

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

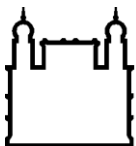
**ECO-BIOLOGIA DE TRIATOMÍNEOS NO MUNICÍPIO DE ORIXIMINÁ,
ESTADO DO PARÁ, AMAZÔNIA, BRASIL**

ALICE HELENA RICARDO DA SILVA

Orientação: Dr^a Teresa Cristina Monte Gonçalves

RIO DE JANEIRO

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALICE HELENA RICARDO DA SILVA

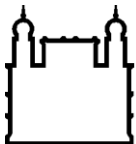
**ECO-BIOLOGIA DE TRIATOMÍNEOS NO MUNICÍPIO DE ORIXIMINÁ,
ESTADO DO PARÁ, AMAZÔNIA, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientação: Profa. Dr^a Teresa Cristina Monte Gonçalves

RIO DE JANEIRO

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALICE HELENA RICARDO DA SILVA

**ECO-BIOLOGIA DE TRIATOMÍNEOS NO MUNICÍPIO DE ORIXIMINÁ,
ESTADO DO PARÁ, BRASIL**

Orientação: Prof^a. Dr^a Teresa Cristina Monte Gonçalves

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a.: Marli Maria Lima - Presidente

Prof. Dr^a.: Jane Costa

Prof. Dr.: Rodrigo Gurgel-Gonçalves

Rio de Janeiro

2010

Ao meu doador anônimo e à sua família.
Obrigada

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus.

À Dr^a Teresa Cristina Monte Gonçalves, pelos cuidados de mãe, por me orientar com tanto carinho, por todos os seus ensinamentos, broncas e conselhos. E, principalmente, por nunca ter desistido de mim, sem o seu esforço eu não teria escrito esse trabalho. À Catarina Macedo, por me salvar nos momentos complicados das minhas várias dúvidas, além de revirar o mundo por mim para fazer os mapas mais lindos em tão pouco tempo. À Dr^a Jacenir Reis dos Santos-Mallet, por acreditar e confiar em mim desde a minha chegada ao Laboratório.

À Unidade Avançada José Veríssimo, Universidade Federal Fluminense, pelo apoio logístico nas campanhas. À Stela Santos, Mira e Carlinhos pela recepção e hospitalidade. À Secretaria de Saúde de Oriximiná e aos motoristas Sr Paulinho e Sr Hélio.

À Rosemere Duarte do Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Epidemiologia Molecular da Escola Nacional de Saúde Pública, pela colaboração com o teste de ELISA.

Ao Dr Toby Barret, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, por ceder os espécimes de *Rhodnius prolixus* de Honduras.

À Simone Kikuchi pelos PCRs, pelas leituras críticas do texto, pelas sugestões, por tentar me deixar mais tranquila, pelas caronas, enfim por muitas coisas. À Maria Luiza Ribeiro por ajudar a formatar as Referências Bibliográficas, pela imensa ajuda com o teste de ELISA e por torná-lo mais divertido. À Dr^a Ana Laura Carbajal de La Fuente, pelas análises estatísticas. À Vanessa Neves, pelo socorro com o PCR. Ao Márcio Pavan por ceder controles de *Rhodnius robustus* I. Ao Leandro Borges e Willian Marques, pela parceria nas coletas. A Simone Teves, Ana Paula Ruffino Amaro e Adalberto José da Silva, que com tanta paciência nos ajudam nas atividades do laboratório.

À Suzete Gomes, Denise Feder e Cícero Brasileiro por me incentivarem desde a Iniciação Científica a seguir a vida acadêmica.

Aos meus pais Maria José e Paulo pela paciência e por me darem a coragem de prosseguir. E às minhas irmãs, Mariana e Isabela, por tornar a minha volta para casa sempre tão divertida e esperada. À minha avó Maria Selva e à minha tia Íris, que cuidam de mim com tanto carinho.

Aos meus amigos simplesmente pela sua existência. À Rafaela Carneiro, pela companhia e força nos momentos mais difíceis. E à Cecília Barbosa, Maria Carolina Henriques, Felipe Oliveira e Pedro Ferreira pelo apoio, amizade e compreensão.

Aos colegas da turma de mestrado e aos de laboratório Simone, Cecília Stahl, Marianna, Bruno, Dany, Amanda, Bento, Cristina, Renato, Silvia, Luciana e Nathanielly, pela companhia de todo dia. À Sandra Bonifácio pelos conselhos sempre sábios.

À minha oftalmologista Dr^a Helena Parente Solari pela dedicação neste quase um ano de tratamento.

À Lucinda pela enorme paciência em me ouvir.

Ao Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, IOC – FIOCRUZ.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica, CNPq, pela bolsa de estudo.

NDICE

INTRODUÇÃO	1
• Região Amazônica	1
• Doença de Chagas na Amazônia	2
• Vetores da Amazônia	4
• Habitat de <i>Rhodnius</i> spp	6
• Hábito alimentar	7
• Diversidade de <i>Trypanosoma cruzi</i> na Amazônia	8
• Aspectos taxonômicos do gênero <i>Rhodnius</i>	8
• Controle vetorial	10
OBJETIVOS	13
• Geral	13
• Específicos	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
• Área de estudo	15
• Atividades de campo	19
▪ Ambientes e métodos de captura	19
▪ Levantamento de saberes sobre a ocorrência do inseto barbeiro no município de Oriximiná	23
• Atividades de laboratório	24
▪ Identificação dos espécimes	24
▪ Estabelecimento e manutenção das colônias	24
▪ Identificação da presença de infecção por tripanosomas, isolamento e manutenção em meio de cultura	24
▪ Tipagem molecular da cepa isolada	25
▪ Identificação de fonte alimentar	25
○ Sensibilização das placas	26
○ Adição dos antissoros	26
○ Adição do conjugado	26
○ Revelação do teste	27

o	Interpretação dos resultados	27
▪	Caracterização molecular de triatomíneos	27
o	Extração do DNA	27
o	Tipagem molecular - PCR-Multiplex	28
o	Eletroforese	28
▪	Identificação das palmeiras	28
▪	Análise estatística	29
	RESULTADOS	30
•	Captura dos triatomíneos	30
•	Avaliação da infecção por tripanosomatídeos	42
•	Identificação das fontes de alimentação	43
•	Fauna associada	44
•	Caracterização morfológica	46
•	Caracterização molecular	47
•	Levantamento de saberes sobre a ocorrência do inseto barbeiro no município de Oriximiná	48
	DISCUSSÃO	49
	CONCLUSÕES	55
	PERSPECTIVAS	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

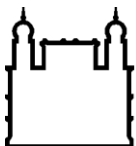
LISTA DE FIGURAS

1.1 - Localização dos surtos e casos de doença de Chagas diagnosticados na região.....	3
1.2 - Distribuição das quatro espécies que constituem o complexo prolixus....	9
3.1 - Localização das comunidades no município de Oriximiná e os pontos de captura marcados por GPS.....	17
3.2 - Diferentes tipos de ambientes pesquisados no município de Oriximiná. A – Ambiente rural. B – Ambiente silvestre.....	18
3.3 - Palmeira de inajá com presença de infrutescência (seta maior), e diferentes epífitas (setas menores), tais como bromélias e samambaias.....	19
3.4 - Tipos de ambientes. A - Palmeira com a base das folhas ainda presas ao estipe/tronco e a presença de epífitas, tais como samambaias e abiorana, B – Inflorescência de palmeiras.....	20
3.5 - Aspecto geral dos cachos de frutos de palmeiras. A – Bacaba; B – Açaí.....	21
3.6 - A – Busca ativa, dissecação de bromélia. B – Armadilha de Noireau.....	22
3.7 - Material didático apresentado à comunidade. Placa de Petri com as formas jovens e adulto do triatomíneo.....	23
4.1 - Aspecto geral da armadilha de Noireau evidenciando a captura de espécimes de <i>Rhodnius pictipes</i> e fauna associada (seta).....	30
4.2: Triatomíneos capturados no município de Oriximiná (PA). A – <i>R. pictipes</i> . B – <i>R. robustus</i>	32
4.3 - Aspecto geral da palmeira inajá (<i>Attalea marita</i>), com detalhe da vegetação associada.....	33
4.4 - Aspecto geral da palmeira de mucajá (<i>Acrocomia aculeata</i>), com detalhe da vegetação associada.....	34
4.5 - Aspecto geral da palmeira de murumuru (<i>Astrocaryum murumuru</i>), com detalhe da copa e do fruto.....	35

4.6 - Aspecto geral da palmeira de tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>), com detalhe da copa, com cacho de fruto (seta) e do fruto.....	36
4.7 - Aspecto geral da palmeira de muçajá (<i>Acrocomia aculeata</i>), com bromélias epíftas <i>Bromelia</i> sp.....	37
4.8 - Aspecto geral da palmeira de inajá (<i>Attalea marita</i>), com abiorana (<i>Lucuma lasiocarpa</i>) (seta).....	38
4.9 - Armadilha de Noireau positiva para duas espécies de triatomíneos. <i>Rhodnius pictipes</i> (seta menor) e <i>Rhodnius robustus</i> (seta maior).....	40
4.10 - Número de ecótopos infestados por <i>Rhodnius robustus</i> e <i>Rhodnius pictipes</i> no ambiente rural e silvestre, de nove comunidades do município de Oriximiná (PA).....	41
4.11 - Número de espécimes de <i>Rhodnius robustus</i> e <i>Rhodnius pictipes</i> capturados no ambiente silvestre e rural de nove comunidades do município de Oriximiná (PA).....	41
4.12 - Caracterização molecular do isolado Orix através da análise do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon por eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídeo. PM – Peso molecular (50pb), 1 – amostra controle de <i>T. cruzi</i> I (Dm28c), 2 – amostra controle de <i>T. cruzi</i> II (CL Brener), 3 – amostra controle de <i>T. rangeli</i> , 4 – amostra controle de ZIII (3663), 5 – Orix1 e 6 – controle negativo.....	43
4.13 - Diferentes tipos de fauna associada, capturados na armadilha de Noireau. A – Lagarto. B – Opilião.....	45
4.14 - Aspecto cromático de <i>Rhodnius robustus</i> . A – Aspecto geral da ninfa de 5 ^o estágio capturada no município de Oriximiná (PA); B – Aspecto geral da ninfa de 5 ^o estágio capturada em Roraima. Escala = 1mm.....	46
4.15 - PCR Multiplex – produtos da PCR discriminados em gel de agarose 1.5 % corado com brometo de etídeo. PM = peso molecular 100 bp, <i>R. prolixus</i> (285bp), <i>R. robustus</i> I (349bp), <i>R. robustus</i> II–IV (239bp). Amostras de 1 a 13 procedentes da comunidade do Caipuru e 14 a 21 da comunidade do Poção do município de Oriximiná (PA).....	47

LISTA DE TABELAS

1.1: Triatomíneos da Amazônia brasileira encontrados infectados (+) e não infectados (-) com o <i>Trypanosoma cruzi</i> (Coura <i>et al.</i> , 2002).....	5
3.1: Comunidades, ambientes e pontos de coleta pesquisados no município de Oriximiná (PA), no período de novembro de 2007 a novembro de 2008.....	16
4.1: Número de armadilhas, ecótopos e insetos capturados nas comunidades investigadas no município de Oriximiná, Estado do Pará, Brasil.....	31
4.2: Ecótopos investigados e espécimes de <i>Rhodnius</i> capturados, no município de Oriximiná, Estado do Pará, Brasil.....	39
4.3: Espécimes de <i>Rhodnius</i> capturados nos diferentes ecótopos de acordo com as fases de desenvolvimento.....	42
4.4: Identificação das fontes alimentares pelo teste de ELISA dos espécimes de <i>Rhodnius robustus</i> e <i>Rhodnius pictipes</i> , capturados no município de Oriximiná (PA).....	44
4.5: Identificação das fontes alimentares pelo teste de ELISA dos espécimes capturados nos ecótopos silvestre e rural do município de Oriximiná (PA).....	44



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

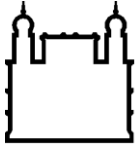
INSTITUTO OSWALDO CRUZ RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ECO-BIOLOGIA DE TRIATOMÍNEOS NO MUNICÍPIO DE ORIXIMINÁ, ESTADO DO PARÁ, AMAZÔNIA, BRASIL

Alice Helena Ricardo da Silva

O município de Oriximiná (PA), situado à margem esquerda do rio Trombetas na Amazônia Oriental, é um dos mais importantes da Calha Norte, pois com a extração de bauxita em Porto Trombetas, torna-se o principal pólo de extração de minério do mundo. Apresenta uma posição geográfica estratégica, por fazer fronteira com os países da Guiana e Suriname, e limites com o estado de Roraima. O Estado do Pará, onde está inserido politicamente, tem apresentado o maior número de casos agudos de doença de Chagas nas últimas duas décadas, cuja forma de transmissão tem sido atribuída ao consumo de frutos de palmeiras nativas. O objetivo deste trabalho foi estudar a eco-biologia dos triatomíneos desta região, até então não estudada, contribuindo com os serviços para as ações de vigilância e controle dos triatomíneos. As investigações foram realizadas em áreas silvestres e rurais utilizando o método de busca passiva, com o uso das armadilhas de Noireau e a busca ativa. O material coletado foi identificado em nível de espécie utilizando a chave dicotômica de Lent & Wygodzinsky e pela técnica da PCR Multiplex. Os triatomíneos capturados foram examinados para averiguar a presença de tripanosomatídeos e o isolado, caracterizado por tipagem molecular. A identificação das fontes alimentares foi feita pelo método de ELISA. Dos 442 espécimes coletados, 289 foram identificados como *Rhodnius robustus* e 153 como *Rhodnius pictipes*. A taxa de infecção para tripanosomatídeos foi de 17,4% e o isolado classificado como Z3. Devido à falta de conteúdo estomacal dos insetos, trabalhou-se com *pool* para avaliação da fonte alimentar e, sendo assim, as 54 amostras utilizadas para o teste de ELISA foram constituídas de 118 insetos. Dos 11 anti-soros testados, apenas quatro positivaram para ave, hemolinfa, cavalo e roedor. Verificou-se uma variação morfológica nos espécimes que foram confirmados como *R. robustus* por PCR Multiplex. *R. robustus* apresentou uma associação com palmeiras do tipo inajá, que formam aglomerados, tornando-se abundantes em áreas rurais, ao contrário de *R. pictipes* encontrados em outras espécies de palmeiras no ambiente silvestre. A comprovação de espécies de triatomíneos na região estudada e a presença de *T. cruzi* em um dos espécimes coletados nas proximidades da Sede do Município evidenciou a importância da vigilância entomológica e epidemiológica na área estudada.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ECO-BIOLOGY OF TRIATOMINES IN THE ORIXIMINÁ MUNICIPALITY STATE OF PARÁ, AMAZON, BRASIL

Alice Helena Ricardo da Silva

The municipality of Oriximiná located on the left bank of the river Trombetas, in the eastern Amazon, is one of the most important cities of Northern Rail, as with bauxite mining at Porto Trombetas, becomes the main hub of the mining world. Presents a strategic geographical position, by making the border with the countries of Guyana and Suriname, and limits to the state of Roraima. The state of Pará, where it operates politically, has submitted the largest number of acute cases of Chagas disease in the past two decades, whose mode of transmission has been attributed to consumption of fruits of native palms. This work aims to study the eco-biology of the insects of this region, hitherto not studied, contributing to the vigilance and control of triatomines. The investigations were conducted in wilderness areas and rural areas using the method of passive search, with the use of Noireau traps and active search. The material collected was identified to the species level using the dichotomous key of Lent & Wygodzinsky and Multiplex PCR, was also used to investigate the presence of tripanosomatids and the identification of the feeding habits using the ELISA method. Of the 442 specimens collected, 289 were identified as *Rhodnius robustus* and 153 as *Rhodnius pictipes*. The infection rate for trypanosomatids was 17.4% and one strain was identified as Z3. Due to the lack of gut contents of the insects, we worked with a pool for the evaluation of food source and, thus, the 54 samples used for ELISA, were composed of 118 insects. Of the 11 antisera tested, only four were positive for bird, hemolymph, horse and rodent. There was a morphological variation in specimens that were confirmed as *R. robustus* by Multiplex PCR. The association of *R. robustus* with palm type inajá, which form clusters, becoming abundant in rural environments, was confirmed as opposed to *R. pictipes* which was found in other palm species in the wild. Evidence of species of insects in the region studied and the presence of *T. cruzi* in one of the specimens, near the headquarters of the city, highlighted the importance of epidemiological and entomological surveillance in the region.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Região Amazônica

A formação da Amazônia data de três milhões de anos, formando o maior bioma tropical do planeta e ocupando cerca de 6,5 milhões Km² (Dall’Agnol e Rosa-Costa, 2008). Considerado um mosaico devido à diversidade de ecossistemas que o compõe, é constituído por florestas tropicais úmidas e secas, e de terra firme, áreas inundáveis de terra baixa e montanha, formações semi-áridas tais como campinas e campinaranas, além das áreas que já foram modificadas pelo homem (Ab’Saber, 2002). Entre a vegetação que compõe esse sistema, as palmeiras têm um papel significativo principalmente em relação à diversidade e utilização pela população humana. Existem aproximadamente 2.800 espécies de palmeiras no mundo, e 13,8% destas são nativas da Bacia Amazônica (Kahn e Corradini, 1994).

As palmeiras caracterizam a paisagem amazônica e estão distribuídas em diversos tipos de habitat como floresta de platô, floresta de vertente, floresta de campinarana, floresta de baixio, florestas periodicamente inundadas além de estarem disseminadas por diversas florestas degradadas como, capoeiras e pastagens abandonadas. Na floresta de terra firme, a maioria das espécies está adaptada ao sub-bosque, e a minoria são palmeiras arborescentes. Nas áreas periodicamente inundadas, capoeiras e pastagens, ocorrem em pouca diversidade e grande abundância (Miranda e Rabelo, 2006).

A idéia de que o ecossistema amazônico tem potencial para tolerar os freqüentes impactos antrópicos é decorrente da proposição de que a Floresta Amazônica, com sua enorme diversidade faunística, permaneceu relativamente estável durante milhões de anos, embora estivesse exposta a intempéries (Rossetti e Toledo, 2008). Entretanto, em oposição ao que se acreditava, os impactos ambientais na Amazônia, principalmente aqueles causados pelas pressões antrópicas, têm consequências no equilíbrio deste bioma. Um exemplo é o que ocorre com a retirada da cobertura vegetal que permite o aparecimento de extensas populações quase homogêneas de palmeiras como, *Orbignya phalerata*, *Maximiliana maripa*, *Attalea monosperma*, *Astrocaryum acaule* e *Astrocaryum vulgare* (Miranda e Rabelo, 2006).

1.2. Doença de Chagas na Amazônia

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana constitui uma das mais importantes endemias, afetando de 15 a 16 milhões de pessoas na América Latina e 75 a 90 milhões expostas à infecção (Coura *et al.*, 2007; Moncayo e Silveira, 2009).

De acordo com Teixeira *et al.* (2001), a Amazônia, que era considerada como área não-endêmica para a transmissão, teve este status questionado. Miles (2003) considerava que, apesar de haver transmissão de baixa intensidade com casos humanos autóctones, a doença de Chagas ainda não era endêmica na região por causa da ausência de espécies de triatomíneos adaptadas às moradias e da pequena população humana. Mais recentemente, Pinto *et al.* (2008) definiram a doença como endêmica, enquanto, Valente *et al.* (2009), ao relatarem pelo menos 600 casos da forma aguda na Amazônia brasileira, classificaram-na como emergente.

Duas áreas podem ser diferenciadas de acordo com os padrões de transmissão: as regiões originalmente de risco para a transmissão vetorial, uma onde está incluída a maior parte dos Estados, e a outra que compreende a Amazônia Legal (Consenso de Chagas, 2005).

Os mecanismos de transmissão na Amazônia não correspondem àqueles que são reconhecidos como das áreas endêmicas, com a instalação e permanência do vetor nas casas (Silveira, 2007). As espécies encontradas são geralmente silvestres não colonizando as moradias. Entretanto, existem relatos de colonização incipiente, como *Triatoma maculata* e *Panstrongylus geniculatus*, reconhecidos na Venezuela como vetores secundários, de importância na área extra-amazônica, vem sendo capturado com frequência em habitações humanas no Estado de Roraima, no Brasil (Luitgards-Moura *et al.*, 2005b). Outro exemplo deste fato foi observado com *Panstrongylus herreri* e *Rhodnius ecuadoriensis*, no Peru, onde são considerados os principais vetores intradomiciliares, sendo ambos encontrados infectados por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli* (Rojas *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2007).

Dessa forma, na Amazônia a transmissão do parasito vem ocorrendo através de mecanismos excepcionais, como vetorial domiciliar sem colonização, vetorial extradomiciliar, ocupacional e a ocorrência de surtos episódicos de transmissão oral do parasito (Rojas *et al.*, 2005).

Suspeita-se que a transmissão vetorial dentro das casas sem domiciliação ocorra por incursões periódicas ou regulares ao interior das residências por insetos adultos, atraídos inicialmente pela luz, ou por triatomíneos introduzidos passivamente nas residências juntamente com materiais de construção ou lenha (Forattini *et al.*, 1971; Silveira, 2007). A transmissão vetorial extradomiciliar ocorre quando o homem invade as áreas de floresta e entra em contato com o triatomíneo, como no caso da exposição ocupacional dos coletores de piaçava a triatomíneos silvestres como *Rhodnius brethesi* (Coura *et al.*, 1994; Coura *et al.*, 2002). A transmissão oral, que indiretamente ou passivamente, pode ser considerada como vetorial, ocorre pelo consumo de alimentos contendo triatomíneos ou contaminados com as suas fezes ou ainda pela ingestão de carne crua de hospedeiros mamíferos infectados com o parasito (Valente *et al.*, 1999; Nóbrega *et al.*, 2009).

Os primeiros casos de doença de Chagas na Amazônia datam de 1941, por Floch e Tasque, na Guiana Francesa, enquanto que na Amazônia Brasileira, os primeiros relatos são originários do Estado do Pará, em 1960, em que quatro membros da mesma família foram infectados. Entretanto, nenhum triatomíneo foi encontrado, indicando que a infecção pudesse ter ocorrido por via oral (Shaw *et al.*, 1969) (Figura 1.1).

Segundo Aguilar *et al.* (2007) o risco desta doença se estabelecer como uma importante ameaça à população amazônica está relacionado a um complexo grupo de interações biológicas e determinantes sociais.

Os fatores biológicos estão associados à diversidade de fauna existente, permitindo que haja uma ampla variedade de espécimes, dentre vetores e reservatórios que participam do ciclo silvestre de transmissão de *T. cruzi* (Miles *et al.*, 1981a,b; Coura *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2002; Luitgards-Moura *et al.*, 2001).

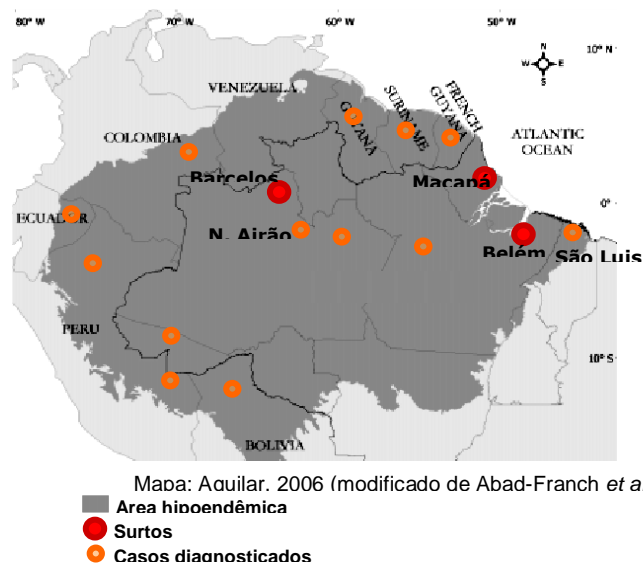


Figura 1.1: Localização dos surtos e casos de doença de Chagas diagnosticados na

Os determinantes sociais relacionados com o aumento do número de casos incluem a atividade econômica humana que acarreta crescimento populacional de forma desordenada nas áreas rurais. Com o desmatamento e colonização, os animais silvestres são forçados a se dirigir para outras áreas, levando os triatomíneos a recorrerem a fontes alimentares alternativas em áreas de peri e intradomicílio (Coura *et al.*, 1999). Além disso, a migração de populações humanas de regiões endêmicas, muitas vezes acompanhadas de reservatórios domésticos de *T. cruzi* ou de seus vetores, permite a introdução de espécies não autóctones infectadas com o protozoário, possibilitando a ocorrência da domiciliação triatomínica, como problema de saúde pública, em região onde ainda não foi assinalada (Forattini, 1980; Coura *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2001).

1.3. Vetores da Amazônia

A Amazônia compreende nove países da América Sul, Brasil, Bolívia, Colômbia Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. Na Amazônia Brasileira estão incluídos os estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Roraima, Rondônia e Tocantins.

Na região Amazônica são descritas pelo menos 27 espécies de triatomíneos agrupadas em 9 gêneros (Aquilar *et al.*, 2007; Abad-Franch e

Monteiro, 2007). Na Amazônia brasileira foram identificadas pelo menos dezesseis espécies de triatomíneos, das quais dez foram encontradas infectadas por *T. cruzi* (Coura *et al.*, 2002; Junqueira *et al.*, 2005). E embora a maioria das espécies seja silvestre, há a presença de *T. maculata* em domicílio em Roraima (Luitgards-Moura *et al.*, 2005).

Os gêneros *Belminus*, *Cavernicola*, *Eratyrus*, *Microtriatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* são assinalados na região Amazônica (Tabela 1.1) (Lainson *et al.*, 1979; Miles *et al.*, 1981a; 1983; Coura *et al.*, 2002). Destes, seis espécies estão associadas à microhabitats de palmeiras (Abad-Franch *et al.*, 2007, 2010).

Tabela 1.1: Triatomíneos da Amazônia brasileira encontrados infectados (+) e não infectados (-) com o *Trypanosoma cruzi* (Coura *et al.*, 2002).

Espécies	
<i>Belminus herreri</i> (-)	<i>Rhodnius brethesi</i> (+)
<i>Cavernicola lenti</i> (-)	<i>Rhodnius neglectus</i> (+)
<i>Cavernicola pilosa</i> (-)	<i>Rhodnius nasutus</i> (-)
<i>Eratyrus mucronatus</i> (+)	<i>Rhodnius paraensis</i> (+)
<i>Microtriatoma trinidadensis</i> (+)	<i>Rhodnius pictipes</i> (+)
<i>Panstrongylus geniculatus</i> (+)	<i>Rhodnius robustus</i> (+)
<i>Panstrongylus lignarius</i> (+)	<i>Triatoma maculata</i> (-)
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i> (+)	<i>Triatoma rubrofasciata</i> (-)

No Estado do Amazonas, Município de Barcelos, Coura *et al.* (1993, 1994a,b, 1999) constataram o comportamento de ataque de *Rhodnius brethesi* aos coletores da piaçaba e, através de estudos sorológicos, evidenciaram a presença de infecção por *T. cruzi* e *T. rangeli* em humanos.

Luitgards-Moura (2001, 2005b), realizando o levantamento da fauna triatomínica no estado de Roraima, encontrou no município de Boa Vista (RR) espécies de *T. maculata* e *P. geniculatus* no domicílio e no peridomicílio. Em Rorainópolis, encontrou palmeiras positivas tanto no ambiente peridomiciliar quanto no silvestre, identificando as espécies como *R. robustus* e *R. pictipes*.

No Estado do Pará existem 15 espécies de triatomíneos, a maioria de hábito silvestre, entre as quais se destacam *R. pictipes*, *R. brethesi*, *R. robustus* e

P. geniculatus, espécie que vêm demonstrando comportamento invasivo nos estados vizinhos, merecendo, por isso, especial atenção (Miles *et al.*, 1981a; 1983).

1.4. Hábitat de *Rhodnius* spp

Os habitats dos triatomíneos são diversificados, indo desde tocas à ocos de árvores para o gênero *Panstrongylus*, afloramentos rochosos e ninhos de roedores para *Triatoma* e palmeiras para *Rhodnius* (Gaunt e Miles, 2000).

As palmeiras são ecótopos antigos e bem definidos. A sua variabilidade morfológica favorece a nidificação e a colonização de diferentes mamíferos, aves, répteis e anfíbios, que podem atuar como fontes de alimento para os triatomíneos (Mascarenhas, 1991), mostrando-se como importantes ecótopos naturais (Barretto *et al.*, 1969; Romaña *et al.*, 1999; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2008). A matéria orgânica encontrada em sua copa, juntamente com as epífitas que crescem em seu redor, favorece a formação de um microclima importante no estabelecimento de triatomíneos do gênero *Rhodnius*, bem como a adaptação de diferentes espécies às palmeiras (Diotaiuti *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2008). Dessa forma, a probabilidade de detecção de colônias de triatomíneos é maior quanto maior for a quantidade de matéria orgânica e epífitas dispostas nas palmeiras (Abad-Franch *et al.*, 2010).

Na Amazônia e em outras regiões Neotropicais as palmeiras do gênero *Attalea* são importantes locais de nidificação e refúgio para as populações silvestres de *Rhodnius*. O complexo *Attalea* engloba quatro gêneros, *Attalea*, *Maximiliana*, *Orbignya* e *Scheelea*, que compreendem as espécies mais abundantes capazes de formar grandes grupos nas áreas antropizadas na floresta. Associadas à este complexo, estão as espécies de triatomíneos *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus*, *R. robustus* e *R. pictipes* (Romaña *et al.*, 1999).

A distribuição geográfica das espécies silvestres de *Rhodnius* coincide com a das palmeiras que ocupam, ambientes que vão desde florestas úmidas ou secas até o cerrado (Barrett, 1991; Dias *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008). Podem apresentar vários graus de associação, dos mais estritos como *R. brethesi*,

infestando a espécie *Leopoldina piassaba* (Mascarenhas, 1991), aos mais generalistas como *R. pictipes*, relatado em mais de um gênero de palmeira (Abad-Franch *et al.*, 2005). Contudo, existem exceções quanto a esta associação, como *Rhodnius domesticus*, que está geralmente associado a bromélias e ocos de árvores e *Rhodnius paraensis* encontrado em uma toca de rato-de-espinho (*Echimyus chrysurus*) (Gaunt e Miles, 2000) e *R. nasutus* formando colônias em oiticica, árvore típica da caatinga (*Licania rigida*) (Lima e Sarquis, 2008).

As mudanças ambientais antropogênicas podem propiciar o contato das espécies de *Rhodnius* abrigados em palmeiras com a população humana (Abad-Franch *et al.*, 2005). A retirada da floresta primária permite a formação de “ilhas” de palmeiras (Miranda e Rabelo, 2006), entretanto algumas palmeiras são preservadas próximas às habitações humanas (Withlaw e Chianotis, 1978). Com a expansão dessas espécies vegetais, as colônias de triatomíneos tornam-se mais densas, e conseqüentemente acarretando em maior competição pela fonte sanguínea. Os insetos adultos famintos dispersam, invadindo as casas próximas, provavelmente atraídos pela luz (Forattini, 1979; Teixeira *et al.*, 2001). Além disso, o uso de produtos de palmeiras pelos moradores das áreas rurais, como folhas e estipes na construção de cercas e telhados de casas, favorece o transporte passivo dos triatomíneos silvestres para o ambiente doméstico (Pifano *et al.*, 1973; Bar e Wisnivesky-Colli, 2001).

A presença dessas espécies vegetais serve como indicador ecológico de áreas de risco de transmissão do parasita *T. cruzi*, por abrigarem, além dos vetores, os hospedeiros que participam do ciclo silvestre de transmissão deste protozoário flagelado. Enfatiza-se assim a importância desse grupo na epidemiologia da doença de Chagas (Romaña *et al.*, 1999, 2003; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004; Abad-Franch *et al.*, 2010).

1.5. Hábito Alimentar

O interesse na determinação das fontes alimentares dos insetos hematófagos foi crescendo à medida que foram realizadas descobertas com relação ao envolvimento de insetos na transmissão de doenças. O conhecimento

do hábito alimentar dos insetos transmissores tornou-se uma ferramenta importante para o delineamento de estratégias de controle de vários agravos transmitidos por estes invertebrados (Gordon *et al.* 1991; Ngumbi *et al.* 1992; Savage, 1993). Estabelecer o padrão alimentar dos insetos hematófagos é de grande importância para o entendimento da sua biologia, além ser fundamental para a Saúde Pública (Duarte e Marzochi, 2007). No que se referem aos triatomíneos, os resultados obtidos dessas análises contribuem de forma significativa para a compreensão dos possíveis reservatórios naturais que participam do ciclo de transmissão de *T. cruzi* (Gonçalves *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 2005).

1.6. Diversidade de *Trypanosoma cruzi* na Amazônia

Baseando-se no polimorfismo observado nos perfis eletroforéticos de seis enzimas, Miles *et al.* (1977; 1978) caracterizaram três perfis de enzimas pertencentes a grupos de parasitos (zimodema), onde o zimodema I (ZI) e zimodema III (Z3) estão relacionados ao ciclo de transmissão silvestre e zimodema II (ZII) com o ciclo doméstico do parasito (Miles *et al.*, 1978).

Na Amazônia brasileira há um predomínio de *T. cruzi* I e do zimodema 3 (Z3) silvestres, diferente das zonas clássicas de doença de Chagas endêmicas no Brasil, onde se encontra predomínio de *T. cruzi* II, doméstico (Junqueira *et al.*, 2005).

Mais recentemente, em reunião realizada para a padronização na nomenclatura de *T. cruzi*, por consenso, o comitê reconheceu que as cepas de *T. cruzi* deverão ser classificadas em seis DTUs (Discret Taxonomic Units) que foram denominadas de *T. cruzi* I-VI (Zingales *et al.*, 2009).

1.7. Aspectos Taxonômicos do gênero *Rhodnius*

O gênero *Rhodnius* participa do ciclo enzoótico de *T. cruzi* transmitindo a infecção para humanos em partes da América Central, Venezuela, Colômbia,

Equador, Peru, Bolívia e Brasil, incluindo toda a bacia Amazônica (Lent e Wygodzinsky, 1979; Barrett, 1991; Carcavallo, 1998).

Barrett (1988), com base na dificuldade da identificação de algumas espécies muito semelhantes de *Rhodnius*, criou o complexo prolixus, no qual foram incluídas quatro espécies: *Rhodnius nasutus*, *Rhodnius neglectus*, *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius robustus*. De acordo com Lent e Wygodzinsky (1979), as duas primeiras tem distribuição geográfica restrita ao território brasileiro, com ocorrência nas regiões nordeste e centro-oeste, respectivamente. As demais espécies, no Brasil, ocorrem nos Estados do Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia, havendo dúvida quanto à definição da distribuição geográfica (Dujardin *et al.* 1991). *R. prolixus* tem sua ocorrência assinalada também no Estado de Goiás (Lent e Wygodzinsky, 1979) e Rio de Janeiro (Pinho *et al.* 1998).

R. prolixus é predominantemente doméstico, encontrado do norte da América do Sul ao sul do México, e considerado vetor primário da doença de Chagas na América Central, Colômbia e Venezuela. *R. robustus* é silvestre e sua distribuição se sobrepõe à de *R. prolixus* ao longo da América do Sul (Lent e Wygodzinsky, 1979) (Figura 1.2).

De acordo com Lent e Wygodzinsky (1979), as características morfológicas que distinguem as espécies do complexo prolixus em dois grupos, *R. nasutus/R. neglectus* e *R. prolixus/R. robustus* são os ângulos antero-laterais do pronoto e faixas escuras do lobo posterior do pronoto. Ou ainda pelo processo mediano do pigóforo, estrutura da genitália externa dos machos. Entretanto, tais características têm deixado dúvidas quanto à identificação em nível de espécie, o que motivou o início da utilização de novos marcadores taxonômicos e moleculares para a correta identificação.



Mapa: Monteiro et al., 2000.

Figura 1.2: Distribuição das quatro espécies que constituem o complexo prolixus.

Vários autores vêm buscando através de diferentes metodologias, padrões de diferenciação para os representantes do complexo prolixus. Harry (1993a, b), Harry *et al.* (1992) e Solano *et al.* (1996) buscaram esta diferenciação usando caracteres da genitália externa e estudos isoenzimáticos, Soares *et al.* (1998), pela verificação da diferença no perfil das proteínas da glândula salivar e Villegas *et al.* (2002) pela morfometria geométrica. Análises moleculares, como o estudo de fragmentos de mtDNA, de citocromo b e de rRNA (Lyman *et al.*, 1999) também foram realizadas.

1.8. Controle Vetorial

Um dos principais programas de controle vetorial teve início em 1991, com a Iniciativa do Cone Sul, voltada ao controle de *Triatoma infestans* abrangendo a Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Paraguai, Uruguai e Peru e da América Central. Em 1997, outro programa foi implementado o visando o controle de *R. prolixus* e *Triatoma dimidiata* abrangendo El Salvador, Guatemala, Honduras e Nicarágua e do Pacto Andino na Colômbia (Dias, 2007b).

Na América do Sul, as ações de controle voltadas para a estratégia do monitoramento entomológico do principal vetor *T. infestans* no domicílio, tiveram um impacto expressivo na redução da transmissão da doença de Chagas no Brasil (Vinhaes e Dias, 2000). Devido às medidas de controle baseadas na eliminação das colônias de triatomíneos do intra e peridomicílio e avaliação do sangue para transfusões, obteve-se uma redução na incidência da doença em 70% nos países da América do Sul (Dias e Schofield 1999, Moncayo 1999). Como consequência de todas essas atividades, em junho de 2006 o Brasil recebeu o certificado de interrupção da transmissão por *T. infestans*. Entretanto, de acordo com o Consenso de Chagas (2005), a vigilância entomológica se faz necessária, uma vez que as espécies nativas, que tem capacidade de invasão tendem à domiciliação. Porém, ao contrário do que foi obtido para a espécie *T. infestans*, o resultado das ações de controle das demais espécies nativas, com potencial de invadirem e estabelecerem colônias quando do expurgo de espécies domiciliadas, foi menos satisfatório, uma vez que são encontradas no domicílio, no peridomicílio e no ambiente silvestre, podendo ser consideradas como “candidatos vetores”, isto é, com possibilidade de participar ativamente na transmissão da doença. A presença nos diferentes ambientes se deve ao fato da ampla valência ecológica que estas espécies possuem (Schofield, 1994).

Até recentemente, o impacto dos vetores silvestres e semi-silvestres tinham sido subestimados, ou mesmo ignorados. Nos últimos anos houve um aumento no interesse no estudo desses triatomíneos, uma vez que algumas dessas espécies têm sido frequentemente encontradas invadindo domicílios (Dujardin *et al.*, 1991; Abad-Franch *et al.*, 2005). Este comportamento é consequência das atividades antrópicas e a redução das fontes alimentares no ambiente natural, o que dificulta as medidas de controle da doença de Chagas a longo prazo (Vinhaes e Dias, 2000; Dias, 2007a). Autoridades de Saúde Pública têm voltado sua atenção para esses triatomíneos silvestres porque podem ser a chave da compreensão do processo inicial de colonização das habitações e de recolonização após medidas de intervenção de controle do vetor (Dujardin, 1991; Costa, 1999; Dias, 2007a).

A emergência da doença de chagas na Amazônia é um desafio frente às estratégias de controle conhecidas, uma vez que a transmissão ocorre principalmente por triatomíneos silvestres e pela via oral. Devido a essas peculiaridades, é necessária a adoção de medidas de vigilâncias diferenciadas daquelas usadas nas regiões historicamente endêmicas (Silveira, 2007). Da mesma forma, reconhece-se a falta de informações sobre aspectos da doença de Chagas voltados para a bio-ecologia das populações dos vetores, para os parasitas envolvidos, a extensão da doença humana e as formas de transmissão na área. Assim com o objetivo de prevenir o estabelecimento da transmissão vetorial endêmica da doença de Chagas propôs-se em 2004 a criação da “Iniciativa dos países Amazônicos para a Vigilância e o Controle da Doença de Chagas” (AMCHA), constituída pelos países Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, França, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela (Rojas *et al.*, 2005).

Aliado a esses fatos a ocorrência de casos humanos da doença de Chagas na Amazônia mostra o risco aumentado proporcionalmente à aproximação, cada vez maior entre vetores, reservatórios de tripanosomas e o homem (Coura *et al.*, 2002). Dessa forma a principal linha de investigação no presente estudo é realizar um levantamento das espécies de triatomíneos e sua distribuição nos ecótopos silvestres em um município do Estado do Pará, em uma região não estudada, contribuindo dessa forma com as ações de vigilância entomológica.

2. Objetivo Geral

Conhecer a fauna triatomínica e aspectos da eco-biologia desses insetos em diferentes comunidades do município de Oriximiná, Amazônia, Estado do Pará. Contribuindo com eventuais ações de vigilância e controle de potenciais vetores de *Trypanosoma cruzi* na Amazônia.

2. Objetivos Específicos

- Investigar a ocorrência de triatomíneos em diferentes ecótopos de comunidades do município de Oriximiná.
- Identificar as espécies de triatomíneos capturados com base na chave dicotômica de Lent e Wygodzinsky (1979).
- Conhecer os ecótopos naturais de triatomíneos e da fauna associada.
- Determinar a taxa de infecção por tripanosomatídeos, pela análise do conteúdo intestinal dos triatomíneos.
- Identificar a fonte alimentar dos triatomíneos pelo teste de ELISA.
- Avaliar o status taxonômico de espécimes cuja identificação gerou dúvida, pela técnica de PCR-Multiplex.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

O município de Oriximiná (4°45'48" latitude sul e 55°22'09" longitude oeste) está localizado no bioma Amazônico, a noroeste do Estado do Pará, Mesorregião do Baixo Amazonas (Fig. 3.1). Possui área de 107.602,99 km², a população é de aproximadamente 58.683 habitantes e dista, em linha reta, 810 Km de Belém, a capital do Estado; por via fluvial, 1.080 Km; e por via terrestre, 4.409 Km. (<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=150530>). Situado à margem esquerda do rio Trombetas, é um dos municípios mais importantes da Calha Norte, pois com a extração de bauxita em Porto Trombetas, torna-se um importante pólo de extração de minério do mundo (http://www3.ufpa.br/projetomineracao/docs/tribut/Arg%2038_minas.pdf). Sua altitude é de 46m acima do nível do mar e o ponto mais alto do município é a serra de Tumucumaque, com 700 m de altitude. A topografia da cidade declina no sentido do rio Trombetas e o declive máximo (6020) é de 40 m.

O regime pluviométrico anual define uma estação relativamente seca, mas o total de chuvas é suficiente para manter o período. Quanto à umidade relativa, esta apresenta valores acima de 80%, em quase todos os meses do ano. A pluviosidade aproxima-se dos 2.000 mm anuais, entretanto, é um tanto irregular durante o ano. As estações chuvosas coincidem com os meses de dezembro a junho, caracterizando o período de inverno e, as menos chuvosas, de julho a novembro, o período de verão. A temperatura do ar é sempre elevada, com média anual de 25,6°C. O excedente de água no solo, segundo o balanço hídrico, corresponde aos meses de fevereiro a julho, com um excedente de mais de 750 mm, sendo março o mês de maior índice. A deficiência de água se intensifica entre agosto e dezembro, sendo setembro o mês de maior carência, ao se constatar em menos de 90 mm (portal2.saude.gov.br/portal/arquivos/.../Diagnostico_Local_Oriximina-PA).

O município pesquisado compreende uma região de fronteira até então não estudada. Localizado na Amazônica Oriental, apresenta diversidade da cobertura vegetal característica, o que propicia diversidade faunística, fomentando

condições para a ocorrência de diferentes representantes da fauna de animais vertebrados e invertebrados que podem servir de hospedeiros e/ ou reservatórios do parasito *T. cruzi*. Dessa forma, um estudo sobre os triatomíneos possibilita conhecer os aspectos ecológicos desses vetores contribuindo para os serviços de ações de vigilância e controle.

O presente trabalho foi realizado em áreas rurais e silvestres do município abrangendo nove comunidades (Tabela 3.1). Nestas, foram identificados e investigados 25 pontos de coletas, todos georreferenciados. As localidades Caipuru, Estrada do Laudica, Estrada do Lixão e Paracuí são áreas rurais impactadas, com a presença de algumas casas e grande parte destinada à criação de gado. A comunidade do Poção consta de áreas rurais e silvestres. As comunidades do BEC (Batalhão de Engenharia e Construção), Campos Gerais, Campina e Sapucú são áreas silvestres (Fig. 3.2).

Tabela 3.1: Comunidades, ambientes e pontos de coleta pesquisados no município de Oriximiná (PA), no período de novembro de 2007 a novembro de 2008.

Comunidades	Ambiente	Pontos de coleta
Caipuru	Rural	6
Estrada do Laudica	Rural	1
Estrada do Lixão	Rural	2
Paracuí	Rural	1
Poção	Silvestre, Rural	5
Fazenda Gilberto (BEC)	Silvestre	1
Campina	Silvestre	1
Campos Gerais	Silvestre	4
Sapucú	Silvestre	4

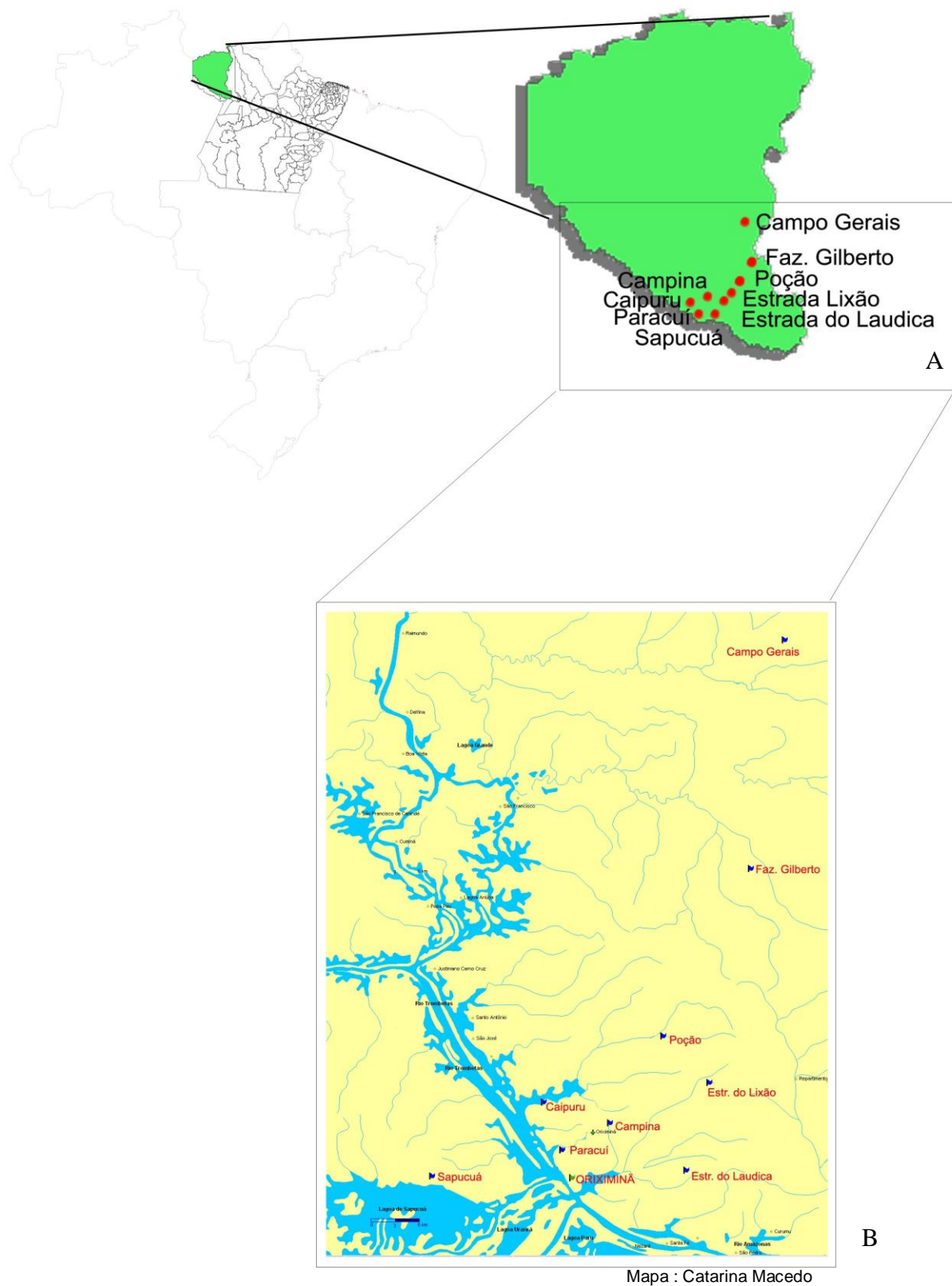


Figura 3.1: A - Localização das nove comunidades trabalhadas no município de Oriximiná (PA).
 B - Pontos de captura.



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 3.2: Diferentes tipos de ambientes pesquisados no município de Oriximiná.
A – Ambiente rural. B – Ambiente silvestre.

3.2. Atividades de campo

3.2.1. Ambientes e métodos de Captura

As capturas ocorreram ao longo de um ano, nas estações seca e chuvosa, abrangendo os meses de novembro de 2007 e abril, junho, agosto e novembro de 2008. Os ecótopos de busca foram escolhidos de acordo com a possível condição de abrigar triatomíneos, tais como: palmeiras com inflorescências e infrutescências, cujas bases das folhas permanecem aderidas ao estipe/tronco após a abscisão da folha e presença de epífitas e outros tipos de vegetação (Fig. 3.3, 3.4). Palmeiras como açai e bacaba, apesar de não apresentarem tais características, também foram pesquisadas, devido aos relatos de associação com a transmissão por via oral do parasito *T. cruzi*, pela ingestão de sucos (Valente *et al.*, 1999) (Fig. 3.5).



Foto: Teresa Cristina Gonçalves

Fig. 3.3: Palmeira de inajá com presença de infrutescência (seta maior), e diferentes epífitas (setas menores), tais como bromélias e samambaias.



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Fig. 3.4: Tipos de ambientes. A - Palmeira com a base das folhas ainda presas ao estipe/tronco e a presença de epífitas, tais como samambaias e abiorana, B – Inflorescência de palmeiras.



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Fig. 3.5: Aspecto geral dos cachos de frutos de palmeiras. A – Bacaba; B – Açaí.

- **Busca ativa**

A busca ativa foi realizada em locais passíveis de colonização por estes insetos, tais como casca de árvores, afloramentos rochosos, bromélias (Fig. 3.6A), inflorescências, folhas e espatas de palmeiras, e ninhos de animais. As buscas eram feitas entre 30 minutos e 1 hora com auxílio de pinças e sem o uso de desalojante.

- **Busca passiva**

A busca passiva foi feita utilizando-se armadilhas descritas por Noireau *et al.*, (1999). Estas são constituídas de um recipiente plástico, cilíndrico, fechados com tampa telada envolto por fita adesiva de dupla face contendo isca animal viva (pinto com até uma semana) e devidamente identificada (Fig. 3.6B). O número de

armadilhas utilizadas por ecótopo investigado variou de uma a cinco dependendo da área do mesmo e conseqüentemente de possíveis refúgios para triatomíneos. As armadilhas permaneceram do período vespertino ao matutino totalizando, em média, uma faixa de 8 horas. Esse horário foi escolhido com o intuito de evitar o calor excessivo do meio-dia e de ser o de maior atividade dos triatomíneos. O trabalho foi realizado em áreas das comunidades em diferentes tipos de ecótopos, como palmeiras, vegetação associada, troncos, ocos de árvores, tocas de animais e afloramentos rochosos. Nas palmeiras as armadilhas foram dispostas no ângulo formado pelas folhas e o estipe e entre as plantas que crescem no seu entorno e que formam a vegetação associada.

Os espécimes de triatomíneos coletados foram mantidos em tubos Falcon de 50ml contendo papel de filtro e identificados com o número da armadilha.



Foto: Teresa Cristina Gonçalves



Foto: Anthony Guimarães

Figura 3.6: A – Busca ativa, dissecação de bromélia. B – Armadilha de Noireau.

Todos os seres vivos encontrados aderidos à fita dupla foram considerados como fauna associada aos triatomíneos.

3.2.2. Levantamento de saberes sobre a ocorrência do inseto barbeiro

Foi feito um levantamento junto à Secretaria Municipal de Saúde a respeito da ocorrência de casos de doença de Chagas no município, assim como notificações sobre a presença desses insetos.

Ao longo do trabalho, foi questionado aos moradores, cujas casas encontravam-se nos locais pesquisados, aos moradores da sede do município, bem como os manipuladores de açaí, registrados pela Vigilância Sanitária no município de Oriximiná, sobre o conhecimento do inseto barbeiro. Nesta investigação foram utilizadas, como material didático, placas de Petri com todas as fases de desenvolvimento dos triatomíneos (Fig. 3.7).



Foto: Catarina Macedo

Figura 3.7: Material didático apresentado à comunidade. Placa de Petri com as formas jovens e adulto do triatomíneo.

3.3. Atividades de Laboratório

3.3.1. Identificação dos espécimes

Os espécimes coletados foram identificados, utilizando-se a chave dicotômica segundo Lent e Wygodzinsky (1979). Parte do material foi alfinetada e mantida no Setor de Entomologia Médica e Forense do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, e parte destinada ao estabelecimento das colônias e demais estudos.

3.3.2. Estabelecimento e manutenção das colônias

Conforme os espécimes iam sendo identificados, aqueles pertencentes às mesmas espécies eram acondicionados em frascos, separados por localidade de coleta para a formação das colônias. Estas estão sendo mantidas em laboratório a uma temperatura média de 25°C, umidade relativa de 65% e alimentadas semanalmente em camundongos suíços (*Mus musculus*).

3.3.3. Identificação da presença de infecção por tripanosomas, isolamento e manutenção em meio de cultura

Os espécimes vivos recém-chegados do campo foram mantidos em posição vertical em tubos Eppendorf estéreis por aproximadamente 4h para a coleta de fezes e urina, na tentativa de averiguar não somente a presença de infecção por tripanosomatídeos, mas também isolar o parasito em meio de cultura. Não havendo sucesso com esse método, foi feita a compressão abdominal e o material (fezes e/ou urina) observado entre lâmina e lamínula ao microscópio óptico. Os espécimes mortos foram dissecados em condições estéreis, para a retirada do tubo digestivo. Este foi macerado em 500µL de solução salina e 500µL de fluorocitosina e semeados em meio de cultura. A identificação da presença de parasitos foi feita diretamente pela observação de ambos os materiais entre lâmina e lamínula ao microscópio óptico. As amostras obtidas foram mantidas em meio NNN (Novy e MacNeal, 1904; Nicolle, 1908) acrescidos de 4ml de LIT (Liver Infusion Tryptose) (Camargo, 1964) como fase líquida, suplementado com 20% de soro fetal bovino. Tão logo a cultura atingisse

a média de 5 parasitos por campo, o material era considerado bom para ser criopreservado.

As amostras foram identificadas com as iniciais do nome do Município (Orix), seguida de uma numeração crescente.

3.3.4. Tipagem molecular da cepa isolada

Cerca de 50ng de DNA genômico do isolado Orix 1, recém cultivado a partir de material criopreservado, foi submetido à amplificação de parte da região intergênica do gene de mini-exon, segundo protocolo de Souto *et al.* (1996). Foram utilizados DNA genômico dos clones Dm 28c (*T. cruzi* I), CL Brener (*T. cruzi* II), e da cepa 3663 (ZIII) e *Trypanosoma rangeli* como controles. A visualização do produto da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2%, submetido à coloração por brometo de etídio.

3.3.5. Identificação de fonte alimentar

A fonte alimentar dos triatomíneos foi identificada utilizando o teste de Imunofluorescência Indireta, ELISA (Burkot *et al.*, 1981) modificado por Duarte e Marzochi (1997).

As fezes e urina de 39 triatomíneos, colhidas através da compressão abdominal, foram diluídas em 50µl de PBS (pH 7,2 a 0,01M) e mantidas em tubos Eppendorf. Os papéis de filtro que forravam 15 frascos de transporte contendo ao todo 79 triatomíneos foram separados e armazenados em tubos Falcon. Ambos foram mantidos em freezer -20°C. Posteriormente, os papéis de filtro de cada frasco foram eluídos em 50µl de PBS durante 12 horas, e centrifugados obtendo-se assim as amostras. Dessa forma, um total de 54 amostras foram preparadas.

Para a realização dos testes, foram utilizados os antissoros dos possíveis vertebrados, incluindo o homem, e invertebrados, que podem estar atuando como fontes alimentares nas localidades estudadas. Assim, optou-se pelos seguintes: ave (*Gallus gallus*), cabra (*Capra aegagrus*), cavalo (*Equus caballus*), cão (*Canis familiaris*), gambá (*Didelphis marsupialis*), gato (*Felis domesticus*), humano (*Homo*

sapiens), réptil (*Tupinambis marianae*), roedor (*Rattus norvegicus*), tatu (*Dasypus novemcinctus*) e hemolinfa de barata (*Blatella germanica*).

A preparação dos anti-soros e a avaliação de sua titulação e especificidade foram feitas de acordo com Siqueira (1960). A titulação dos anti-soros foi: ave (1:10.000), barata (1:13.000), boi/cabra (1:15.000), cão (1:15.000), gambá (1:15.000), gato (1:12.000), humano (1:15.000), lagarto (1:14.000) e roedor (1:17.000). Os soros normais e anti-soros utilizados foram cedidos pelo Laboratório de Biologia Epidemiológica – Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP).

3.3.5.1. Sensibilização das placas

As amostras foram diluídas em Tampão Carbonato-Bicarbonato a 1:20 e distribuídas na quantidade de 50µl na placa de poliestireno de 96 poços. Cada linha da placa de poliestireno correspondia a uma amostra. As placas permaneceram em câmara úmida por duas horas em estufa a 37° C.

3.3.5.2. Adição dos antissoros

Dando prosseguimento, as placas foram retiradas da estufa e lavadas com PBS – Tween 20 a 0,05%. Os anti-soros foram diluídos a 1:2000 no Tampão de Diluição (PBS – Tween 20 acrescido de leite em pó desnatado a 1%) e 100 µl de cada foi adicionado, de maneira que todos os anti-soros interagissem com todas as amostras. As placas então sofrem nova incubação, sendo esta por 30 minutos na estufa a 37° C e lavadas como descrito anteriormente.

3.3.5.3. Adição do Conjugado

Em seguida, foi adicionado em todos os poços 100 µl do conjugado (IgG de cabra anti Ig total de coelho conjugada à peroxidase – Sigma Chemical USA) diluído em PBS – Tween 20 a 1:20000. O material foi novamente incubado a 37° C por 30 minutos e posteriormente lavado.

3.3.5.4. Revelação do Teste

Em cada poço foram colocados 100 µl de Tampão de Revelação, que consiste em 25ml de Tampão citrato-fosfato, 10 µl de peróxido de hidrogênio 30 volumes e 10 mg de OPD – Orthofenile di-amine, Sigma Chemical USA. As placas foram submetidas a um período de incubação de 15 minutos em temperatura ambiente. Com a finalidade de bloquear a reação, foram usados 50 µl de uma solução de ácido sulfúrico 1N.

3.3.5.5. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados foi feita em leitora de microplacas utilizando-se filtros de 490 e 630nm.

Foram consideradas como positivas aquelas amostras em que os valores de absorvância foram superiores aos valores de cut-off. Estes foram calculados a partir dos controles negativos somados a três desvios padrão. Como controles positivos, foram usados os soros das fontes alimentares pesquisadas. Espera-se que os controles positivos tenham leituras de absorvância superiores a 1,0.

3.3.6. Caracterização molecular de triatomíneos

Esta análise foi realizada utilizando a técnica de PCR-Multiplex de acordo com Pavan e Monteiro (2007).

Os 21 espécimes analisados foram obtidos das localidades do Caipuru e Poção todos na fase de quinto estágio e adulto.

3.3.6.1. Extração do DNA

A extração de DNA foi feita através do protocolo de Collins (1987). Um par de patas de cada triatomíneo foi retirado, transferido para tubos Eppendorf de 1,5ml e imerso em nitrogênio líquido até o seu congelamento. O material foi macerado com o auxílio de ponteiros plásticos e, posteriormente, adicionada 50 µl uma solução de NaCl a 0,08M, sacarose a 0,16M, EDTA a 0,06M, SDS a 0,5%, Tris-HCl a 0,1M, em pH 8,6. O homogenato foi incubado a 65°C por 30 minutos. Acetato de potássio a 8M foi adicionado para uma concentração final de 1M e,

após a incubação, deixado por 30 minutos à 4°C, centrifugado em temperatura ambiente por 10 minutos a 12.000g. Em seguida, o sobrenadante foi removido para outro tubo com adição de 100 µl de etanol a 95%, sendo então novamente centrifugado à 12.000g por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante o pellet foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspensão em 16 µl de Tris 10mM, EDTA a 1mM, em pH 8.

3.3.6.2. Tipagem molecular - PCR-Multiplex

Parte do gene mitocondrial citocromo *b*, foi amplificado pela técnica de PCR, para a identificação dos triatomíneos. Foram utilizados como primers quatro oligonucleotídeos, a sequência direta, universal: 5' – TTTGCTCTTCACTTCCTC – 3', e outras três para a identificação das espécies: 5' – GGRATAAAGTTTTCTGGATC – 3' (*R. robustus* II–IV), 5' – ATATCATTCTGGCTGGATA – 3' (*R. prolixus*) e 5' – CCATTGCAGCAACCCCC – 3' (*R. robustus* I). Os fragmentos obtidos foram 239 pares de bases (pb) para *R. robustus* II-IV, 285pb para *R. prolixus* e 349pb para *R. robustus* I. As reações foram processadas em termociclador programado para um passo de desnaturação à 96°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos à 94°C por 30 segundos, 48°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e por fim 10 minutos de extensão final à 72°C.

3.3.6.3. Eletroforese

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5X, corado com brometo de etídio. As amplificações foram visualizadas sob luz ultravioleta, fotografadas e comparadas com os padrões de peso molecular.

3.3.6. Identificação das Palmeiras

As palmeiras foram identificadas pela chave dicotômica de Miranda e Rabelo (2006).

3.3.7. Análise Estatística

Para comparar as distribuições de triatomíneos entre as diferentes comunidades pesquisadas e os ecótopos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis utilizando o programa GraphPad InStat v.3.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) assim como o teste chi-quadrado (χ^2). Valores foram considerados significativos com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Captura dos triatomíneos

Para a realização deste estudo foram empregados dois métodos de captura, busca ativa e busca passiva, entretanto somente através da busca passiva foi possível a captura de triatomíneos. Das 1.496 armadilhas dispostas nas nove comunidades, 197 foram positivas para a presença de triatomíneos (Fig. 4.1). Em todas as comunidades pesquisadas registrou-se a presença de triatomíneos aderidos às armadilhas, exceto na comunidade de Estrada do Laudica, onde nenhum triatomíneo foi capturado. As diferenças no número de armadilhas positivas e insetos capturados entre as comunidades não foram significativas (Kruskal-Wallis $p > 0.05$) (Tabela 4.1).



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 4.1: Aspecto geral da armadilha de Noireau evidenciando a captura de espécimes de *Rhodnius pictipes* e fauna associada (seta).

Tabela 4.1: Número de armadilhas, ecótopos e insetos capturados nas comunidades investigadas no município de Oriximiná, Estado do Pará, Brasil.

Comunidades	Armadilhas			Ecótopos			Insetos capturados
	Quantidade	Positivas	%	Investigados	Positivos	%	
Caipuru	561	103	18	157	53	34	243
Campina	32	4	12	32	4	12	9
Campos Gerais	199	2	1	62	2	3	2
Estrada do BEC	37	2	5	37	2	5	3
Estrada do Laudica	52	0	0	13	0	0	0
Estrada do Lixão	51	2	4	22	1	4	1
Paracuí	30	1	3	10	1	10	1
Poção	382	75	20	145	46	30	166
Sapucuí	152	8	5	107	8	7	17
Total	1496	197	13	585	117	20	442

Nestas comunidades foram pesquisados 24 tipos de ecótopos, dos quais 16 estavam negativos para a presença de triatomíneos e 8 estavam positivos. São eles: inajá (*Attalea marita*), mucajá (*Acrocomia sclerocarpa*), murumuru (*Astrocaryum murumuru*), tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), patauá (*Oenocarpus bataua*). Quanto à vegetação associada, estes insetos foram encontrados nas bromélias (*Bromelia* sp) epífitas de mucajá e inajá e nas abioranas (*Lucuma lasiocarpa*), neste caso mais ecléticas, não somente restrito a palmeiras (Fig. 4.2 a 4.8, Tabela 4.2).

Um total de 585 ecótopos estava distribuído entre os 24 tipos supracitados, sendo que 318 localizados na área silvestre e 267 na área rural. A presença de triatomíneos foi assinalada em 117 ecótopos, resultando na captura de 442 espécimes, 153 *Rhodnius pictipes* e 289 *Rhodnius robustus* (Tabela 4.2).

A palmeira de inajá foi o ecótopo mais pesquisado (366) por ser o de maior ocorrência nas comunidades estudadas. Nestes, foram capturados 268 *R. robustus* e 44 *R. pictipes*, evidenciando diferença significativa ($P < 0,0001$) quanto à associação desses insetos com esse ecótopo. Para os demais, não houve diferença significativa quanto à incidência das espécies. Nas palmeiras de patauá, nas bromélias associadas ao mucajá e nas abioranas observou-se

somente a presença de *R. pictipes*, enquanto que na palmeira de tucumã apenas *R. robustus* (Tabela 4.2). Entretanto, em três palmeiras de inajá e em uma bromélia epífita de inajá foram encontradas as duas espécies concomitantemente (Fig. 4.8).

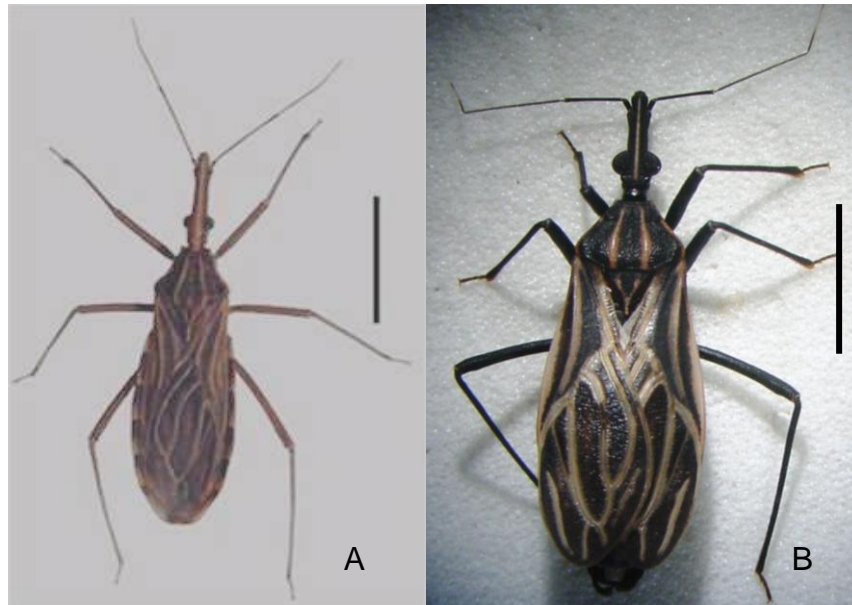


Figura 4.2: Triatomíneos capturados no município de Oriximiná (PA).
A – *R. pictipes*. B – *R. robustus*.



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 4.3: Aspecto geral da palmeira injá (*Attalea marita*), com detalhe da vegetação associada.



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 4.4: Aspecto geral da palmeira de mucajá (*Acrocomia aculeata*), com detalhe da vegetação associada.



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 4.5: Aspecto geral da palmeira de murumuru (*Astrocaryum murumuru*), com detalhe da copa e do fruto.



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 4.6: Aspecto geral da palmeira de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), com detalhe da copa, com cacho de fruto (seta) e do fruto.



Fotos: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 4.7: Aspecto geral da palmeira de mucajá (*Acrocomia aculeata*), com bromélias epíftas *Bromelia* sp.



Foto: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 4.8: Aspecto geral da palmeira de inajá (*Attalea marita*), com abiorana (*Lucumalasiocarpa*) (seta).

Tabela 4.2: Ecótopos investigados e espécimes de *Rhodnius* capturados, no município de Oriximiná, Estado do Pará, Brasil.

Tipos de ecótopos	Número de ecótopos		Número de espécimes		Total de insetos
	Investigados	Positivos	<i>R. robustus</i>	<i>R. pictipes</i>	
Palmeiras					
Açaí (<i>Euterpe oleracea</i>)	27	0	0	0	0
Bacaba (<i>Oenocarpus bacaba</i>)	9	0	0	0	0
Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	5	0	0	0	0
*Inajá (<i>Attalea marita</i>)	366	87	268	44	312
Mucajá (<i>Acrocomia aculeata</i>)	2	1	0	29	29
Mumbaca (<i>Astrocaryum gynacathum</i>)	1	0	0	0	0
Murumuru (<i>Astrocaryum murumuru</i>)	24	5	5	28	33
Pajurá (<i>Couepia bracteosa</i>)	4	0	0	0	0
Patauá (<i>Oenocarpus bataua</i>)	24	4	0	9	9
Tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i>)	10	1	1	0	1
Outros					
Abacatirana (<i>Ocotea costulata</i>)	1	0	0	0	0
Abiorama (<i>Lucuma lasiocarpa</i>)	3	1	0	8	8
Apuzeiro (<i>Ficus</i> sp)	3	0	0	0	0
*Bromélia/ Inajá	25	12	15	13	28
Bromélia/ Mucajá	16	6	0	22	22
Buraco no solo	5	0	0	0	0
Castanheira	3	0	0	0	0
Oco de árvore	19	0	0	0	0
Pedra	19	0	0	0	0
Raiz	1	0	0	0	0
Sob a casca	1	0	0	0	0
Taperebá (<i>Spondias mombin</i>)	1	0	0	0	0
Timborana (<i>Piptadenia suaveolens</i>)	1	0	0	0	0
Toca	10	0	0	0	0
Tronco	5	0	0	0	0
Total	585	117	289	153	442

* Nestes ecótopos foram encontradas infestações mistas, sendo duas palmeiras de inajá e uma bromélia associada ao inajá.

Nos ambientes silvestres, 7 (6%) ecótopos estavam positivos para *R. robustus* e 36 (30%) para *R. pictipes*, enquanto que nos ambiente rurais 68 (57%) ecótopos estavam infestados com *R. robustus* e 8 (7%) com *R. pictipes* (Fig. 4.9).

Quanto ao número de triatomíneos capturados, 21 *R. robustus* e 136 *R. pictipes* foram encontrados nos ambientes silvestres e 268 *R. robustus* e 17 *R. pictipes* nos ambientes rurais (Fig. 4.10).



Foto: Teresa Cristina Gonçalves

Figura 4.9: Armadilha de Noireau positiva para duas espécies de triatomíneos. *Rhodnius pictipes* (seta menor) e *Rhodnius robustus* (seta maior).

Considerando-se o número de ecótopos infestados entre os ambientes silvestre e rural, e a variação na incidência das espécies encontradas nos mesmos, a análise estatística dos dados pelo teste qui-quadrado foi significativa.

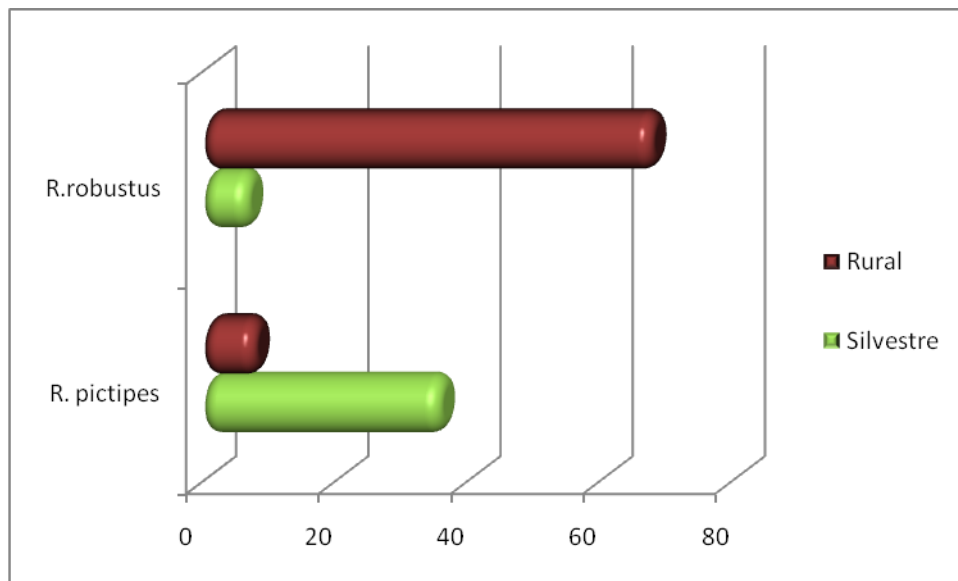


Figura 4.10: Número de ecótopos infestados por *Rhodnius robustus* e *Rhodnius pictipes* no ambiente rural e silvestre, em nove comunidades do município de Oriximiná (PA).

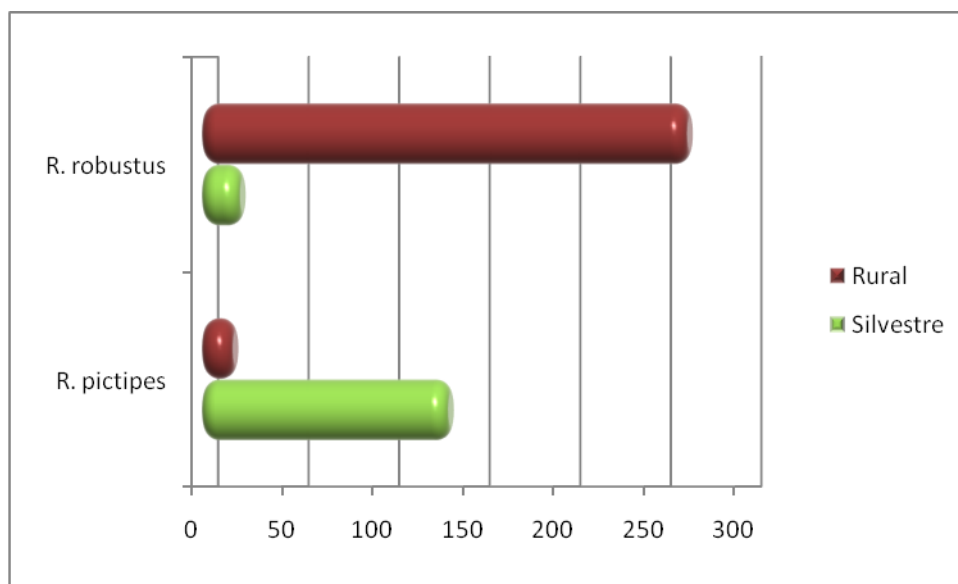


Figura 4.11: Número de espécimes de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius pictipes* capturados no ambiente silvestre e rural de nove comunidades do município de Oriximiná (PA).

Dos 442 insetos capturados, 430 eram ninfas e 12 adultos. Das ninfas, 281 pertenciam à espécie *R. robustus* e 149 à *R. pictipes*, e dos adultos 8 eram *R. robustus* e 4 *R. pictipes*. Quanto aos tipos de ambientes, no silvestre *R. robustus* apresentou apenas os estádios ninfais, enquanto *R. pictipes* foi representado por formas jovens e adultas. No ambiente rural observou-se o inverso, ou seja, *R. robustus* foi encontrado em todas as fases de desenvolvimento e *R. pictipes* somente na fase ninfal (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Espécimes de *Rhodnius* capturados nos diferentes ecótopos de acordo com as fases de desenvolvimento.

Fases de desenvolvimento	Ecótopos															
	Abiorama		Bromélia/Inajá		Bromélia/Mucajá		Inajá		Mucajá		Murumuru		Patauaá		Tucumã	
	Rr	Rp	Rr	Rp	Rr	Rp	Rr	Rp	Rr	Rp	Rr	Rp	Rr	Rp	Rr	Rp
1º	0	1	6	4	0	5	63	17	0	2	1	3	0	3	0	0
2º	0	2	5	1	0	4	62	4	0	5	1	4	0	2	0	0
3º	0	1	2	4	0	6	72	6	0	6	1	7	0	1	0	0
4º	0	2	0	2	0	5	41	9	0	12	1	2	0	1	1	0
5º	0	1	1	2	0	2	23	7	0	4	1	10	0	2	0	0
M	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0
F	0	1	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

4.2. Avaliação da infecção por tripanosomatídeos

Dos 442 insetos capturados, 172 (38,9%) foram analisados para investigar a presença de infecção por tripanosomatídeo. Desses, 30 estavam positivos representando uma taxa de infecção natural de 17,4%.

Nos demais espécimes não foi possível realizar a análise devido ao tempo que os insetos demoraram a ser analisados, uma vez que esta era processada no Setor de Entomologia Médica e Forense do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Assim, a maioria dos insetos chegou ao laboratório morto e/ou com estado nutricional debilitado, não havendo praticamente nenhum conteúdo estomacal para prosseguir com a análise.

Dos insetos analisados foi obtido um isolado de tripanosomatídeo Orix 1, classificado como *T. cruzi* Z3 pela técnica de PCR (Figura 4.11).

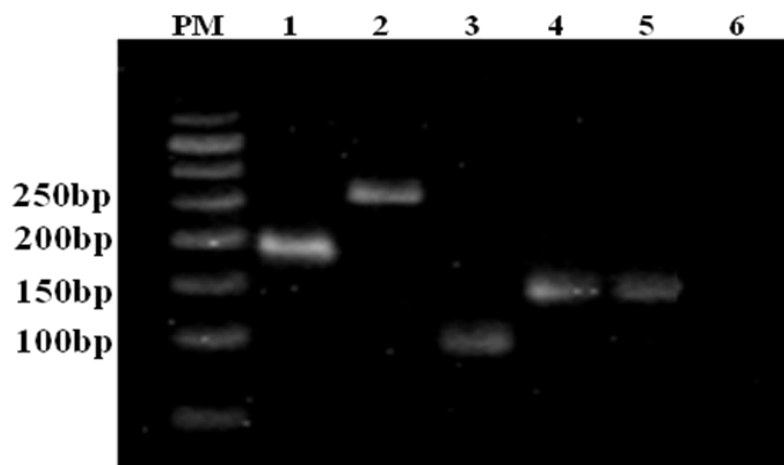


Figura 4.12: Caracterização molecular do isolado Orix 1 através da análise do segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon por eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídeo. PM – Peso molecular (50pb), 1 – amostra controle de *T. cruzi* I (Dm28c), 2 – amostra controle de *T. cruzi* II (CL Brener), 3 – amostra controle de *T. rangeli*, 4 – amostra controle de Z3 (3663), 5 – Orix 1 e 6 – controle negativo.

4.3. Identificação das fontes de alimentação

Das 54 amostras analisadas, 20 (37%) foram reativas para os seguintes anti-soros: 9 (45%) ave, 2 (10%) cavalo, 5 (25%) hemolinfa, 2 (10%) ave/ roedor e 2 (10%) cavalo/hemolinfa. As 34 amostras restantes não reagiram com nenhum dos anti-soros testados (Tabela 4.4). Os anti-soros cabra, cão, gambá, gato, humano, réptil e tatu não reagiram.

R. robustus reagiu para ave, cavalo, hemolinfa e cavalo/hemolinfa, enquanto que *R. pictipes* reagiu para cavalo, hemolinfa, ave/roedor e cavalo/hemolinfa (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Identificação das fontes alimentares pelo teste de ELISA dos espécimes de *Rhodnius robustus* e *Rhodnius pictipes*, capturados no município de Oriximiná (PA).

Espécie	Fonte Alimentar						total
	ave	cavalo	hemolinfa	ave/roedor	cavalo/hemolinfa	não reagiu	
<i>R. robustus</i>	9	1	1	0	1	21	33
<i>R. pictipes</i>	0	1	4	2	1	13	21
Total	9	2	5	2	2	34	54

Observou-se que as amostras oriundas do ambiente silvestre reagiram para os anti-soros de hemolinfa, ave/roedor e cavalo/hemolinfa. As amostras do ambiente rural foram reagentes para ave, cavalo, hemolinfa e cavalo/ hemolinfa (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Identificação das fontes alimentares pelo teste de ELISA dos espécimes capturados nos ecótopos silvestre e rural do município de Oriximiná (PA).

Ambiente	Fonte Alimentar						total
	ave	cavalo	hemolinfa	ave/roedor	cavalo/hemolinfa	não reagiu	
Silvestre	0	0	4	2	1	10	17
Rural	9	2	1	0	1	24	37
Total	9	2	5	2	2	34	54

4.4. Fauna Associada

Nas buscas passivas realizadas em todas as comunidades pesquisadas, exceto Estrada do Laudica, foi registrada a ocorrência de fauna associada de invertebrados e vertebrados, aderida à fita adesiva das armadilhas. Entre os invertebrados encontravam-se representantes do Filo Arthropoda: Classe Arachnida ordens Aranae, Acarina e Opilionida, da Classe Hexapoda ordens Dicyoptera, Coleoptera, Hetemiptera, Isoptera, Dermaptera, Hymenoptera, Diptera e Orthoptera, da Classe Diplopoda e do Filo Mollusca: Classe Gastropoda. Entre os vertebrados pequenos lacertídeos (Figura 4.2).



Foto: Cícero Mello



Fotos: Catarina Macedo

Fig. 4.13: Diferentes tipos de fauna associada, capturados na armadilha de Noireau. A – Lagarto. B – Opilião.

4.5. Caracterização Morfológica

Os espécimes adultos capturados foram identificados como *R. pictipes* e *R. robustus* com base nas características morfológicas de acordo com Lent e Wygodzinsky (1979). Entretanto, ao observar as ninfas de 4^o e 5^o estágio verificou-se uma diferença no padrão cromático. Estas ninfas apresentavam as tíbias de coloração parda uniforme, semelhante à do fêmur, diferente do padrão comum a *R. robustus* (Fig. 4.13).



Figura 4.14: Aspecto cromático de *Rhodnius robustus*. A – Aspecto geral da ninfa de 5^o estágio capturada no município de Oriximiná (PA); B – Aspecto geral da ninfa de 5^o estágio capturada em Rondônia. Escala = 1mm.

4.6. Caracterização Molecular

Visando confirmar a identificação dos espécimes de *R. robustus* foi feita a caracterização molecular pela técnica de PCR Multiplex, de triatomíneos capturados nas comunidades do Caipuru e Poção. Nas 21 amostras analisadas foi possível observar a amplificação de um fragmento do gene de citocromo *b*, de 239 pb que se refere ao grupo *R. robustus* II-IV (Fig. 4.14).

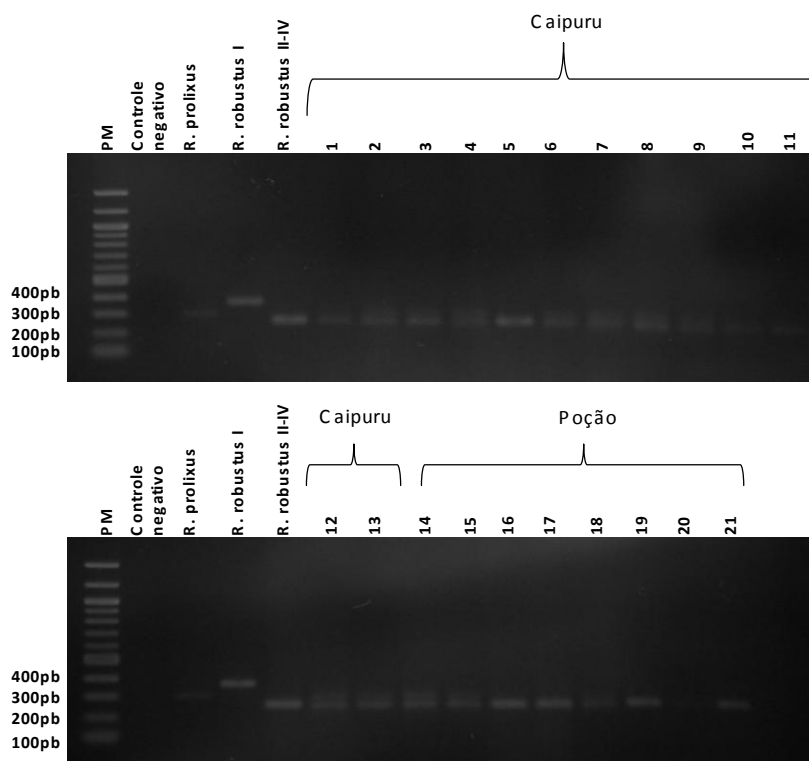


Figura 4.15: PCR Multiplex – produtos da PCR discriminados em gel de agarose 1.5 % corado com brometo de etídio. PM = peso molecular 100 bp, *R. prolixus* (285bp), *R. robustus* I (349bp), *R. robustus* II–IV (239bp). Amostras de 1 a 13 procedentes da comunidade do Caipuru e 14 a 21 da comunidade do Poção do município de Oriximiná (PA).

4.7. Levantamento de saberes sobre a ocorrência do inseto barbeiro no município de Oriximiná

Nas visitas domiciliares para investigar o conhecimento dos moradores sobre o inseto barbeiro, utilizou-se um material didático constituído de uma placa de Petri com todas as fases de desenvolvimento.

Das casas visitadas uma encontrava-se na estrada do BEC, duas no Poção, seis no Sapucú e uma na Estrada do Lixão. Em todas os moradores afirmaram conhecer o inseto barbeiro.

Entre os nove manipuladores de açaí registrados pela Vigilância Sanitária, todos processavam o fruto no quintal de suas casas, localizadas em diferentes bairros da sede do município. Conhecendo o procedimento para o preparo da polpa, questionou-se sobre a presença do inseto, e todos foram unânimes em dizer que apesar de conhecerem o inseto, o mesmo havia sido encontrado durante o procedimento de extração da polpa.

Como medida de prevenção, uma palestra sobre os aspectos da biologia do triatomíneos foi ministrada para aos manipuladores de açaí, com distribuição de encarte educativo ilustrado e placa com o ciclo do inseto. Dos oito convidados cinco estiveram presentes.

5. Discussão

Por longo período de tempo a região Amazônica ficou à margem dos estudos sobre a ocorrência de triatomíneos, uma vez que o ciclo do parasito *T. cruzi* era até então enzoótico (Coura *et al.*, 1994a). Os reservatórios, vetores e ciclos enzoóticos silvestres da infecção encontram-se naturalmente estabelecidos na região, tendo sido alvo de inúmeros estudos que sempre registraram os riscos potenciais da doença em humanos (Miles *et al.*, 1981a, b, 1983; Valente *et al.*, 1999; Coura *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2008).

O primeiro surto de doença de Chagas na Amazônia Brasileira foi descrito na cidade de Belém (PA) (Shaw *et al.*, 1969). A partir de então, vários casos esporádicos, foram relatados provavelmente por transmissão oral ou pelo contato acidental com os triatomíneos infectados (Coura *et al.*, 1994a).

De acordo com Pinto *et al.* (2008), dentre os municípios circunvizinhos apenas Santarém apresenta casos da doença. Este fato chama atenção para a necessidade de uma vigilância epidemiológica devido à intensa migração intra-regional temporária entre os dois municípios. Na região Amazônica o primeiro caso agudo foi descrito por Floch e Tasque (1941) e na Guiana Francesa por Floch e Camain (1948). Recentemente, Coura e Dias (2009) relacionaram outros casos de doença de Chagas na Amazônia. Esses dados evidenciam a necessidade de um estado de vigilância entomológica constante na região. A pesquisa sobre a fauna triatomínica em Oriximiná tem sua importância na medida em que não existem dados na literatura sobre estudos com esta abordagem neste município.

Das nove comunidades investigadas, apenas na Estrada do Laudica, todas as armadilhas foram negativas para a presença de triatomíneos e de fauna associada. Esta comunidade apresenta número reduzido de palmeiras e outros ecótopos, o que corrobora a afirmação de Abad-Franch *et al.* (2010) quando menciona que em áreas intensamente perturbadas as colônias de triatomíneos tendem a tornarem-se raras.

A escolha do ambiente silvestre e rural para a investigação da fauna triatomínica, foi reforçada pela inexistência de notificações de triatomíneos e de

casos de doença de Chagas conforme obtido na Secretaria de Saúde do município. Além disso, o estudo dos triatomíneos em seus ecótopos silvestres possibilita a introdução de novos conceitos com relação à distribuição espacial das espécies locais e os potenciais riscos epidemiológicos que representam para a população humana próxima as áreas pesquisadas (Romaña *et al.*, 1999).

O eclétismo de *R. robustus* e *R. pictipes* quanto aos ecótopos naturais relatado por Miles *et al.* (1983) e Abad-Franch *et al.* (2005) foi confirmado apenas para *R. pictipes*, encontrado em quatro espécies de palmeira (inajá, mucajá, murumuru e patauá) e em dois tipos de vegetação associada (abioramas, bromélias). Para *R. robustus* esta característica não foi tão marcante, por estar mais associado a palmeira de inajá, e em número pouco expressivo em murumuru, tucumã e bromélia em inajá.

É conhecido na literatura que as atividades humanas podem alterar a dinâmica das populações de triatomíneos (Barreto, 1976, Abad-Franch *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2007). A distribuição dos triatomíneos encontrados sugere que as mudanças provocadas pela ação humana têm impacto diferente sobre essas duas espécies. Sendo a tendência para *R. robustus* ocupar principalmente as áreas abertas e rurais, tornando-se abundantes, enquanto *R. pictipes* demonstrou-se mais associado a ambientes silvestres e fragmentos de mata, como relatado por Fé *et al.* (2009a).

A densidade das palmeiras de inajá pode estar sendo influenciada por vários fatores, dentre os quais cita-se a fragmentação da floresta, estudada por Scariot (2001) na Amazônia Central, onde foi observado que a ação antrópica influencia diretamente na distribuição dessas palmeiras. Como demonstram ser resistentes a desmatamentos e queimadas sobrevivem nas áreas abertas passando a exercer dominância sobre as outras espécies, formando grupos quase homogêneos de palmeiras (Miranda e Rabelo, 2006).

Acredita-se que a existência de grupos de palmeiras de inajá no ambiente rural favoreça o crescimento das populações de *R. robustus*, tornando por isso, a fauna desses triatomíneos mais expressiva do que na área silvestre, onde a densidade dessas palmeiras é baixa (Henderson, 1993). E por serem locais

preparados para a criação de gado, o homem não somente se insere como também propicia outras fontes de alimentação (Rojas *et al.*, 2005).

No presente trabalho, ambas as espécies de triatomíneos foram encontradas concomitantemente em três palmeiras de inajá e uma bromélia, confirmando Miles *et al.* (1983) sobre a dificuldade em se distinguir os nichos ocupados por *R. pictipes* e por *R. robustus*, uma vez que ambos podem ocupar as mesmas palmeiras.

Entre os ecótopos negativos destaca-se a palmeira de açaí e de bacaba, que não apresentam uma arquitetura favorável ao acúmulo de matéria orgânica e conseqüentemente o crescimento de vegetação associada, necessários para a formação de microhabitat adequado ao abrigo de hospedeiros/ reservatórios de *T. cruzi* e de triatomíneos, e dessa forma a colonização desses ecótopos (Lorenzo *et al.*, 2003; Diotaiuti *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2008).

O consumo do suco do açaí vem sendo associado com os casos de transmissão oral de *T. cruzi* na Amazônia (Valente *et al.*, 1999; SVS, 2008; Valente, 2008) e especula-se que os frutos possam vir do campo misturado com triatomíneos ou estes podem ser atraídos pela luz no momento do preparo dos sucos contaminando-os (Valente *et al.*, 2009). No momento da colheita o coletor que se desloca até o topo para alcançar o cacho da fruta, deixa no solo o panelo ou um saco para o acondicionamento dos cachos que serão levados até os manipuladores, para o processamento. Tendo em vista a flexibilidade do tronco desta palmeira, no ato da subida, a copa bate nas vegetações mais próximas (palmeiras, vegetação associada, bromélias) como se estivesse varrendo. Acredita-se que esta movimentação seja suficiente para deslocar alguns triatomíneos em outras palmeiras ao redor que podem vir a cair nos recipientes acima mencionados.

Da mesma forma, frutos de palmeiras comestíveis como patauá, buriti e bacaba (Ferreira, 2005) também podem estar relacionados ao mecanismo de transmissão oral, que hoje significa uma importante via geradora de morbidade e mortalidade através das formas agudas (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2006). Outra via de contaminação pode ser pelo manuseio e retirada desses frutos. Como estão em

forma de cacho, ficam muito próximos ao estipe da palmeira onde podem estar abrigados triatomíneos, assim, durante o manuseio para a retirada dos frutos deve-se ter cuidado uma vez que havendo colônia de triatomíneos pode ocorrer a contaminação da ferramenta utilizada.

Neste estudo destaca-se não apenas a importância epidemiológica como ecótopos de risco as palmeiras *Attalea maripa* (inajá) (Miles *et al.*, 1983; Romaña *et al.*, 1999; Romaña, 2007) e *Acrocomia aculeta* (mucajá) (Miles *et al.*, 1983; Barreto, 1979; Diotaiuti and Dias, 1984; Dias *et al.*, 2008), mas também *Astrocaryum murumuru* (murumuru) e *Oenocarpus bataua* (patauá), comuns na região amazônica e que foram encontradas infestadas com triatomíneos.

O índice adulto/ninfa encontrado foi 0,027, diferindo do observado em populações de *Rhodnius* que habitam palmeiras que é inferior a 1, variando entre 0,36 e 0,90 (Pizarro *et al.*, 1998, Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2004). O excessivo número de formas jovens encontrado sugere um comportamento de dispersão destes insetos em busca de novas fontes alimentares. O processo de ocupação do município leva à fragmentação do habitat provocando a expulsão de roedores e outros pequenos mamíferos o que torna escassa a fonte alimentar (Barreto, 1976). Uma consequência deste comportamento pode ser a invasão acidental de residências próximas, possibilitando a transmissão do agente etiológico da doença de Chagas (Abad-Franch, 2006), como relatado por Fé *et al.* (2009b) para *R. pictipes* e *R. robustus* na Amazônia e por Feliciangeli *et al.* (2002) para *R. robustus* na Venezuela.

A identificação do hábito alimentar é um indicativo das possíveis fontes alimentares e um dado importante para o entendimento da epidemiologia da doença de Chagas. Das 54 amostras, 34 não reagiram para nenhum dos anti-soros testados, sugerindo alimentação em outro vertebrado cujo antissoro não foi testado, ou pela ausência de conteúdo estomacal (Dias *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2008) uma vez que 97,29% dos espécimes eram ninfas de 1º, 2º e 3º estádios e no momento do exame encontravam-se em estado de jejum.

O hábito alimentar pode ser um reflexo da disponibilidade de alimento nos ecótopos, uma vez que o habitat exerce maior influência na distribuição dos

triatomíneos que a fonte alimentar (Miles *et al.*, 1981). A ornitofilia para algumas espécies pode ser um comportamento oportunista em vez de uma característica seletiva (Diotaiuti e Dias, 1987). Como relatado por Luitgards-Moura (2005b) para *T. maculata*, considerada ornitofílica, mas que prontamente se adaptou à alimentação em *Mus musculus*. Assim as concentrações de palmeiras propiciam condições para que haja o consumo de sangue de ave por *R. robustus* (Naiff *et al.*, 1998), uma vez que palmeiras são locais de refúgio e nidificação para as aves. O mesmo caráter oportunista pode ter ocorrido para alimentação em cavalo, encontrado para *R. pictipes* e *R. robustus*, conforme observado para *Triatoma vitticeps* (Gonçalves *et al.*, 2000) e *Triatoma rubrofasciata* (Lorosa *et al.*, 1998).

Hemolinfa foi a segunda fonte alimentar mais freqüente, encontrada para ambas as espécies, sugerindo que no ambiente natural triatomíneos podem na falta de outros vertebrados, recorrer a outros artrópodes (Lorosa *et al.*, 2000; Sandoval *et al.*, 2004). *R. pictipes* demonstrou a maior hemolinfagia sugerindo uma fauna mais rara e de difícil acesso.

A presença de infecção por *T. cruzi* demonstra a existência de ciclo enzoótico do parasito em *R. robustus* capturados na comunidade do Caipuru. O isolado Orix 1 foi caracterizado como Z3 utilizando como marcador molecular o gene de mini exon (Fernandes *et al.*, 1998, 2001), o que está de acordo com os resultados de caracterização de isolados na região Amazônica como Z3 (Miles *et al.*, 1978; Marcili *et al.*, 2009).

De acordo com Lent e Wygodzinsky (1979), uma das características morfológicas que diferencia *R. prolixus* e *R. robustus* é a coloração nas tíbias nas fases de 4^o e 5^o estádios. Os resultados do PCR Multiplex confirmam com sendo *R. robustus* os espécimes capturados em Oriximiná, entretanto a observação feita quanto a coloração da tíbia das ninfas de quarto e quinto estádios contraria a descrição de Lent e Wygodzinsky (1979), e assim para estes espécimes o caráter coloração das tíbias não é válido para diferenciação entre *R. prolixus* e *R. robustus*.

Em 2000, Monteiro *et al.*, utilizaram ferramentas moleculares para estudar espécimes identificados como *R. prolixus* e *R. robustus*, de diferentes regiões do

Brasil e de outros países. Os resultados revelaram a inexistência de *R. prolixus* no Brasil e uma heterogeneidade dentro do grupo de *R. robustus*, que os permitiram classificá-los em I, II, III e IV, sendo considerado um conjunto de espécies crípticas. Onde o grupo I corresponde a triatomíneos originários da região do Orinoco, Venezuela, enquanto os grupos II-IV representam aqueles da região Amazônica (Monteiro *et al.*, 2003). Com base na literatura sugere-se que os espécimes de *R. robustus* capturados, devido à localização do município de Oriximiná, sejam *R. robustus* IV.

De acordo com Monteiro (2000), a tarefa de controlar a doença de Chagas emergente na região Amazônica poderia inicialmente ser feita mediante um componente de “Informação, Educação e Comunicação”, visando à população residente. Tal programa encorajaria as pessoas a tomar medidas de prevenção e controle do triatomíneo.

No presente trabalho, a constatação do conhecimento do inseto barbeiro por parte da população apontou a necessidade de um trabalho de educação, para que medidas preventivas pudessem ser tomadas para evitar o contato da população com o vetor, minimizando as chances de infecção por *T. cruzi*. Neste sentido, foi ministrada uma palestra para os manipuladores de açaí com intuito de esclarecê-los sobre a necessidade de uma conduta adequada no manuseio e preparo deste alimento.

O município de Oriximiná embora, até o momento, sem notificação de casos da doença de Chagas merece atenção, uma vez que a presença de vetores infectados com *T. cruzi* foi constatada em palmeiras de áreas peri-urbanas, próximas à sede do município. Devido a sua importância econômica, vem se expandindo em direção ao ambiente silvestre tanto na área de extração de bauxita quanto nas proximidades da sede, o que pode favorecer o contato homem-vetor. Sendo assim, é importante a implementação de estratégias de vigilância entomológica e ações preventivas da doença de Chagas no município de Oriximiná.

6. Conclusões

- As palmeiras de patauá, tucumã, murumuru, mucajá e inajá, cujos frutos são comestíveis, estavam positivas para a presença de triatomíneos, evidenciando a necessidade de atenção no manuseio de seus frutos.
- As palmeiras de inajá encontradas com maior frequência nas áreas antropizadas, foram os ecótopos com maior taxa de infestação por triatomíneos, principalmente por *R. robustus*, apontando a necessidade de outros estudos com o intuito de conhecer o ciclo enzoótico na região.
- As palmeiras de açai e de bacaba, que vem sendo incriminadas na participação da transmissão oral, nesta região, não parecem estar envolvidas neste ciclo.
- De acordo com os resultados apontados pela análise molecular, a variação do padrão cromático dos *R. robustus* capturados em Oriximiná difere do que foi preconizado por Lent e Wygodzinsky, merecendo por isso um estudo detalhado e uma reavaliação destes conceitos.
- O encontro de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* Z3 mostra a presença do parasito na região e a necessidade de uma urgência na vigilância entomológica e epidemiológica.
- *Rhodnius pictipes* com maior incidência no ambiente silvestre, e em diferentes espécies de palmeiras, confirma seu carácter generalista.
- O resultado do hábito alimentar não foi o comumente encontrado envolvido no ciclo de transmissão, sugerindo a busca de fonte alimentar alternativa.

7. Perspectivas

- Analisar a genitália externa de machos e fêmeas, das populações de diferentes padrões cromáticos de *Rhodnius robustus*, utilizando a microscopia eletrônica de varredura.
- Estudar a morfometria geométrica das asas das populações de *Rhodnius robustus*.
- Medir o tamanho dos espécimes de *Rhodnius robustus* das populações com diferentes padrões cromáticos.
- Realizar o cruzamento das populações de *Rhodnius robustus*, com diferentes fenótipos.
- Identificação da presença de *Trypanosoma cruzi* nos triatomíneos capturados, utilizando a técnica de PCR.

6. Referências Bibliográficas

Ab'Saber AN. Bases para o estudo dos ecossistemas da Amazônia brasileira.

Estudos Avançados. 2002;16: 5-30.

Abad-Franch F, Noireau F, Paucar AC, Aguilar HVM, Carpio CC, Racines JV. The use of live-bait traps for the study of sylvatic *Rhodnius* populations (Hemiptera: Reduviidae) in palm trees. **Trans R Trop Med Hyg.** 2000; 94: 629-630.

Abad-Franch F, Palomeque FS, Aguilar HVM, Miles MA. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm trees infestations in western Ecuador. **Trop Med Int Health.** 2005a; 10(12): 1258-1266.

Abad-Franch F, Monteiro FA. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. **An Acad Bras Cienc.** 2005b; 77: 437- 454.

Abad-Franch F. Transiciones ecológicas y transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en la Amazonia. In: Abad-Franch F, Salvatella R, Bazzani R, editors. **Memorias de la 2a Reunión de la Iniciativa Intergubernamental de Vigilancia y Prevención de la Enfermedad de Chagas en la Amazonia.** 2006. Montevideo: IDRC-OPS-Fiocruz.

Abad-Franch F, Monteiro FA. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007; 102 (Suppl. I): 57-69.

Abad-Franch F, Ferraz G, Campos C, Palomeque FS, Grijalva MJ, Aguilar HM, Miles M. Modeling. Disease Vector Occurrence when Detection is Imperfect: Infestation of Amazonian Palm Trees by Triatomine bugs at Three Spatial Scales. **PLoS Negl Trop Dis.** 2010; 4(3):e620.

Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JCP, Junqueira ACV, Coura JR. Chagas Disease in Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007; 102(Suppl I): 47-55.

Bar ME, Wisnivesky-Colli C. *Triatoma sordida* Stal 1859 (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae) in Palms of Northeastern Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2001; 96(7): 895-899.

Barrett TV. Current research on Amazonian Triatominae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1988; 83 (Suppl. 1): 441-447.

Barrett TV, Guerreiro JCH. Os triatomíneos (Hemíptera, Reduviidae) em relação a Doença de Chagas na Amazônia. In: Val AL. *et al.* Bases Científicas Para Estratégia de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos e Perspectivas. 1991; pp. 119–130.

Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII. Modificações dos focos naturais da Tripanosomíase Americana e suas conseqüências. **Rev. Bras. Med. Trop.** 1967; 1: 167-173.

Barreto MP, Albuquerque DRR, Funayama GK. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVI: Investigações sobre triatomíneos em palmeiras no município de Uberaba, MG, Brasil. **Rev. Bras. Biol.** 1979; 29: 577-588.

Burkot TR, Goodman WG, De Foliartt GR. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Hyg.** 1981; 1336-1341.

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

Carcavallo RU, Curto de Casas SI, Sherlock IA, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Galvão C, Mena Segura CA, Noireau F. Distribution geographical e dispersão altitudinal. In RU Cacavallo, I Galíndez Girón, J Jurberg, H. Lent, orgs., **Atlas of Chagas' disease vector in the Americas**, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro. 1998; Vol. III, p. 747-792.

Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. **Am Journal of Trop Med and Hyg.** 1987; 37(1): 37-41.

Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2005; 38 (Sup III): 1-29.

Costa J. The sinantropic process of Chagas disease vectors in Brasil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Populations genetic, ecological and epidemiological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1999; 94 (Supl 1): 239-241.

Coura JR, Arboleda MN, Willcox HPF. Doença de Chagas na Amazônia brasileira. **Rev Soc Bras Med Trop.** 1993; 26(Supl. 2): 15-17.

Coura JR, Barrett TV, Arboleda MN. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? **Rev Soc Bras Med Trop.** 1994a; 27: 251-253.

Coura JR, Junqueira ACV, Giordano CM, Funatsu IRK. Chagas disease in the Brazilian Amazon. I – A short review. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 1994b; 36: 363-368.

Coura JR, Junqueira ACV, Boia MN, Fernandes O. Chagas Disease: from Bush to Huts and Houses. Is it the Case of the Brazilian Amazon? **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1999; 94 (Supl. 1): 379-384.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol.** 2002; 18(4): 171-6.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007; 102 Suppl 1: 113-22.

Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its Discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2009; 104 Suppl 1: 31-40.

Dall'Agnol, Rosa Costa O crescimento da Floresta. In: Amazônia: A Floresta e o Futuro. Furtado R. **Scientific American Brasil.** 2008

Dias FBS, Bezerra CM, Machado EMM, Casanova C, Diotaiuti L. Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2008; 103(8): 824-830.

Dias JCP, Schofield C. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1999; 94(Suppl. I): 103-121.

Dias JCP, Prata A, Schofield CJ. Doença de Chagas na Amazônia: esboço da situação atual e perspectivas de prevenção. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2002; 35(6):669-678.

Dias JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública.** 2007a; 23 Sup 1:S13-S22.

Dias JCP. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007b; 102(Suppl. I): 11-18.

Diotaiuti L, Dias JCP. Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1984; 79: 293-301.

Diotaiuti L, Dias JCP. Estudo comparativo do ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* alimentados em pombos ou camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1987; 20: 95-100.

Diotaiuti L, Lorenzo MG, Dias FBS, Bezerra CM, Garcia MH, Paula AS. Influência da espécie de palmeira sobre o tamanho de *Rhodnius nasutus* (Stål, 1859) provenientes de carnaúbas ou babaçus do Ceará, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2005; 38 (Suppl. I): 44.

Duarte R, Marzochi MCA. Enzyme immunoassay for the identification of food-source of hematophagous insects. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1997; 92: 273–274.

Dujardin JP, Garcia-Zapata MT, Jurberg J, Roelants P, Cardoso L, Panzera F, Dias JCP. Which species of *Rhodnius* are invading houses in Brazil? **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1991; 85: 679-680.

Fé NF, Magalhães LK, Fé FA, Arakian SK, Monteiro WM, Barbosa MG. Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do Município de Manaus, Estado do Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2009a; 42: 642-646.

Fé NF, França MS, Carvalho-Costa FA. Reassessing the entomological investigation around the first autochthonous case of Chagas disease in Western Brazilian Amazon. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 2009b; 104: 121-123.

Feliciangeli MD, Dujardin JP, Bastrenta B, Mazzarri M, Villegas J, Flores M, Muñoz M. Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera:Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? **Trop. Med. Int. Health.** 2002; 7: 280-287.

Ferreira E JL, Diversidade e Importância Econômica das Palmeiras da Amazônia Brasileira. Anais 56° Congresso Nacional De Botânica, Curitiba, Paraná. 2005.

Fernandes O, Sturm NR, Derré R, Campbell DA . The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 1998; 95:129-133.

Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonca B, Derre R, Junqueira AC, Santos LC, Sturm NR, Naiff RD, Barret TV, Campbell DA, Coura JR. _A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(1):97-9.

Forattini OP, Ferreira AO, Rocha e Silva EO, Rabello EX, Santos JLF. Aspectos Ecológicos da Tripanossomose Americana. II – Distribuição e dispersão local de triatomíneos em ecótopos naturais e artificiais. **Rev Saúde Pub São Paulo.** 1971; 5: 163-191.

Forattini OP, Ferreira OA, Silva EOR, Rabello EX. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XIV. Persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em regiões de intensa atividade agropecuária. **Rev Saúde Pub.** 1979; 13: 123-146.

Forattini OP. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Rev Saúde Públ.** 1980; 14: 265-99.

Floch H, Tasque P. Un cas de maladie de Chagas en Guyane Française. **Bull Soc Path Exot.** 1941; 40: 36-37.

Floch H, Camaim R. Deux nouveaux cas de maladie de Chagas en Guyane Française. **Bull Soc Path Exot.** 1948; 47: 22-25.

Freitas SPC, Lorosa ES, Rodrigues DCS, Freitas ALC, Gonçalves TCM. Fontes Alimentares de *Triatoma psedomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, no Estado do Ceará, Brasil. **Rev Saúde Pub.** 2005; 39: 27-32.

Gaunt MW, Miles MA. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associate trypanosomes. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2000; 95: 557-565.

Gonçalves TCM, Rocha DS, Cunha RA. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Triatominae) in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Saúde Pub.** 2000; 34: 384-52.

Gonçalves TCM. Aspectos ecológicos de *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae), com caracterização das amostras de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Kinetoplastidae) isoladas desse triatomíneo, no município de Santa Maria Madalena, Estado do Rio de Janeiro. Thesis. IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2000. 126pp.

Gordon SW, Tamariello RF, Linthicum KJ, Wirtz RA, Digoutte JP. Feeding patterns of mosquitoes collected in the Senegal River Basin. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1991; 7(3): 424-432.

Gurgel-Gonçalves R, Duarte MA, Ramalho ED, Palma ART, Romaña CA, Cuba-Cuba CA. Distribuição espacial de populações de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) em palmeiras da espécie *Mauritia flexuosa* no Distrito federal, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2004; 37(3): 241-247.

Harry M. Use of median process of the pygophore in the identification of *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae). **Ann Trop Med Parasitol.** 1993a; 87: 277-282.

Harry M. Isozymic data question the specific status of some blood-sucking bugs of the genus *Rhodnius*, vectors of Chagas disease. **Trans R Soc Hyg Trop Med.** 1993b; 87: 492-493.

Harry M, Galindez I, Cariou ML. Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease in Venezuela. **Med. Vet. Entomol.** 1992; 6: 37-43.

Henderson A, Scariot A. A flórua da Reserva Ducke, I: Palmae (Arecaceae). **Acta Amazônica.** 1993; 23: 349-369.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Cidades. [on line]. Brasília, Brasil, 2009 [capturado em 2010]. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=150530>.

Junqueira ACV, Albajar PJ, Coura JR. In: Coura JR. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. **Guanabara Koogan.** Volume 1. 2005. 1132p.

Kahn F, Corradini L. Palmeiras da Amazonia. Ed. Cendotec. Brasília: Centro Franco Brasileiro de Documentação Científica; 1994. Contato, special volume. p. 11-6.

Lainson R, Shaw JJ, Fraiha H, Miles MA, Draper CC. Chagas disease in Amazon Basin: *Trypanosoma cruzi* infections in sylvatic mammals, triatomine bugs and man in the State of Pará, north Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1979; 73: 193-204.

Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. **Bul Amer Mus Nat Hist.** 1979; 163: 127-520.

Lima MM, Sarquis O. Is *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae) changing its habitat as a consequence of human activity? **Parasitol Res.** 2008; 102: 797–800.

Lima MM, Coutinho CFS, Gomes TF, Oliveira TG, Duarte R, Borges-Pereira J, Bóia MN, Sarquis O. 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.** 2008; 79(5): 750–754.

Lorenzo MG, Minoli AS, Lazzari CR, Paula AS, Diotaiuti L. O microclima dos ecótopos naturais das espécies do gênero *Rhodnius* no município de Tocantinópolis, Estado de Tocantins, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2003; 36: (Suppl. I), 425.

Lorosa, E.S., Andrade, R.E., Serra, M.G.A., Rebelo, J.M.M., Vinhaes, M.C., Estudo das fontes alimentares através da reação de precipitina e grau de infectividade em *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) coletados na Ilha de São Luiz, Maranhão. **Entomol Vect.** 1998; 5: 241-250.

Lorosa ES, Jurberg J, Souza AL, Vinhaes MC, Nunes IM. Hemolinfa de Dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Entomol. Vect.** 2000; 7: 287-296.

Luitgards-Moura JF. Aspectos Epidemiológicos da Doença de Chagas em áreas de Colonização Agrícola no Estado de Roraima, Brasil. [Tese] **Instituto Oswaldo Cruz**. 2001; 82p. Doutorado em Biologia Parasitária.

Luitgards-Moura JF, Borges-Pereira J, Costa J, Zauza PL, Rosa-Freitas MG. On the possibility of autochthonous Chagas disease in Roraima, Amazon region, Brazil, 2000-2001. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 2005a; 47(1): 45-54.

Luitgards-Moura JF, Vargas AB, Almeida CE, Magno-Esperanca G, Agapito-Souza R, Folly-Ramos E, Costa J, Tsouris P. A *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population from Roraima, Amazon region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2005b; 47: 131- 137.

Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin e Beard CB. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. **Am J Trop Med Hyg**. 1999; 60: 377-386.

Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira ACV, Silva FM, Pinto AYN, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Camargo EP, Miles MA, Teixeira MMG. Trypanosoma cruzi in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **Int J Parasit**. 2009; 39: 615–623.

Mascarenhas BM. Triatomíneos da Amazônia: habitat e considerações comportamentais de *Rhodnius brethesi*. **Bol Mus Para Emílio Goeldi, ser Zoo**. 1991; 7: 107-116.

Miles MA. 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.** 1977; 71: 217–225.

Miles MA, Sousa A, Povoá ME *et al.* Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature** 1978; 272:819-821.

Miles MA, Souza AA, Póvoa M. Chagas disease in the Amazon Basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera: *Reduviidae*) from vicinity of Belém, Pará State, Brazil. **J Med Entomol.** 1981a; 18: 266-278.

Miles MA, Povoá MM, Sousa AA, Lainson R, Shaw JJ & Ketteridge DS. Chagas' disease in the Amazon Basin: II. The distribution of *Trypanosoma cruzi* zymodemes 1 and 3 in the Para state, North Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1981b; 75: 667-674.

Miles MA, Arias JR, Souza AA. Chagas disease in the Amazon Basin. V. Peri-urban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes* triatominae vectors of Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1983; 78(4): 391-398.

Miles MA, Feliciangeli MD, Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. **Br. Med. J.** 2003; 8: 1444–1448.

Ministério da Saúde. Diagnóstico Local do Município de Oriximiná. Projeto SIS Fronteiras. [on line] Brasília, Brasil, 2009 [capturado em 2010]. Disponível em http://portal2.saude.gov.br/portal/arquivos/.../Diagnostico_Local_Oriximina-PA).

Miranda IPA, Rabelo A. **Guia de identificação das palmeiras de um fragmento florestal urbano**. Ed: Editora da Universidade Federal do Amazonas/ Instituto de Pesquisa do Amazonas. 2006; 228p.

Moncayo A. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas Disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1999; 94(Suppl. I): 401-404.

Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2009; 104(Suppl. I): 17-30.

Monteiro FA, Barrett TV, Fitzpatrick S, Córdón-Rosales C, Feliciangeli D, Beard CB. Molecular phylogeography of the Amazonia Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Mol Ecol**. 2003; 12: 997-1006.

Monteiro FA, Escalante AA, Beard CB. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends Parasitol**. 2001; 17: 344-347.

Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Am J Trop Med Hyg**. 2000; 62: 460-465.

Monteiro PS. Dinâmica de Transmissão de Protozoários Cinetoplastidas para a População Humana de Paço do Lumiar, MA. Descrição de Rede Trófica associada com a Transmissão de *Trypanosoma cruzi*. [Tese] Universidade de Brasília. 2000. 101p. Doutorado em Ciências da Saúde.

Naiff MF, Naiff RD, Barrett TV. Vetores selváticos de doença de Chagas na área urbana da Manaus (AM): atividade de vôo nas estações seca e chuvosa. **Rev soc Bras Med Trop**. 1998; 31(1): 103-105.

Ngumbi PM, Lawyer PG, Johnson RN, Kiilu G, Asiago C. Identification of phlebotominae sandflies bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Med. Vet. Entomol.** 1992; 6: 385-388.

Nicole GL. Culture du parasite du Boutond'Orient. **CR Acad Sci.** 1908; 1:1-30.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** 2009; 15: 653-655.

Noireau F, Flores R, Vargas F. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1999; 93: 13-14.

Noireau F, Abad-Franch F, Valente SAS, Dias-Lima A, Lopes CM, Cunha V, Valente VC Palomeque FS, Carvalho-Pinto CJ, Sherlock I, Aguilar M, Steindel M, Grisard EC, Jurberg J. Trapping triatominae in sylvatic habitats. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2002; 97(1): 61-63.

Novy FG, McNeal WJ. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. **J Infect Dis.** 1904; 1: 1-30.

Pavan MG, Monteiro FA. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). **Trop Med Int Health.** 2007; 12(6), 751-758.

Pérez-Gutiérrez E, Agrelo RS, Figueroa R. Consulta Técnica em Epidemiologia, Prevenção e Manejo da Transmissão da Doença de Chagas como Doença Transmitida por Alimentos. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2006; 39(5):512-514.

Pifano F. La dinamica epidemiológica de la enfermedad de Chagas' en el Valle de los Naranjos, Estado Carabobo, Venezuela. **Arch Ven Med Trop Paras Med.** 1973; 2: 3-29.

Pinho AP, Gonçalves TCM, Mangia RH, Russel NN, Jansen AM. The occurrence of *Rhodnius prolixus* Stal, 1859, naturally infected by *Trypanosoma cruzi* in the State of Rio de Janeiro, Brazil (Hemiptera, Reduviidae, triatominae). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1998; 93: 141-143.

Pinto AYN, Valente SA, Valente VC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2008; 41(6): 602-614.

Pizarro JC, Romaña CA. Variación estacional de una población silvestre de *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Heteroptera: Triatominae) en la costa caribe Colombiana. **Bulletin de l'Institut français d' études andines.** 1998; 27: 309-325.

Rojas A, Vinhães M, Rodríguez M, Monroy J, Persaud N, Aznar C. Reunião internacional sobre vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. Implementação da iniciativa intergovernamental de vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. Relatório Técnico. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2005; 38(1): 82-9.

Romaña CA, Pizarro NJC, Rodas E, Guilbert E. Palm trees as a ecological indicators of risk areas for Chagas disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1999; 93: 594-595.

Romaña CA, Brunstein D, Collin-Delavaud A, Souza O, Ortega-Barria E. Public policies of development in Latin America and Chagas disease. **Lancet**. 2003; 362: 579.

Romaña CA. O controle da Tripanossomíase Americana requer vigilância ecológica e social da emergência do risco. In: Teixeira, A. Doença de Chagas e evolução. Editora Universidade de Brasília, Brasília. 2007. 310pp.

Rossetti DF, Toledo PM. O crescimento da Floresta. In: Amazônia: A Floresta e o Futuro. Furtado R. **Scientific American Brasil**. 2008

Savage, HM, Niebylski ML, Smith GC, Mitchell CJ, Craig GB. Host feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) at a temperate north American site. **J. Med. Entomol.** 1993; 30(1): 27-34.

Sandoval CM, Duarte R, Gutiérrez R, Rocha DS, Angulo VM, Esteban L, Reyes M, Jurberg J, Galvão C. Feeding Sources and Natural Infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Dwellings in Cesar, Colombia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 2004; 99: (2), 137-140.

Schofield, C.J., 1994. **Triatominae: Biology and Control**. Eurocommunica Publications, West Sussex, UK, 80 pp.

Schofield CJ, Dujardin JP. Theories on the evolution of *Rhodnius*. **Actual Biol**. 1999; 21: 183-197.

Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Investigação de dois surtos de doença de Chagas na região do Arquipélago de Marajó, Estado do Pará, em 2007. [online] Brasília, Brasil, 2008 [capturado em julho de 2010]. Disponível em <http://www.saude.gov.br/svs>.

Shaw JJ, Lainson R, Fraiha H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. **Rev Bras Saúde Pública.** 1969; 3: 153-7.

Silveira AC. Epidemiological and social determinants of Chagas disease and its control in the Amazon countries – Group discussion. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2007; 102 (suppl. I): 71-74.

Siqueira AF. Estudos sobre a reação da precipitina aplicada a identificação de sangue ingerido por triatomíneos. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 1960; 2: 41-53.

Soares RPP, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH. Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *R. robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Acta Tropica** 1998; 71: 285–291.

Solano P, Dujardin JP, Schofield CJ, Romana C, Tibayrenc M,. Isoenzymes as a tool for identification of *Rhodnius* species. **Res. Rev. Parasitol.** 1996; 56 (1): 41–47.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** 1996; 83(2): 141-52.

Teixeira ARL, Monteiro OS, Rebelo JM, Argañaraz ER, Vieira D, Lauria-Pires L, Nascimento R, Vexenat CA, Silva AR, Ault SK, Costa JM. Emerging Chagas disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palms in the Amazon. **Emerging Infectious Disease.** 2001; 7: 100-112.

Tonn RJ, Otero MA, Mora R, Espínola H, Carcavallo RU. Aspectos biológicos, ecológicos y distribución geográfica de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) en Venezuela. **Bol Dir Saneamiento Amb.** 1978; 18: 16-24.

Valente SAS, Valente VC, Fraiha H. Considerations on the Epidemiology and Transmission of Chagas Disease in the Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1999; 94(Suppl. I): 395-398.

Valente SAA. Estudos de microepidemias de doença de Chagas ocorridas no Pará e Amapá: análise parasitológica, sorológica e molecular. Thesis, IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2008.163pp.

Valente SAS, Valente VC, Pinto AYN, César MJB, Santos MP, Miranda COS, Cuervo P, Fernandes O. Analysis of acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2009; 103: 291-297.

Villegas J, Feliciangeli MD, Dujardin JP. Wing shape divergence between *Rhodnius prolixus* from Cojedes (Venezuela) and *Rhodnius robustus* from Mérida (Venezuela). **Infect Genet Evol.** 2002; 2(2):121-8.

Vinhaes MC, Dias JCP. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. de Saúde Pública.** 2000; 16 (Sup. 2): 13-34.

Whitlaw JT, Chaniotis BN. Palm trees and Chagas' disease in Panamá. **Am J Trop Med Hyg.** 1978; 27: 873-81.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romaña AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends Tci to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2009; 104(7): 1051-1054.