to the Lent and Wygodzinsky (1979) identification keys and compared with the reference specimens from the Laboratório de Triatomíneos e Doença de Chagas (Cento de Pesquisa René Rachou – FIOCRUZ). The population structure of the insects captured in carnaúbas was significantly different between the dry and rainy seasons (p = 0.00028), with total predominance of immature forms (nymphs) in the dry season. However, the same seasonal variation did not occur within the Triatominae collected in the babaçu palm trees (p = 0.60). No difference was observed in the infestation rate between the dry and rainy seasons (p = 0.4025) or among the infestation of babaçu and carnaúba palm trees (p = 0.3798). The infestation and population density data are shown in Table 1.

3.2. Microclimatic data

The highest temperatures were registered in November, in Sobral, both on the carnaúba and on the reference sensors. The highest relative humidity was observed in babaçu in Meruoca, both in July and in November. These results indicate that the carnaúba has a warmer and drier environment, whereas in the babaçu it is more humid (Figs. 4 and 5).

Figs. 4 and 5 present box plots for temperature and relative humidity of the palm trees. As seen in these figures, the babaçu presents lower amplitudes of temperature and relative humidity variations than the carnaúba. Furthermore, the babaçu presented lower mean temperature values than the carnaúba, as well as a higher relative humidity (Figs. 4 and 5).

Table 1
Number of infested palms and *R. nasutus* captured in the carnaúbas from Sobral (Caatinga) and the babaçus from Meruoca (forest reminiscent), Ceará, 2003.

	Carnaúba palm				Babaçu palm			
	Searched/infested	Collected triatomines			Searched/infested	Collected triatomines		
		N	Ad	Total		N	Ad	Total
Rainy period (July)	9/8 (88.9%)	14 (66.7%)	7 (33.7%)	21	4/3 (75%)	24 (92.3%)	2 (7.7%)	26
Dry period (November)	8/4 (50%)	28 (100%)	0	28	5/5 (100%)	10 (83.3%)	2 (16.7%)	12
Total	17/12 (70.6%)	42 (82.4%)	7 (17.6%)	49	9/8 (88.9%)	34 (89.5%)	4 (10.5%)	38

N: nymphs; Ad: adults.

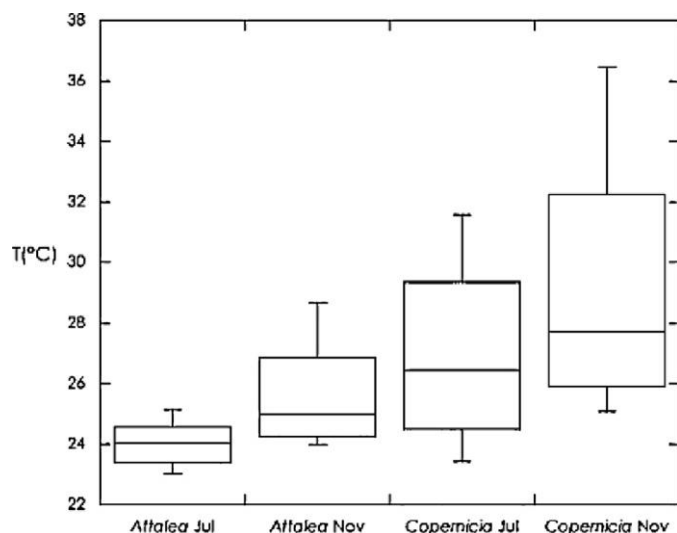


Fig. 4. Boxplot comparing the temperature variations in the axil leaf of the studied palm trees (*Attalea speciosa* – babaçu and *Copernicia prunifera* – carnaúba). There were significant differences in all of the mean values obtained from *A. speciosa* (dry and rainy season) and from *C. prunifera* in both dry and rainy season by paired sample t test (df = 95; $p = 0.000$).

When the 25% and 75% percentiles were analyzed, all values differed from the respective reference sensors of babaçu and carnaúba in the months of July and November ($p = 0.0000$). The comparisons of relative humidity, obtained by the paired t test, indicated significant differences between the external environment and the axils of the babaçu and carnaúba ($p \leq 0.0002$), the exception being for the babaçu in November ($p = 0.9270$) and the 75% percentile of the carnaúba in November ($p = 0.1603$).

Figs. 6 and 7 present graphs for temperature and relative humidity variations between the studied palm trees and the sensors of the external environment. As shown in these figures, the records of temperature and relative humidity differ between the palm trees and their respective reference sensors. However, the relative humidity in July demonstrated little variation between the external environment

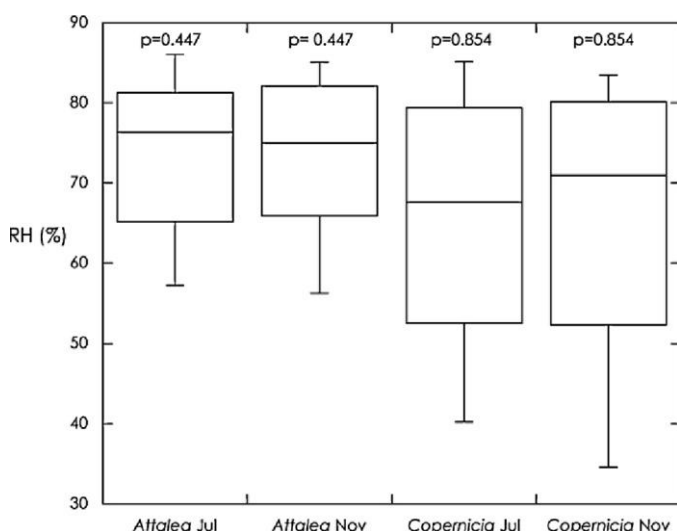


Fig. 5. Boxplot comparing the relative humidity variations in the axils of the studied palm trees (*Attalea speciosa* – babaçu and *Copernicia prunifera* – carnaúba). There were no significant differences in the mean value obtained from *A. speciosa* (dry and rainy season) and from *C. prunifera* (dry and rainy season) by paired sample t test (respectively $t = 0.764$; df = 95; $p = 0.447$ and $t = -0.184$; df = 95; $p = 0.854$).

and the axils of palm trees. Moreover, there appears to be a tendency for a higher variation at the extremes of temperature and relative humidity between the palm trees' axils, where *R. nasutus* are sheltered, and the external environment.

3.3. Morphometry

The homoscedasticity (Levene Statistic) and Wilks' Lambda tests showed that the model is discriminating (Table 2). Eigenvalues from the first 3 canonical discriminant functions used in the analysis showed that function 1 explained 88.582% of the variance (Table 3). Mahalanobis distances performed to compare the four populations showed that males from the babaçu and females from the carnaúba did not differ statistically considering the six head measures used in this study (Table 4, Fig. 8). The discriminant analysis also showed that when the *R. nasutus* populations were compared using males and females from each palm tree, Mahalanobis distances corroborate that the populations differed among each site (Table 5). Also, the specimens from each palm species (*A. speciosa* and *C. prunifera*) showed significant difference when comparing males and females together with pairwise group comparisons based on Mahalanobis distances (df = 1, 58; $p = 0.000$) – Table 5.

3.4. Microsatellites

Ten microsatellite primers designed for *R. prolixus* (Harry et al., 2008) were tested in *R. nasutus*, but the amplification of four out of the ten primers was poor in the preliminary PCR (data not shown). In the carnaúba population, the six microsatellites used presented 19 alleles while the babaçu population presented 15 alleles. The loci used were polymorphic in the two populations tested, except for the R8 locus in the babaçu population and the R31 locus in the carnaúba population.

The babaçu population presented a mean of three alleles per locus (varying between two and four alleles) and the carnaúba population presented a mean of 3.6 alleles per locus (varying between two and six alleles) (Table 6). Moreover, we found 25 haplotypes for the carnaúba population and 17 for the babaçu population. Furthermore, five unique alleles in the babaçu population and six in the carnaúba population were observed. The R_{st} index showed great variability (0.7674) when comparing the two populations and among individuals within populations (0.1736). H_o ranged from 0 to 0.47619 and H_e from 0 to 0.73403. The Hardy–Weinberg equilibrium suggests a deficit of heterozygosity, indicating population subdivision or the presence of null alleles. Table 6 presents a global result of microsatellites analysis.

4. Discussion

Palm trees are considered the natural ecotope of triatomines of the *Rhodnius* genus, except for *R. domesticus* Neiva and Pinto, 1923 which is associated with bromeliads (Lent and Wygodzinsky, 1979). *R. nasutus* is an autochthonous Brazilian triatomine species, considered a vector of secondary importance in the transmission of human Chagas disease (Alencar, 1987). In recent years, *R. nasutus* has been the fourth most captured species of Triatominae in the state of Ceará, according to data from the Chagas Disease Control Program (PCDCh). Although data from PCDCh indicate that insects were not found inside houses, the presence of infected *R. nasutus* with *T. cruzi* in the peri-domicile has been constant, probably due to the proximity of the palm trees to the houses, causing these insects to be attracted at night by the houses' lights when seeking food (Sarquis et al., 2004; Lima et al., 2008).

Although Alencar (1987) has already reported the infestation of *R. nasutus* in the babaçu palm, most of the studies so far were performed

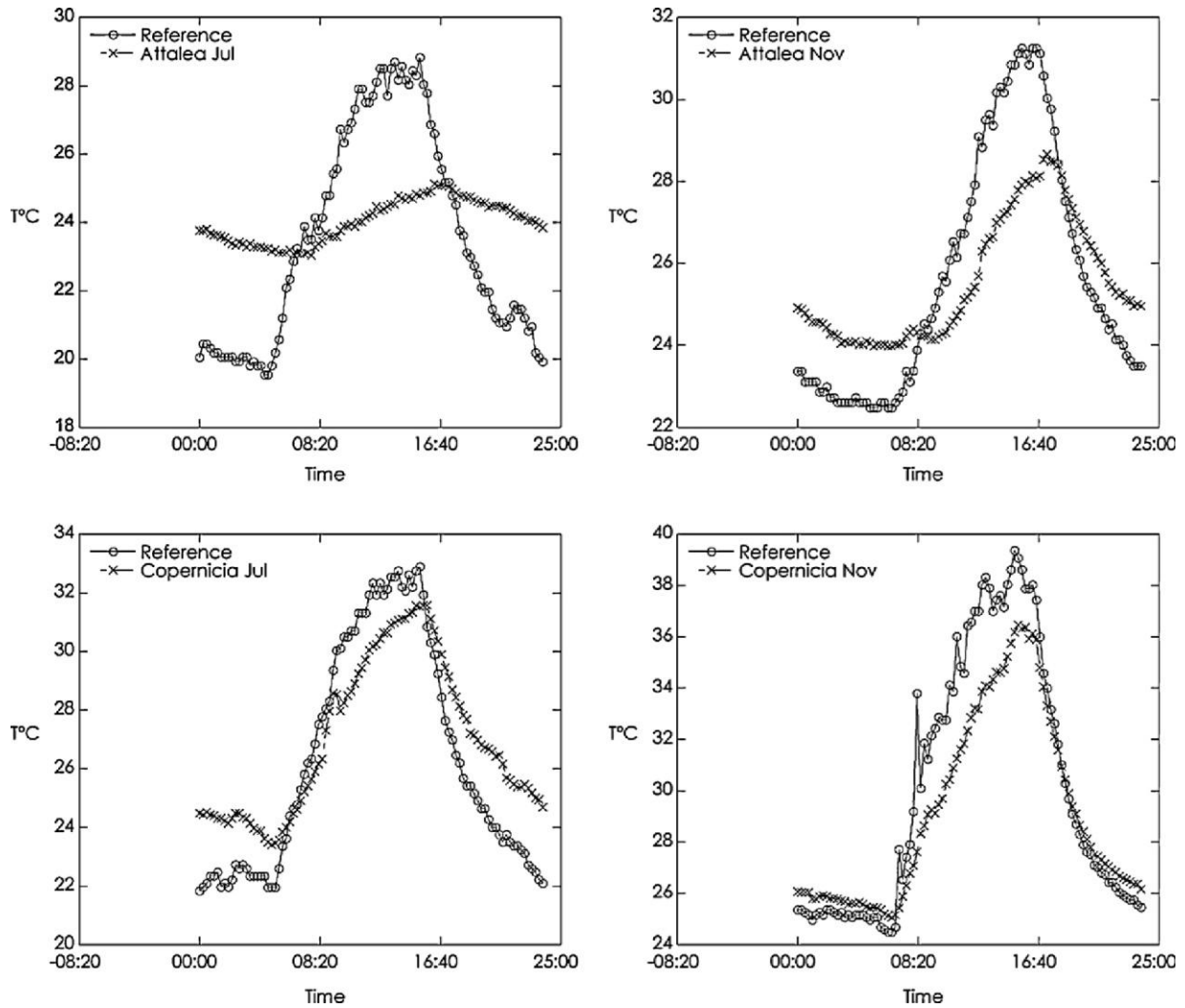


Fig. 6. Graphs of the mean temperature through time to compare records obtained for *Attalea speciosa* (babaçu) and *Copernicia prunifera* (carnaúba) with their respective reference sensors. Significant differences between the temperatures of the carnaúba and the reference sensors were observed in the months of July ($t = -3.8027$; $df = 95$; $p = 0.0003$) and November ($t = 5.0838$; $df = 95$; $p = 0.0000$).

collecting the Triatominae from the carnaúba palm trees, which is considered its natural ecotope. However, Dias et al. (2008) investigated the Chapada do Araripe region, in the south of Ceará State, and studied the ecology of this species. These results demonstrated that, besides the carnaúba, *R. nasutus* takes shelter in other palm tree species, and reported for the first time *R. nasutus* infestation in *Acrocomia*, *Syagrus* and *Mauritia* palm tree genera. Although the number of insects collected between the babaçu palm tree and the carnaúba was quite different (224 and 24, respectively), no difference was found in the infestation rate among the species of palm trees investigated. In this same study, Dias et al. (2008) used instantaneous data of temperature in the leaves' axils, at the moment of dissecting the palm trees, and the results regarding the micro-

climatic data demonstrated that the babaçu palm tree has a lower temperature variation, with a more stable micro-climate, whereas in the carnaúbas the thermal amplitude was clearly higher, corroborating the microclimatic results presented here.

The micro-climatic data presented in this study indicated that the carnaúba and babaçu palm trees have different characteristics in relation to the external environment. The variation of temperature in the babaçu crowns was greatly damped during the dry season, whereas during the humid season the temperature range was higher. These results indicate that the regulation of the carnaúba's relative humidity and temperature is lower when compared to the babaçus, probably due to its smaller crown and complexity at the base of the leaves. In the babaçus, the architecture of the crown seems to decrease the variation of the climatic parameters in the interior where

Table 2
Wilks' Lambda to test the null hypothesis that the groups have the same mean discriminant function scores. The analysis was discriminant ($p = 0.000$).

Test of function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1 through 3	0.215	82.997	18	0.000
2 through 3	0.746	15.818	10	0.105
3	0.908	5.229	4	0.265

Table 3
Eigenvalues from the first 3 canonical discriminant functions used in the analysis.

Function	Eigenvalue	% of variance	Cumulative %	Canonical correlation
1	2.470	88.582	88.582	0.844
2	0.217	7.771	96.353	0.422
3	0.102	3.647	100.000	0.304

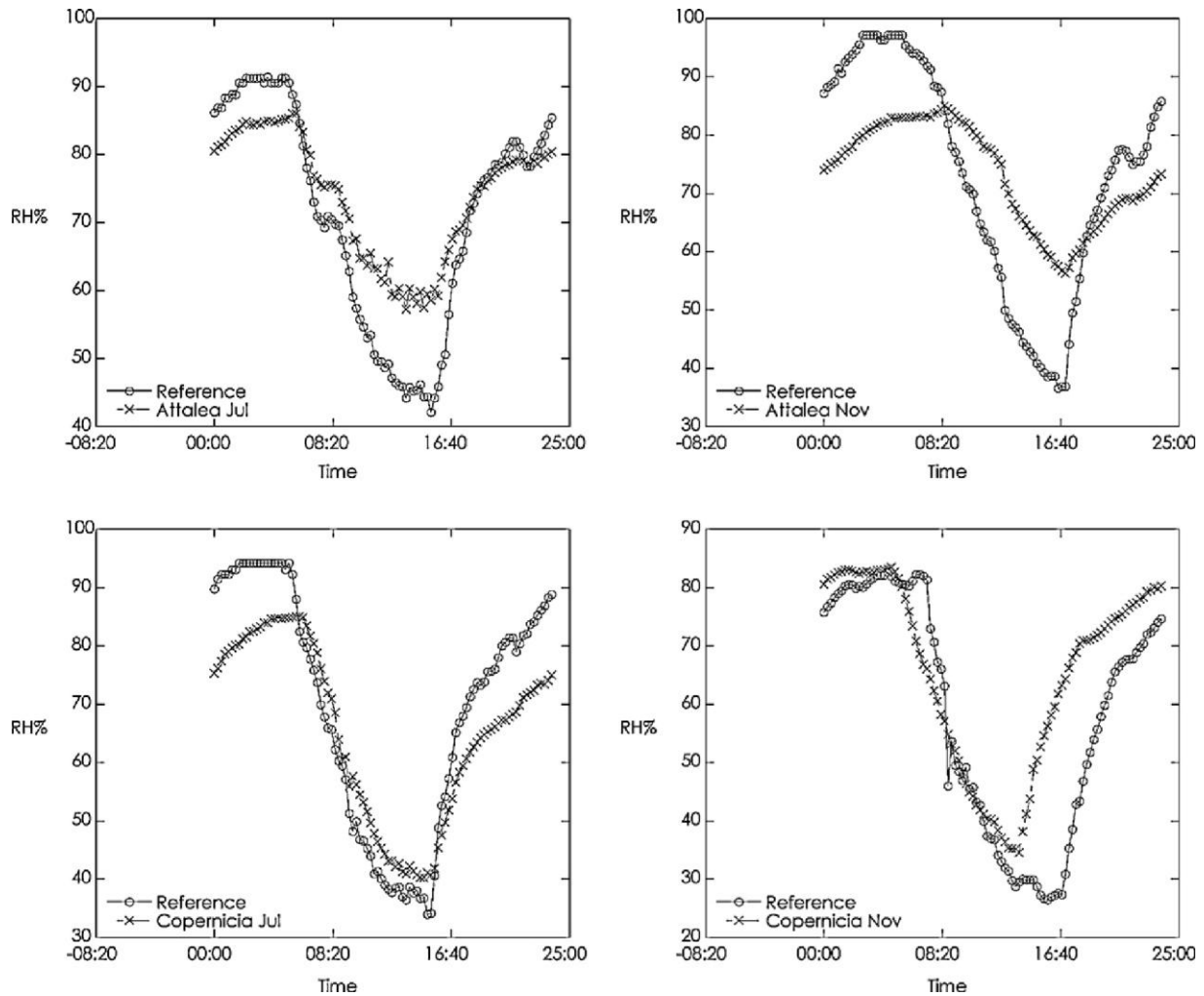


Fig. 7. Graphs of the mean relative humidity variation through time to compare records obtained for *Attalea speciosa* (babaçu) and *Copernicia pruniifera* (carnaúba), with their respective reference sensors. The comparisons of relative humidity, obtained by the paired t test, indicated significant differences between the external environment and the axils of the babaçu and carnaúba ($p \leq 0.0002$), except for the babaçu in November ($p = 0.9270$).

R. nasutus are sheltered, offering micro-environments with moderate relative humidity and temperature means, within highly stable variation margins for this triatomines.

Some studies indicate that the palm trees of the genus *Attalea* are the main ecotope for the species of the genus *Rhodnius*. For example, in southern Ceará State, Dias et al. (2008) point to the babaçu palm tree as a main ecotope for *R. nasutus*.

Table 4
Pairwise group comparisons based on Mahalanobis distances ($df = 1, 56$). Populations 2 (males from the babaçu) and 3 (females from the carnaúba) did not differ statistically (p value = 0.972).

Population		1	2	3	4
1	F				
	Sig.				
2	F	38.226			
	Sig.	0.000			
3	F	38.660	0.001		
	Sig.	0.000	0.972		
4	F	85.357	9.340	9.127	
	Sig.	0.000	0.003	0.004	

Population: 1 = females from the babaçu; 2 = males from the babaçu; 3 = females from the carnaúba; 4 = males from the carnaúba.

Attalea palm trees have relatively closed crowns, permitting a great diversity of vertebrates that serve as food sources for the triatomines and maintain the *T. cruzi* cycle in the sylvatic environment.

In the babaçus, the presence of possible feeding sources was observed during insect capture expeditions, including rodents, birds and lizards. This, however, was not observed with the carnaúbas. Babaçu palm trees have many leaves with large foliar sheaths that overlap the stem and form a great crown. The carnaúbas, on the other hand, have a relatively small crown with frond insertion-patterns that allow solar radiation to penetrate the crown, corresponding to less stable shelters for insects. The architecture of the palm trees' crowns is a crucial factor for the shelter of triatomines, as well as for the maintenance and microclimatic stability (Dias et al., 2008). In fact, the architecture of the babaçu palm tree crown, that is the way the leaves' sheaths are inserted into the stem, is related to the number of feeding sources for the triatomines, including large animals like *Tamandua tetradactyla* (Dias et al., 2010), as well as the density and biological diversity of *R. nasutus*.

When evaluating the size of the insects (F1 generation) from the babaçus and carnaúbas, the morphometric results demonstrated a clear sexual dimorphism in both populations, being that *R. nasutus*

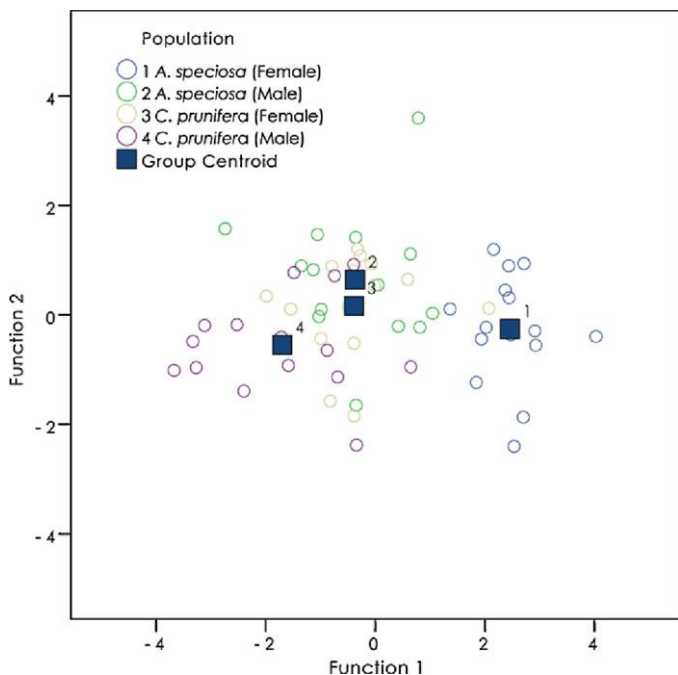


Fig. 8. Group centroid derived from morphometric analysis demonstrating that populations 2 (males from the babaçu) and 3 (females from the carnaúba) did not differ.

Table 5
Pairwise group comparisons based on Mahalanobis distances (df = 1, 58). Populations from the babaçu and carnaúba differ statistically (p = 0.000). Population 1 indicates females + males from the babaçu, and population 2 indicates females + males from the carnaúba.

Population		1	2
1	F		24.132
	Sig.		0.000
2	F	24.132	
	Sig.	0.000	

derived from the babaçus are larger than those from the carnaúbas. Lent and Wygodzinsky (1979) revised Triatominae systematics, showing that the females of this subfamily are normally larger than the males, despite the fact that some Triatominae species present larger males than females. Laboratory studies developed by these researchers demonstrated that the quantity of food available for nymphs influences the size of adults. In laboratory colonies the individuals tend to become

Table 6
Characteristics of six microsatellite marker loci in *R. nasutus*.

Locus	Num. alleles	Babaçu palm		Carnaúba palm	
		H _o	H _e	H _o	H _e
R4	4	0.30435	0.34106	0.166667	0.15603
R8		Monomorphic locus		0.00000	0.00000
R17	3	0.26087	0.23671	0.41176	0.45098
R26	3	0.00000	0.50709	0.47619	0.73403
R30	2	0.00000	0.29433	0.00000	0.00000
R31	3	0.00000	0.08156	Monomorphic locus	
Mean	3	0.11304	0.29215	0.21092	0.33133
S.D.	0.707	0.15555	0.15493	1.817	0.22452

H_o = observed heterozygosity; H_e = expected heterozygosity.

Hardy–Weinberg test equilibrium showed significant heterozygosity deficits (p < 0.05).

progressively smaller, even if there is abundant food for the nymphs. These researchers, however, did not theorize the underlying cause for this phenomenon.

Adult individuals grown in high temperatures had smaller bodies and wings (Nijhout, 2003). Such reduction in size was associated to the decrease in the cells' size, as there were no variations in the number of cells that justified the reduction in size. Empirical evidences indicate that the environment can affect the body size of insects when grown in high temperatures or under reduced nutritional quality (Nijhout, 2003).

The founder colony was obtained from fertilized females collected in the field, inside the leaves of the palm trees, or fertilized by males filed in the laboratory. The colony was reared under the same environmental condition and food source. The average temperature was 24–26 °C and the mean humidity 70%. It can be possible that the body sizes of the reared insects are genetically related because the rearing specimens showed differences in the mean body size when comparing specimens from *A. speciosa* and *C. prunifera*. Nijhout (2003) showed that the body size reduction of field insects could be spread to their offspring.

Our study showed this possible adaptation in the field, which means that *R. nasutus* is able to colonize houses from the palm tree where it lives, migrating from peri-domiciliary palm trees. This finding represents an important contribution to our understanding of the potential colonization of *R. nasutus* in the Caatinga biome.

Data obtained from microsatellite analysis demonstrate high population structuring between the babaçu and carnaúba groups. The R_{st} index was 0.77 and according to Wright (1978), this value represents high genetic divergence, probably related to geographic isolation. Observed heterozygosity was higher in the carnaúba population when compared with the babaçu population. Even though the number of trees sampled has been different (8 for babaçu and 12 for carnaúba), it cannot explain the lower variability within population observed for the babaçu population, since the number of adults collected in this palm tree was higher, and females might have been collected already fertilized. This result may be a consequence of the different architecture characteristics of each palm, which appear to make the carnaúba a less hospitable environment for the triatomines while the babaçus offer a more stable environment, with several possible feeding resources associated with triatomines.

Our results demonstrate that the babaçu and carnaúba's populations present high genetic isolation. Moreover the presence of animals co-inhabiting the palm trees with Triatominae, associated to the microclimatic data, could be fundamental factors for the size variation found in these insects.

Financial support

This work was funded by FAPEMIG, CNPq and CPqRR-FIOCRUZ.

Conflict of interest

No conflict of interest related to this article for all authors.

Ethical statement

This study strictly followed the ethical codes of Brazil. The sampling was carried out in full compliance with the Brazilian laws (IBAMA authorization no: 007/2003-COMAF).

Acknowledgments

To the Secretaria de Estado da Saúde do Ceará for helping us to collect the insects. We thank Jordan Sky Oestreicher and Dra. Maria Victoria Periago for revising the paper.

References

- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., Jaramillo, N., Gurgel-Gonçalves, R., Dias, F.B.S., Diotaiuti, L., 2009. Ecology, evolution and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop.* 110, 159–177.
- Alencar, J.E., 1987. História Natural da Doença de Chagas no Ceará. Imprensa Universitária. Universidade Federal do Ceará, Brasil.
- Balbino, V.Q., Coutinho-Abreu, I.V., Sonoda, I.V., Melo, M.A., Andrade, P.P., De Castro, J.A.F., Rebêlo, J.M., Carvalho, S.M.S., Ramalho-Ortigão, M., 2006. Genetic structure of natural populations of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian northeastern region. *Acta Trop.* 98, 15–24.
- Behling, H.A.R.Z.H.W., Pa'izold, J., Wefer, G., 2000. Late quaternary vegetational and climate dynamics in northeastern Brazil, inferences from marine core GeoB 3104-1. *Quaternary Sci. Rev.* 19, 981–994.
- Carcavallo, R.U., Curto De Casas, S.I., Sherlock, I.A., Galíndez Girón, I., Jurberg, J., Galvão, C., Mena Segura, C.A., Noireau, F., 1998. Distribuição geográfica e dispersão altitudinal. In: Cacavallo, R.U., Galíndez Girón, I., Jurberg, J., Lent org, H. (Eds.), Atlas of Chagas' disease vector in the Americas Fiocruz – Rio de Janeiro, vol. III. pp. 747–792.
- Dias, F.B.S., Bezerra, C.M., Machado, E.M.M., Casanova, C., Diotaiuti, L., 2008. Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 824–830.
- Dias, F.B.S., Diotaiuti, L., Romanha, A.J., Bezerra, C.M., Machado, E.M.M., 2007. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 643–645.
- Dias, F.B.S., Quartier, M., Romaña, C.A., Diotaiuti, L., Harry, M., 2010. *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon. *Infect. Genet. Evol.* 10, 1278–1281.
- Diotaiuti, L., Dias, J.C.P., 1984. Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 79, 293–301.
- Dujardin, J.P., Schofield, C.J., Tibayrenc, M., 1998. Population structure of *Triatominae infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Med. Vet. Entomol.* 12, 20–29.
- Harry, M., Roose, C.L., Vautrin, D., Noireau, F., Romaña, C.A., Solignac, M., 2008. Microsatellite markers from the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae), and their applicability to *Rhodnius* species. *Infect. Genet. Evol.* 8, 381–385.
- Lent, H., Wygodzinsky, P., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 163, 127–520 (New York).
- Lima, M.M., Coutinho, C.F.S., Gomes, T.F., Oliveira, T.G., Duarte, R., Borges-Pereira, J., Bóia, M.N., Sarquis, O., 2008. Risk presented by *Copernicia prunifera* palm trees in the *Rhodnius nasutus* distribution in a Chagas disease-endemic area of the Brazilian northeast. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 750–754.
- Lucena, D.T., Lima-Borba, H., 1977. *Panstrongylus megistus leucofasciatus* Lucena, 1959 e *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Triatominae) em Pernambuco, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 19, 332–334.
- Monteiro, S., Kaz, L., 1994. Caatinga – Sertão Sertanejos. Alumbamentos Livroarte, Rio de Janeiro, 255 pp.
- Nijhout, H.F., 2003. The control of body size in insects. *Dev. Biol.* 261, 1–9.
- Quinn, G.P., Keough, M.J., 2002. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press, Cambridge.
- Romaña, C.A., Pizarro, J.C., Rodas, E., Guilbert, E., 1999. Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93, 594–595.
- Sarquis, O., Borges-Pereira, J., Mac, Cord., Gomes, J.R., Cabello, T.F., Lima, P.H.M.M., 2004. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99, 263–270.
- Wilks, S.S., 1932. Certain generalizations in the analysis of variance. *Biometrics* 24, 471.
- Wright, S., 1978. Evolution and the Genetics of Populations, Variability Within and Among Natural Populations, vol. 4. University of Chicago Press, Chicago

8 Referências bibliográficas

- ABAD-FRANCH F, MONTEIRO FA, JARAMILLO ON, DIAS FBS, GURGEL-GONÇALVES R, DIOTAIUTI L. 2009. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Trop* 110: 159–177
- AGUILAR HM, ABAD-FRANCH F, DIAS JCP, JUNQUEIRA ACV, COURA JR. 2007. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. 1): 47-55.
- ALCAIDE M, RICO C, RUIZ S, SORIGUER R, MUÑOZ J, FIGUEROLA J. 2009. Disentangling Vector-Borne Transmission Networks: A Universal DNA Barcoding Method to Identify Vertebrate Hosts from Arthropod Bloodmeals. *PlosOne*, 4: 1-6.
- AMCHA. 2004. Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia. Manaus, Estado de Amazonas, Brasil, 19–22 setembro 2004, 17pp.
- ANDRADE JCR, SILVA EOR, SOUZA JMC. 1975. Comparação entre duas técnicas sorológicas aplicadas ao estudo do sangue ingerido por Triatomíneos. *Rev Saúde Publ.* 9: 539-545.
- ANDRADE SG. 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* 3: 65-121.
- ANDRADE SG, MAGALHÃES JB. 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 27-35.
- AÑEZ N, NIEVES E, CAZORLA D, 1987. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IX. Course of infection in different stages of *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 82, 1–6.
- ANONYMOUS. 1999. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 429-432.
- ARAÚJO A, JANSEN AM, REINHARD K, FERREIRA LF. 2009. Paleoparasitology of Chagas disease - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(Suppl. I): 9-16.

- BAILEY TC, GATRELL AC. 1995. Interactive spatial data analysis. Longman Group Limited, Essex, p. 413.
- BARRETO P, SOUZA-JÚNIOR C, ANDERSON A, SALOMÃO R, WILES J. 2005. Pressão Humana no Bioma Amazônia. Boletim Imazon – O estado da Amazônia. 3: 1-6.
- BARRETT TV & OLIVEIRA TS. 1977. A *Trypanosoma* indistinguishable from *Trypanosoma rangeli* in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 71: 445-446.
- BARRETT TV, HOFF RH, MOTT KE, MILES MA, GODFREY DG, TEIXEIRA R, ALMEIDA DE SOUZA JA, SHERLOCK IA. 1980. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 74: 84-90.
- BARRETT, T. 1988. Current research on Amazonian Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz, 83: 441-447.
- BARRETO MP. Epidemiologia. In: Brener, Z., Andrade, Z. editores. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. P. 90-151.
- BATISTA DC. Oswaldo Cruz na Amazônia. In: BATISTA DC. editor. Oswaldo Cruz, Carlos Chagas, Afranio Peixoto. Notas sobre o saneamento da Amazônia. Rio de Janeiro: Cia. Gráfica Lux; 1972. 205p.
- BERÇOT M. 2009. Uma questão de perspectiva: os enfoques especialista e local sobre o contexto de saúde e ambiente na região do médio Tajapós, Amazônia brasileira. MSC Tese, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 139p.
- BOSSENO MF, GARCÍA LS, BAUNAURE F, GASTELÚM EM, GUTIERREZ MS, KASTEN FL. 2006. Short Report: Identification in Triatomine vectors of feeding sources and *Trypanosoma cruzi* variants by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg, 74: 303–305.
- BOTERO LA, MEJÍA AM, TRIANA O. 2007. Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. Biomédica, 27 (Suppl. I): 64-74.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2006. Surto de Doença de Chagas Agudo (DCA) em Santarém/Pará - junho de 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=24541. Acesso em 06 de janeiro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=26087. Acesso em 11 de junho de 2007.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. PROJETO PRODES - MONITORAMENTO DA FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA POR SATÉLITE. Disponível em: <http://www.obt.inpe.br/prodes/index.html>. Acesso em 4 de janeiro de 2011.

BRISSE S, BARNABÉ C, TIBAYRENC M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 30: 35-44.

BRISSE S, VERHOEFA J, TIBAYRENC M. 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasit*, 31: 1218-1226.

CÂMARA G, SOUZA RCM, FREITAS UM, GARRIDO J. 1996. SPRING: Integrating remote sensing and GIS by object-oriented data modelling. *Comput Graph* 20: 395-403.

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

CAMARGO ME, SILVA GR, CASTILHO EA, SILVEIRA AC. 1984. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 26: 192-204.

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE CIENTIFIQUE. 1998. Les risques sanitaires et leurs enjeux dans les démocraties pluralistes: perception, evaluation et gestion. *Quelles Recherches Développer?* Paris: CNRS, 48p.

- CHAGAS C. 1924. Infection naturelle des singes du Pará (*Crysotrix sciureus*) par *Trypanosoma cruzi*. C R Soc Biol (Paris), 90: 873
- CLARK CG, PUNG OJ. 1994. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. Mol Biochem Parasitol 66: 175-179.
- CLAYTON J. 2010. Chagas disease 101. Outlook Chagas Disease, Nature, S4-S5.
- COSTA N. 1999. ONGs declaram guerra à soja na Amazônia. Disponível em: www.alerta.inf.br. Acesso em 04 de junho de 2007.
- COURA JR, BARRETT TV, NARANJO MA. 1994. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão chagásica? Rev Soc Bras Med Trop 27: 251-253.
- COURA JR, ARBOLEDA-NARANJOS M, WILLCOX HPF. 1995. Chagas' disease in the Brazilian Amazon. II. A serological survey. (1). Rev Inst Med Trop São Paulo, 37: 103-107.
- COURA JR, FERNANDES O, CARRARA N, ARBOLETA MN, BARRETT TV, DEGRAVE W. 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 90: 278-279.
- COURA JR, JUNQUEIRA ACV, BOIA MN, FERNANDES O. 1999. Chagas disease: from bush to huts an houses. Is it the case of the Brazilian Amazon?. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94: 379-384.
- COURA JR, JUNQUEIRA AC, FERNANDES O, VALENTE SAS, MILES MA. 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasit, 18: 171-176.
- COURA JR. 2006. Transmissão da infecção chagásica por via oral na história natural da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop 39 (Supl. IV): 113-117.
- COURA JR & VIÑAS PA. 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature (Chagas Disease Outlook): S6-S7.
- D'ALESSANDRO A & SARAIVA NG. 1992. *Trypanosoma rangeli*. In Parasitic Protozoa, 2nd ed., Vol. 2, Academic Press, San Diego, p. 1-54.

DE SOUSA MA, DA SILVA FONSECA T, DOS SANTOS BN, DOS SANTOS PEREIRA SM, CARVALHAL C, HASSLOCHER MORENO AM. 2008. *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, in chronic Chagas' disease patients under ambulatory care at the Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC-Fiocruz, Brazil). *Parasitol Res*, 103:697-703.

DEANE LM. 1958. Novo hospedeiro de tripanosomas dos tipos *cruzi* e *rangeli* no Estado do Pará. O marsupial *Metachirops opossum opossum*. *Rev Bras Malar Doenças Trop* 10: 531-541.

DEVELOUX M, LESCURE FX, JAUREGUIBERRY S, JEANNEL D, ELGHOZZI MH, GAY F, PARIS L, LE LOUP G, DANIS M, PIALOUX G 2010. Emergence of Chagas' disease in Europe: description of the first cases observed in Latin American immigrants in mainland France. *Med Trop*, 70: 38-42.

DIAS JCP, 1987. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol Today*, 3: 336-341.

DIAS FBS, DIOTAIUTI L, ROMANHA AJ, BEZERRA CM, MACHADO EMM 2007. First report on the occurrence of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 643-645.

DIAS FBS, BEZERRA CM, MACHADO EMM, CASANOVA C, DIOTAIUTI L. 2008. Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103: 824-830.

DIAS FBS, QUARTIER M, ROMAÑA CA, DIOTAIUTI L, HARRY M. 2010. *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon. *Infect Genet Evol*, 10: 1278-1281.

DIAS FBS, DE PAULA AS, BELISÁRIO CJ, LORENZO MG, BEZERRA CM, HARRY M, DIOTAIUTI L. 2011. Influence of the palm tree species on the variability of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Infect Genet Evol*, 11: 869-877.

DIOTAIUTI L & DIAS JCP. 1984 Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 Em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 293-301.

DIOTAIUTI L, SILVEIRA AC, ELIAS M, STEINDEL M 1992. The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the state of Tocantins, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 87: 451.

DIOTAIUTI L, AZEREDO BVM, BUSEK SCU, FERNANDES AJ. 1998. Controle do *Triatoma Sordida* no Peridomicílio Rural do Município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. Rev Pan Salud Pública, 3: 21-25.

DIOTAIUTI, L, PEREIRA, MH, ESPÍNOLA, HN. Hemiptera. In: Neves DP, editor. Parasitologia Humana. 10ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000. P 292-306.

DIOTAIUTI L. Triatomíneos. In: Teixeira ARL, editor. Doença de Chagas e Evolução. Brasília: Ed. UnB; 2007. P 205-31.

DIOTAIUTI L, BEZERRA CM, FERRAZ ML, GOMES A. 2009. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* por espécies secundárias. Rev Soc Bras Med Trop, 42 (Suppl 2): 100-102.

EISENBERG JF, REDFORD KH. 1989. Mammals of the Neotropics, Vol. 3: The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. Chicago: University of Chicago Press, 609p.

FALLA A, HERRERA C, FAJARDO A, MONTILLA M, VALLEJO GA, GUHL F. 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop 110: 15-21.

FERNANDES O, SOUTO RP, CASTRO JA, PEREIRA JB, FERNANDES NC, JUNQUEIRA AC, NAIFF RD, BARRETT TV, DEGRAVE W, ZINGALES B, CAMPBELL DA & COURA JR. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58:807-811

FERNANDES A, IÑIGUEZ AM, LIMA VS, MENDONÇA DE SOUZA SMF, FERREIRA LF, VICENTE ACP, JANSEN AM. 2008. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu

Valley, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 103: 514-516

FERREIRA, ILM & SILVA, TPT. 2006. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. Rev Soc Bras Med Trop, 39: 507-509.

FILARD LS & BRENER Z, 1975. Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. J Protozool, 22: 398-401.

FIÚSA-LIMA JT & SILVEIRA AC. 1984. Controle da transmissão e inquérito sorológico nacional. In: Cançado JR, Chuster M (orgs) Cardiopatia Chagásica. Belo Horizonte, Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte, 371-380.

FREITAS JM, AUGUSTO-PINTO L, PIMENTA JR, BASTOS-RODRIGUES L, GONÇALVES VF, TEIXEIRA SM, CHIARI E, JUNQUEIRA AC, FERNANDES O, MACEDO AM, MACHADO CR, PENA SD 2006. Ancestral genomes, sex and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog 2: e24.

FRÍAS-LASSERRE D. 2010. New species and karyotype variation in the bordering distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardoi* Frías *et al* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Chile and its parapatric model of speciation. Neotrop Entomol, 39: 572-583.

GALVÃO AF, FAVRE TC, GUIMARÃES RJPS, PEREIRA APB, ZANI LC, FELIPE KT, DOMINGUES ALC, CARVALHO MS, BARBOSA CS, PIERI OS. 2010. Spatial distribution of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy with two praziquantel doses in a community of Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 105: 555-562.

GALVÃO C, CARCAVALLO R, ROCHA DS & JURBERG J, 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa, 202:1-36.

GALVÃO C & SCHOFIELD CJ. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Tropica, 110: 88-100.

GAUNT MW, YEO M, FRAME IA, STOTHARD JR, CARRASCO HJ, TAYLOR MC, MENA SS, VEAZEY P, MILES GAJ, ACOSTAK N, ARIASK AR, MILES MA, 2003.

Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, 421: 936-939.

GOMES LAM, DUARTE R, LIMA DC, DINIZ BS, SERRÃO ML, LABARTHE N. 2001. Comparison between Precipitin and ELISA Tests in the Bloodmeal Detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) Mosquitoes Experimentally Fed on Feline, Canine and Human Hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 693-695.

GORLA D, PORCASI X, CATALÁ SS. 2005. Sistemas de Información Geográfica y Sensores Remotos como Herramientas en los Programas de Control Vectorial de la Enfermedad de Chagas. *In: VI Reunión de la Iniciativa Andina para el Control de la Enfermedad de Chagas*. Bogotá, Colombia. 259-270p.

GUHL F, MARINKELLE CJ. 1982. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in mice infected with *T. rangeli*. *Ann Trop Med Parasitol* 76: 361.

GUHL F, HUDSON L, MARINKELLE CJ, JARAMILLO CA, BRIDGE D. 1987. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 94: 475-484.

GUHL F, JARAMILLO C, YOCKTENG R, VALLEJO GA, CÁRDENAS-ARROYO F. 1997. *Trypanosoma cruzi* in human mummies. *The Lancet* 149 (9062): 1370.

GUHL F, JARAMILLO C, VALLEJO GA, YOCKTENG R, CÁRDENAS-ARROYO F, FORNACIARI G, ARRIAZA B, AUFDERHEIDE AC. 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-years-old Mummified Human Tissue from Northern Chile. *Am J Phys Antrop*, 108: 401-407.

GUHL F & SCHOFIELD CJ 2002. Proceedings ECLAT – AMCHA International Workshop on Chagas Disease Surveillance in the Amazon Region. Reserva Natural Palmarí, Rio Javari, Brasil, 160p.

GUHL F, VALLEJO GA. 2003. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 - An Updated Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 435-442.

GUIMARÃES RJPS. 2010. Ferramentas de geoprocessamento para o estudo e controle da esquistossomose no estado de Minas Gerais. [Tese de doutorado]. Belo Horizonte: Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte,

226p.

GUIMARÃES RJPS, FREITAS CC, DUTRA LV, SCHOLTE RGC, MARTINS FT, FONSECA FR, AMARAL RS, DRUMMOND SC, FELGUEIRAS CA, OLIVEIRA GC, CARVALHO OS 2010. A geoprocessing approach for schistosomiasis studying and control in the State of Minas Gerais - Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 105 (Suppl. IV): 524-531.

GURGEL-GONÇALVES R, RAMALHO ED, DUARTE MAB, PALMA ART, ABAD-FRANCH F, Carranza JC, Cuba CAC. 2004. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in Federal District of Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo, 46: 323-330.

HALL TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

HENDERSON A, GALEANO G, BERNAL R, 1995. Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press: Princeton. 352 p.

HERRERA L, D'ANDREA PS, XAVIER SCC, MANGIA RH, FERNANDES O, JANSEN AM. 2005. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park 'Serra da Capivara' and its surroundings (PiauÍ, Brazil), an area endemic for Chagas disease. Trans Royal Soc Trop Med Hyg, 99: 379-388.

HERRERA C, BARGUES MD, FAJARDO A, MONTILLA M, TRIANA O, VALLEJO GA, GUHL F 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. Infect Genet Evol 7: 535-539

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. 2006. Sistema de Processamento de Informações Georeferenciadas: Spring. São José dos Campos: INPE/DPI. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/spring/>. Acesso em 15 janeiro de 2011.

KOCHER TD, THOMAS WK, MEYER A, EDWARDS SV, PAABO S, VILLABLANCA FX, WILSON AC, 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc Natl Acad Sci U S A, 86: 6196-6200.

LEMESHOW S, HOSMER JR. DW, KLAR J, LWANGA SK 1990. Adequacy of

- sample size in health studies. New York, NY: John Wiley & Sons; 21–23
- LENT H & WYGODZINSKY P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bull Amer Mus Nat Hist., vol 163. New York.
- LLEWELLYN MS & MILES MA. 2010. Who, how, what and where? Nature Outlook Chagas Disease, 465: S8–S9.
- LEWIS MD, MA J, YEO M, CARRASCO HJ, LLEWELLYN MS, MILES MA, 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. Am J Trop Med Hyg, 81: 1041–1049.
- LIMA MM, COUTINHO CFS, GOMES TF, OLIVEIRA TG, DUARTE R, BORGES-PEREIRA J, BÓIA MN, SARQUIS O. 2008. Risk Presented by *Copernicia prunifera* Palm Trees in the *Rhodnius nasutus* Distribution in a Chagas Disease-endemic Area of the Brazilian Northeast. Am J Trop Med Hyg, 79: 750–754.
- LORENZI H, SOUZA HM, MEDEIROS-COSTA JT, CERQUEIRA LSC, BEHRN, 1996. Palmeiras no Brasil nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, 303p.
- LORENZI H, SOUZA HM, CERQUEIRA LSC, COSTA JTM, FERREIRA E, 2004. Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, 416p.
- LOROSA ES, ANDRADE RE, PEREIRA CA, SANTOS SM, JUBERG J. 1999. Estudo das fontes alimentares do *Triatoma sordida* (Stål, 1859) do Estado de Mato Grosso do Sul através da comparação das técnicas de precipitina e imunodifusão. Entomol Vect; 6: 156-165.
- LOROSA ES, NUNES IM, VINHAES MC, ANDRADE RE, JUBERG J. 2000. Preferência alimentar de algumas espécies de triatomíneos capturados no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com auxílio da técnica de precipitina e grau de infectividade. Entomol Vect, 7: 211-225.
- LUCENA DT & VERGETTI JG. 1973. Infecção natural de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) por *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), no interior do Estado de Alagoas. Rev Inst Med Trop São Paulo. 15: 171-178.

- MALMQVIST B, STRASEVICIUS D, HELLGREN O, ADLER PH, BENSCH S. 2003. Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Proc R Soc Lond B (Suppl.)* 271, 152–155.
- MATTA A. 1922. Sobre o genero *Rhodnius* no Amazonas. *Amazonas Medico*, 4: 161-162.
- MILES MA, TOYÉ PJ, OSWALD SC, GODFREY DG 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 217-225
- MILES MA, SOUZA A, PÓVOA M, SHAW JJ, LAINSON R, TOYÉ PJ 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature* 272: 819-821.
- MILES MA, POVOA M, DE SOUZA AA, LAINSON R, SHAW JJ, KETTERIDGE DS 1981. Chagas disease in the Amazon Basin. II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in Pará State, north Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 667-674.
- MILES MA, APT BW, WIDMER G, POVOA MM, SCHOFIELD CJ. 1984. Isoenzyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 526-535
- MINOLI SA & LAZZARI CR. 2006. Take-off and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. *Acta Trop*, 97: 324-330.
- MONTEIRO FA, BARRETT TV, FITZPATRICK S, CORDON-ROSALES C, FELICIANGELI D, BEARD CB, 2003. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology*, 12: 997-1006.
- MORALES L, ROMERO I, DIEZ H, PORTILLO PD, MONTILLA M, NICHOLLS S, PUERTA C, 2002. Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Exp Parasitol*, 102: 72–80.

MOREL C, CHIARI E, CAMARGO EA, MATTEI DM, ROMANHA AJ, SIMPSON L 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease. Proc Natl Acad Sci USA 77: 6810-6814.

NÓBREGA AA, GARCIA MH, TATTO E, OBARA MT, COSTA E, SOBEL J, ARAUJO WN. 2009. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açai Palm Fruit, Brazil. Emerging Infec Disease, 15: 653-655.

NOIREAU F & DUJARDIN JP. 2001. Flight and Nutritional Status of Sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 96: 385-389.

PAVIA PX, VALLEJO GA, MONTILLA M, NICHOLLS RS, PUERTA CJ, 2007. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone h2a/sire and the sno-rna-cl1 genes. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 49: 23-30.

PEREIRA KS, SCHMIDT FL, GUARALDO AM, FRANCO RM, DIAS VL, PASSOS LA. 2009. Chagas' disease as a foodborne illness. J Food Prot. 72:441-446.

PEREIRA MH, GONTIJO NF, GUARNERI AA, SANT'ANNA MRV, DIOTAIUTI L. 2006. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. Trends Parasitol, 22: 516-520.

PIRES HHR, BORGES EC, ANDRADE RE, LOROSA ES, DIOTAIUTI L. 1999. Peridomiciliary infestation with *Triatoma sordida* Stål, 1859 in the Serra do Ramalho, Bahia Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94: 47-149.

RAMIREZ LE, LAGES-SILVA E, ALVARENGA-FRANCO F, MATOS A, VARGAS N, FERNANDES O, ZINGALES B 2002. Abstract high prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. Acta Trop 84: 189-198.

RASSI-JÚNIOR A, RASSI A, MARIN-NETO JA. 2010. Chagas disease. Lancet, 375: 1388-1402.

ROMAÑA CA, PIZARRO JC, RODAS E, GUILBERT E. 1999. Palm trees as ecological indicators of risk areas for Chagas disease. Trans Royal Soc Trop Med Hyg. 93: 594-595.

ROMAÑA C. O controle da tripanossomíase americana requer vigilância ecológica e social da emergência de risco. In: Teixeira ARL, editor. Doença de Chagas e Evolução. Brasília: Ed. UnB; 2007. P. 233-51.

ROMANHA AJ, DA SILVA PEREIRA AA, CHIARI E, KILGOUR V 1979. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. Comp Biochem Physiol 62B: 139-142.

ROMANHA AJ, 1982. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. DCS Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 110p.

SANDOVAL CM, JOYA MI, GUTIERREZ R, ANGULO VM, 2000a. Cleptohaematophagy of the triatomine bug *Belminus herreri*. Med Vet Entomology, 14: 100-101.

SANDOVAL CM, GUTIÉRREZ SL, AMAYA M, ESTEBAN L, ARIZA H, ANGULO VM. 2000b. High density of *Rhodnius prolixus* in a rural house in Colombia. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 94: 372-373.

SANDOVAL-RUIZ CA, ZUMAQUERO-RIOS JL, ROJAS-SOTO OR. 2008. Predicting Geographic and Ecological Distributions of Triatomine Species in the Southern Mexican State of Puebla Using Ecological Niche Modeling. J Med Entomol, 45: 540-546.

SANT'ANNA MRV, JONES NG, HINDLEY JA, MENDES-SOUSA AF, DILLON RJ, CAVALCANTE RR, ALEXANDER B, BATES PA. 2008. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. Acta Trop, 107: 230-237.

SANTOS SM, BARCELLOS C, CARVALHO MS, FLÔRES R. 2001. Detecção de aglomerados espaciais de óbitos por causas violentas em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 1996. Cad Saúde Pública 17: 1141-1151.

SARQUIS O, SPOSINA R, OLIVEIRA TG, MAC CORD JR, CABELLO PH, PEREIRA JB, LIMA MM. 2006. Aspects of peridomestic ecotopes in rural areas of Northeastern Brazil associated to triatomines (Hemiptera, Reduviidae) infestation, vectors of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 143-147.

SCHOFIELD CJ, LEHANE MJ, McEWAN P, CATALÁ SS, GORLA DE. 1991.

- Dispersive flight by *Triatoma sordida*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85: 676-678.
- SCHOFIELD CJ, 1994. *Triatominae: Biología y Control*. Eurocommunica Publications: United Kingdom, 80p.
- SCHWEICKARDT JC & TRINDADE-LIMA N. 2007. Brazilian scientists visit the Amazon: The scientific journeys of Oswaldo Cruz and Carlos Chagas (1910-13). *Hist Cienc Saude Manguinhos*, 14 (Suppl):15-50
- SCHOTELIUS, J. 1987. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Trop Med Parasit*, 38: 323-327.
- SHAW J, LAINSON R, FRAIHA H. 1969. Considerações sôbre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev Saude Publica*, 3: 153-157.
- SOUTO R, FERNANDES O, MACEDO A, CAMPBELL D, ZINGALES B, 1996. DNA markers define two major phylogenetics lineageages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 83: 141-152.
- STEINDEL M, CARVALHO PINTO JC, TOMA HK, MANGIA HR, RIBEIRO-RODRIGUES R, ROMANHA, AJ 1991. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echimyus dasythrix*) in Santa Catarina island, Santa Caratina state: first report of this trypanosome in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 73-79.
- TEIXEIRA ARL, MONTEIRO OS, REBELO JM, ARGANÑARAZ ER, VIEIRA D, LAURIA-PIRES L, ET AL. 2001. Emerging Chagas disease: Trophic Network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerg Infect Dis*, 7: 100-112.
- THIELEN EV, ALVES FAP, BENCHIMOL JL, ALBUQUERQUE MB, SANTOS RA, WELTMAN WL. 1991. A ciência a caminho da roça: imagens das expedições científicas do Instituto Oswaldo Cruz ao interior do Brasil entre 1911 e 1913. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz – Casa de Oswaldo Cruz, 154p.
- TIBAYRENC M, AYALA FJ 1991. Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 7: 228-232.

- TIBAYRENC M, NEUBAUER K, BARNABÉ C, GUERRINI F, SKARECKY D, AYALA FJ. 1993. Genetic characterisation of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1335-1339.
- TIBAYRENC M. 1995. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. In: JR Baker, R Mulle & D Rollinson (eds), *Advances in Parasitology*, Academic Press, London, p. 47-115.
- TIBAYRENC M 1998. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 577-580.
- URDANETA-MORALES S, TEJERO F 1992. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920): observations upon pleomorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 511-516.
- VALENTE SAS, VALENTE VC, FRAIHA NETO H 1999. Considerations on the epidemiology of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1): 395-398.
- VALENTE SAS, VALENTE VC, PINTO AYN, CÉSAR MJB, SANTOS MP, MIRANDA COS, CUERVO P, FERNANDES O. 2009. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 103: 291-297.
- VALLEJO GA, GUHL F, CARRANZA JC, LOZANO LE, SÁNCHEZ JL, JARAMILLO JC, GUALTERO D, CASTAÑEDA N, SILVA JC, STEINDEL M. 2002. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Trop.* 81: 77-82.
- WANDERLEY DMV. 1991. Vigilância entomológica da doença de Chagas no Estado de São Paulo. *Rev. Saúde Publ.* 25: 25-30.
- WATKINS R. 1971. Histology of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. *J Invertebr Pathol*, 17: 59-66.
- YEO M, ACOSTA N, LLEWELLYN M, SÁNCHEZ H, ADAMSON S, MILES GAJ, LÓPEZ E, GONZÁLEZ N, PATTERSON JS, GAUNT MW, ARIAS AR, MILES MA. 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasit*, 35:

225–233.

ZINGALES B, ANDRADE SG, BRIONES MRS, CAMPBELL DA, CHIARI E, FERNANDES O, GUHL F, LAGES-SILVA E, MACEDO AM, MACHADO CR, MILES MA, ROMANHA AJ, STURM NR, TIBAYRENC M, SCHIJMAN AG, 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104: 1051-1054.

