

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

CENTRO DE PESQUISA RENÉ RACHOU

Mestrado em Ciências da Saúde

Doenças Infecciosas e Parasitárias

**ECOLOGIA DE *Rhodnius nasutus* STÅL, 1859
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE) EM
PALMEIRAS DA CHAPADA DO ARARIPE,
CEARÁ, BRASIL.**

por

Fernando Braga Stehling Dias

Belo Horizonte

Fevereiro/2007

**ECOLOGIA DE *Rhodnius nasutus* STÅL, 1859
(HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE) EM
PALMEIRAS DA CHAPADA DO ARARIPE,
CEARÁ, BRASIL.**

por

Fernando Braga Stehling Dias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Pesquisa René Rachou como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências na área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Dra. Liléia Diotaiuti

Belo Horizonte
Fevereiro/2007

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

D541e Dias, Fernando Braga Stehling.
2007

Ecologia de *Rhodnius nasutus* Stål 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) em palmeiras da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil / Fernando Braga Stehling Dias. – Belo Horizonte, 2007.

xix, 101 f.: il.; 210 x 297 mm.

Bibliografia: f. 94 – 105

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

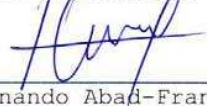
1. *Rhodnius* 2. Ecologia 3. Doença de Chagas I. Título. II. Diotaiuti, Liléia (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 3

Ata da trigésima segunda defesa de dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do aluno Fernando Braga Stehling Dias, sob a orientação da Dra. Liléia Diotaiuti.

Aos vinte sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e sete, às nove horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, o exame da trigésima segunda dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A dissertação do aluno Fernando Braga Stehling Dias intitula-se "Ecologia de *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) nas Palmeiras da Chapada do Araripe, Ceará-Brasil". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Liléia Diotaiuti CPqRR/FIOCRUZ (orientadora e presidente da banca), Dr. Fernando Abad-Franch - ILMD/Fiocruz(membro titular), Dr. João Carlos Pinto Dias - CPqRR/Fiocruz(membro titular) e Dr. Marcos Horácio Pereira UFMG (membro suplente). Após argüir o aluno e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização na apresentação dos dados, a Banca Examinadora assim se pronunciou: De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, o aluno foi considerado aprovado. Uma vez encerrado o exame, eu, Liléia Diotaiuti, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, vinte e sete de fevereiro de dois mil e sete.


Dra. Liléia Diotaiuti


Dr. Fernando Abad-Franch


Dr. João Carlos Pinto Dias

A presente dissertação foi desenvolvida no laboratório da 20ª Regional da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Liléia Diotaiuti, e no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, com as colaborações do Dr. Alvaro José Romanha e Dr. Evandro Marques de Menezes Machado, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ.

“Faça da interrupção um novo caminho, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro...Não pague sua vida nem sua carreira pelo dinheiro. Ame seu ofício com todo o coração. Persiga fazer o melhor. Seja fascinado pelo realizar, que o dinheiro virá como consequência. Pense no seu país, porque principalmente hoje pensar em todos é a melhor maneira de pensar em si...Fomos criados para construir pirâmides e versos, descobrir continentes e mundos e caminhar sempre com um saco de interrogações na mão e uma caixa de possibilidades na outra... Trabalhe em algo que você realmente goste e você nunca precisará trabalhar na vida”.

Nilzan Guanaes

Aos meus pais,
Marco Aurélio e Maria Helena.

AGRADECIMENTOS



À Dra. Liléia Diotaiuti, a grande idealizadora deste projeto, pela orientação, amizade, confiança e constantes ensinamentos. Uma guerreira nos trabalhos de campo e acima de tudo, pela paciência comigo!

Ao Dr. Evandro Marques de Menezes Machado pelos ensinamentos em todas as etapas em que trabalhamos com *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*, e principalmente, pelo exemplo de profissionalismo.

À Cláudia Mendonça Bezerra pelos bons momentos que passamos juntos no Ceará e por todo o apoio e esforço conseguido para mim junto a Secretaria de Saúde do Ceará.

Ao Dr. Alvaro José Romanha por ter aberto as portas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do CPqRR, permitindo a caracterização das cepas de tripanosomatídeos, e por nos ceder às cepas padrões.

Ao Dr. João Carlos Pinto Dias pelo exemplo de vida e dedicação a doença de Chagas. Pelas boas conversas, conselhos, agradável convívio e sugestões na revisão desta dissertação.

Ao Dr. Fernando Abad-Franch pela belíssima discussão, sugestões e críticas, o que enriqueceu muito esta dissertação.

Ao Dr. Marcos Horácio Pereira e Dr. Edelberto dos Santos Dias, pelas valiosas críticas e sugestões em minha qualificação.

Ao Dr. Nicolás Jaramillo pelas ajudas nas análises morfométricas.

À SUCEN-SP e ao Cláudio Casanova pela colaboração nos estudos de precipitina.

A todos os moradores das localidades trabalhadas que permitiram a execução deste trabalho em suas propriedades. Pela gentileza, receptividade, simplicidade e pelos almoços diários.

Aos senhores Bonifácio, Bosco, Galego e José que mostraram ser fortes e guerreiros no manuseio da moto-serra e dissecação das palmeiras.

Ao Azevedo Quirino de Souza e Antônio Pereira. Dois grandes amigos que estiveram junto a mim durante quase todos os dias no campo. Por me socorrer nos momentos difíceis e pela agradável companhia nos finais de semana, sempre acompanhada de uma “Brahma” gelada.

Ao “grande” Antônio Lemos e ao Francisco Chagas pela ajuda árdua e diária nas coletas dos “procotós”.

A todos os funcionários da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará dos municípios de Crato e Juazeiro do Norte, pela agradável convivência durante três semanas que estive morando no alojamento da Secretaria.

Aos motoristas da Secretaria da Saúde do Ceará que estiveram longe de suas famílias permitindo a realização deste trabalho.

Ao IBAMA-ARARIPE em nome do prof. Jackson Antero, pelo apoio, dicas dos locais de coletas e constantes ajudas.

À Maria Inês Mascarenhas pela eficiência nas infinitas ajudas dos serviços de secretaria e formatação deste trabalho.

À Grasi e Thessa pela amizade e por ceder espaço do seu valioso tempo cuidando das minhas colônias nos períodos em que estive ausente.

Aos amigos do Laboratório de Triatomíneos: Ademilson, Alessandra, Alexandre Silva, Ana Vitta, Angélica, Auffy, Carlota, Denise, Diogo, Gina, Ivan, JP, Kelly,

Letícia, Marcelo, Marcos, D. Maria, Raquel, Rita, Sílvia Basques, Sílvia Ermelinda, Theo e Violeta pelo convívio diário, amizade.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia Médica: Ana Bahia, Carol's, Bruno, Gustavo, Lili, Lú, Nágila, Paulo, Rafa e Tati pela amizade e pela companhia nas “cervejadas” durante a semana.

À Pós-Graduação do CPqRR, especialmente à Cris, Neyde, Andréa, Dra. Virgínia Schall e Dra. Cristiana Brito

À Ana Carolina Lustosa pelas ajudas nas análises estatísticas.

Aos meus pais, Marco Aurélio e Maria Helena, e irmãos, Maurício, Rodrigo e Cristiane, por tudo!

À vovó Inhá, pelas constantes orações.

À FAPEMIG, CNPq e CPqRR, pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Muito obrigado!!

FERNANDO BRAGA

RESUMO

Considera-se que *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 seja um triatomíneo restrito ao domínio da caatinga. Entretanto, seus limites não estão bem reconhecidos. O objetivo do presente trabalho foi identificar qual espécie de triatomíneo ocorre ao sul do estado do Ceará, nas palmeiras da Chapada do Araripe, Brasil e sua importância na transmissão local pelo *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. Embora esteja incluída no contexto da caatinga, esta região é considerada uma área com vegetação mista de cerrado e Mata Atlântica. Sendo as diversas espécies de palmeiras relatadas como ecótopo para triatomíneos do gênero *Rhodnius*, foram trabalhadas cinco espécies de palmeiras, num total de 10 exemplares para cada espécie, a saber: babaçu (*Attalea speciosa*), buriti (*Mauritia flexuosa*), carnaúba (*Copernicia prunifera*), catolé (*Syagrus oleracea*) e macaúba-barriguda (*Acrocomia intumescens*). A única espécie de triatomíneo encontrada foi *R. nasutus*, e o índice de infestação global foi de 86%. No Ceará, esta espécie tem sido encontrada freqüentemente no peridomicílio e intradomicílio, demonstrando significativa importância na DC. O índice de infecção encontrado pelo *Trypanosoma cruzi* foi de 16,8% e, pela primeira vez na literatura, relatamos a ocorrência do *Trypanosoma rangeli* no estado do Ceará, com índice de infecção natural de 7,7%, nos insetos analisados. Os tripanosomatídeos foram caracterizados molecularmente, confirmando os achados microscópicos, sendo as cepas de *T. cruzi* pertencentes ao grupo I, característico de cepas circulantes do ambiente silvestre. Estudos da reação de precipitina sugerem que as principais fontes alimentares do *R. nasutus* são ave e gambá. As árvores UPGMA geradas pela análise morfométrica apontam o grupo de insetos dos buritis como o mais distante geneticamente, o que pode estar relacionado ao isolamento geográfico deste grupo de insetos aos demais. Nossos resultados associados aos enormes palmeirais encontrados na região da Chapada do Araripe fazem desta uma importante região endêmica da tripanosomíase americana silvestre.

ABSTRACT



Rhodnius nasutus Stål, 1859 is considered a triatomine restricted to “caatinga” regions. However, their occurrence restrictions are still unknown. The purpose of this work was to identify which triatomine species occurs in the south of Ceará state, in palm trees of Chapada do Araripe, Brazil and its importance in the local transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. In spite of being included in the “caatinga” environment, this region is considered an area with a mixed vegetation of “cerrado” and “Mata Atlântica” (Atlantic Forest). As the most diverse species of palm trees are reported as ecotopes for triatomines from the genus *Rhodnius*, were studied five species of palm trees, with a total of 10 specimens of each species, as follows: “babaçu” (*Attalea speciosa*), “buriti” (*Mauritia flexuosa*), “carnaúba” (*Copernicia prunifera*), “catolé” (*Syagrus oleracea*) and “macaúba-barriguda” (*Acrocomia intumescens*). The only triatomine species found was *R. nasutus*, and a global infestation rate was 86%. In Ceará, this species has often been found in the peridomicile and intradomicile, playing a significant role in Chagas disease. *Trypanosoma cruzi*’s infection rate was 16.8% and, for the first time in the literature, *Trypanosoma rangeli* was reported to occur in the state of Ceará, with a natural infection rate of 7.7%, in the insects analyzed. Trypanosomatids were molecularly characterized, corroborating microscopic findings, with *T. cruzi* strains belonging to group I, characteristic of circulating strains from a sylvatic environment. Studies on precipitin reaction suggest that the most important food resources of *R. nasutus* are birds and opossums. UPGMA trees generated by morphometric analysis point to a group of insects of “buritis” as the most distant ones, which may be related to the geographic isolation of this group of insects compared to the other ones. Our results associated with large areas of palm trees found in the region of Chapada do Araripe make this an important endemic region of sylvatic American trypanosomiasis.

LISTA DE ABREVEATURAS

APA – Área de Preservação Ambiental

°C – Grau Celsius

cm - centímetro

DC – doença de Chagas

DNA – Ácido desoxiribonucleico

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos

FLONA – Floresta Nacional

g – força da gravidade

M – moles

mM - milimolar

μl – microlitro

GPS – Global Positioning System

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Nacionais Renováveis

KCl – Cloreto de Potássio

LIT – Liver infusion tryptose

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min - minuto

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm - nanômetro

pb – pares de bases

PCDCh – Programa de Controle da Doença de Chagas

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RAPD - Random amplified polymorphic DNA

seg - segundo

Taq – *Thermus aquaticus*

Tris – Tris (hidroximetil) amino metano

U - unidade

UR – umidade relativa

V – volt

v/v – volume por volume

LISTA DE FIGURAS

1.	Distribuição geográfica dos países endêmicos para a doença de Chagas	22
2.	Mapas com a distribuição de triatomíneos no Brasil	28
3.	Localização das bacias hidrográficas brasileiras	32
4.	Mapas de distribuição de espécies de palmeiras	33
5.	Carnaúba (<i>Copernicia prunifera</i>)	34
6.	Macaúba-barriguda (<i>Acrocomia intumescens</i>)	35
7.	Babaçu (<i>Attalea speciosa</i>)	35
8.	Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i>)	36
9.	Catolé (<i>Syagrus oleracea</i>)	36
10.	Mapa político do estado do Ceará	42
11.	Mapa esquemático da região da Chapada do Araripe	43
12.	Vista dorsal da asa de um triatomíneo adulto mostrando os pontos de referência utilizados na morfometria	53
13.	Fêmeas de <i>R. nasutus</i> procedentes das palmeiras da Chapada do Araripe	58
14.	Gráfico da densidade populacional de triatomíneos por estágio evolutivo e espécie de palmeira	60
15.	Gráfico da densidade populacional de triatomíneos por espécie de palmeira	60
16.	Amplificação via PCR para caracterização das cepas de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i>	64
17.	Formas evolutivas de <i>Trypanosoma. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> em meio de cultura LIT	65
18.	Gráfico representativo da temperatura na axila foliar das cinco espécies de palmeiras e temperatura do ambiente	70
19.	Fauna associada as palmeiras da Chapada do Araripe, Brasil	72
20.	Distribuição dos <i>R. nasutus</i> analisados em relação ao Tamanho Centróide	73
21.	Mapa fatorial da análise discriminante	75
22.	Árvore UPGMA obtida a partir das distâncias de Mahalanobis	76
23.	Árvore UPGMA obtida a partir das distâncias Euclidianas	76

LISTA DE TABELAS

1.	Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos estudos da variabilidade do gene de mini-exon do <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
2.	Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nos estudos da variabilidade do gene de mini-exon do <i>Trypanosoma rangeli</i>	50
3.	Dados de infestação de triatomíneos por espécie de palmeira	57
4.	Quantidade de triatomíneos coletados de acordo com estágio evolutivo e espécie de palmeira	59
5.	Diferenças estatísticas encontradas entre as cinco espécies de palmeiras pesquisadas com relação à densidade triatomínica	61
6.	Número de palmeiras infestadas, triatomíneos capturados, examinados, infectados com tripanosomatídeos, e percentual de infecção, por espécie de palmeira	62
7.	Origem e caracterização molecular das cepas isoladas de <i>T. cruzi</i> e de <i>T. rangeli</i>	66
8.	Fonte alimentar identificada pela reação de precipitina em <i>Rhodnius nasutus</i>	68
9.	Dados microclimáticos das palmeiras da Chapada do Araripe e do ambiente	69
10.	Frequência das fontes alimentares observadas nas diferentes espécies de palmeiras	73
11.	Diferenças estatísticas encontradas em relação ao tamanho centróide nas análises morfométricas.	78

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	xv
Lista de Figuras	xvi
Lista de Tabelas	xviii
1-Introdução	21
1.1 – Doença de Chagas	22
1.2 – Vetores da doença de Chagas	24
1.2.1 – Sistemática e Evolução	24
1.2.2 – Ecótopos de <i>Rhodnius</i>	25
1.2.3 – <i>Trypanosoma rangeli</i> e linhagens de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.2.4 – Taxonomia de <i>Rhodnius</i>	26
1.2.5 – Ecologia de <i>Rhodnius nasutus</i> e <i>Rhodnius neglectus</i>	27
1.3 – Área de estudo	31
2-Objetivos	38
2.1 – Objetivo geral	39
2.2 – Objetivos específicos	39
3-Metodologia	40
3.1 – Procedência e coleta dos triatomíneos	41
3.2 – Manutenção das colônias	45
3.3 – Exame dos triatomíneos	46
3.4 – Cultivo de tripanosomatídeos	47
3.5 – Caracterização molecular das cepas de tripanosomatídeos	48
3.6 – Reação de Precipitina	51
3.7 – Caracterização microclimática das palmeiras	52
3.8 – Morfometria geométrica	53
3.9 – Análises estatísticas	55
4 – Resultados	56

4.1 – Infestação das Palmeiras	57
4.2 – Densidade Populacional	58
4.3 – Exame de triatomíneos / índice de infecção por tripanosomatídeos	62
4.4 – Caracterização molecular das cepas de tripanosomatídeos	63
4.5 – Reação de precipitina	67
4.6 – Microclima	69
4.7 – Fauna associada aos triatomíneos nas palmeiras	71
4.8 – Morfometria geométrica das asas	73
5 – Discussão	77
Doença de Chagas no Ceará	78
Métodos de coleta dos triatomíneos	79
Variação cromática em <i>R. nasutus</i>	80
Palmeiras como ecótopos para <i>R. nasutus</i>	81
Preferências alimentares dos triatomíneos	86
<i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i>	87
Morfometria	89
Consideração Epidemiológica	90
6 – Conclusões	91
7 – Referências Bibliográficas	94
9 – Anexos	107
9.1 – Autorização do IBAMA para derrubada das palmeiras	108
9.2 – Autorização do IBAMA para coleta e transporte de triatomíneos	109
9.3 – Ficha de campo utilizada na coleta dos triatomíneos	110
9.4 – Protocolo utilizado para a extração do DNA genômico dos tripanosomatídeos pela técnica de fenol-clorofórmio álcool-isoamílico	111
9.5 – Soluções utilizadas em géis de poliacrilamida	112
9.6 – Dados do PCDCh dos municípios trabalhados da Chapada do Araripe, Ceará.	113
9.7 – Manuscrito aceito para publicação	119

1. INTRODUÇÃO



1.1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC), também conhecida como Tripanossomíase Americana, é considerada a mais importante infecção parasitária na América Latina em termos de impacto econômico e social (World Bank, 1993), e um dos principais problemas de saúde pública no continente Americano (WHO, 2003). Primitivamente, a DC era considerada uma enzootia, e a medida em que o homem entrou em contato com os focos naturais da doença e modificou o ambiente, passou a ser considerada uma zoonose (Barretto, 1979).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2003), trata-se de uma doença tropical infecciosa que acomete cerca de 11 milhões de pessoas, e aproximadamente 100 milhões de pessoas vivem em área de risco, podendo se infectar com o agente etiológico da DC, o *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastidae e família Trypanosomatidae. No Brasil, estima-se que aproximadamente quatro milhões de pessoas estejam infectadas pelo protozoário (Dias, 2000). Esta doença possui uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrados os seus vetores desde os Estados Unidos até o sul da Argentina (Lent & Wygodzinsky, 1979) (figura 1).



Figura 1: Distribuição geográfica dos países endêmicos para a doença de Chagas. Fonte: OMS, 1996.

A DC é caracterizada por um quadro clínico agudo sintomático ou assintomático que tende a evoluir ao quadro crônico. Na fase crônica da doença, indivíduos infectados podem continuar a apresentar a forma indeterminada (assintomática), ou desenvolver sintomas, caracterizando as formas cardíacas, digestivas (megacólon e/ou megaesôfago) ou até mesmo a forma nervosa. Dois ou mais tipos destas formas podem ocorrer em um mesmo indivíduo (Ferreira et al, 1997).

Vários são os mecanismos de transmissão da DC. A principal forma de transmissão é a vetorial, sendo responsável aproximadamente por 80% dos casos da doença de humanos (Dias, 1987; Schofield, 1994). Entretanto, outras vias de infecção são relatadas, como a transfusional, congênita, transplantes de órgãos, ingestão de substância infectada e acidentes laboratoriais (Moncayo, 1992; Schofield, 1994; Dias, 1987).

Ainda não há vacina nem tratamento específico e eficaz para a DC. Atualmente, o Benzonidazol (Rochagan[®]) e o Nifurtimox (Lampit[®]) são as drogas de escolha no tratamento da doença. Nos casos agudos da doença, estas drogas levam à cura parasitológica de mais de 80% dos pacientes tratados, entretanto, sua eficácia varia de acordo com a área geográfica, provavelmente, devido às diferenças de suscetibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi* às drogas. Nos estágios crônicos da doença, no entanto, há uma limitação da eficácia destes medicamentos por possuírem elevados efeitos tóxicos ao paciente, o que pode acarretar a interrupção do tratamento. A suscetibilidade das diferentes cepas de *T. cruzi* a estas drogas também é apontada como um fator limitante para a cura da DC nos estágios crônicos (Urbina & Docampo, 2003).

1.2. VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS

1.2.1 Sistemática / Evolução Triatominae

Os vetores da DC são insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae. Até o momento, seis tribos e 138 espécies de triatomíneos foram catalogadas (Galvão et al, 2003; Forero et al, 2004; Poinar, 2005; Galvão & Angulo, 2006; Costa, Argolo, Felix, 2006; Costa & Felix, 2007). A grande maioria destas espécies ocorre nas Américas.

Os triatomíneos diferem dos demais insetos da família Reduviidae pelo seu hábito hematofágico obrigatório em todas as fases evolutivas, embora já tenha sido observado o exercício do canibalismo, do predatismo e do coprofagismo (Sherlock, 1979; Lent & Wygodzinsky, 1979; Salvatella et al, 1994). Evolutivamente, acredita-se que a hematofagia dos triatomíneos seja um evento recente e tenha se derivado a partir de diferentes reduviídeos predadores, através de uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, comportamentais e demográficas, sendo assim, um grupo polifilético. (Schofield, 1994). Lent & Wygodzinsky (1979) a partir de dados morfológicos comparados a outros hemípteros, propõem como monofilética a subfamília Triatominae. Estudo utilizando análise cladística de triatomíneos, Paula et al. (2005), analisando os fragmentos 16S de rDNA, concluem como polifilética a subfamília Triatominae, mas os autores chamam a atenção para a importância do grupo externo, que poderá definir e alterar o resultado da análise. Assim sendo, a sistemática filogenética da subfamília Triatominae ainda não foi totalmente esclarecida.

1.2.2. Ecótopos de *Rhodnius*

Três são os principais gêneros de triatomíneos de importância epidemiológica: *Triatoma* Laporte, 1832, *Panstrongylus* Berg, 1879 e *Rhodnius* Stål, 1859. Os triatomíneos abrigam os mais diversos ecótopos, como palmeiras, tocas de animais, ocos de árvores, fendas sob rochas, locas de pedras, ninhos de aves, bromélias epífitas, dentre outros (Lent & Wygodzinsky, 1979). No caso de *Rhodnius*, diversos autores (Gamboa, 1961; Pifano, 1973; Barretto, 1979; Lent & Wygodzinsky, 1979; Diotaiuti & Dias, 1984; Romaña et al., 1999; Teixeira et al., 2001; Abad-Franch et al., 2001; Gurgel-Gonçalves et al., 2004a; Gurgel-Gonçalves et al., 2004b) têm relatado as palmeiras como ecótopo natural destes triatomíneos. Estima-se que o microclima tenha papel importante para o estabelecimento de uma estável relação *Rhodnius* / palmeira (Lorenzo et al., 2003), talvez com relevante impacto no processo de adaptação das espécies deste gênero às diferentes palmeiras (Diotaiuti et al., 2005).

1.2.3. *Trypanosoma rangeli* e linhagens de *Trypanosoma cruzi*

Os triatomíneos também são vetores de um outro tripanosomatídeo, o *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920, principalmente espécies pertencentes ao gênero *Rhodnius* (D'Alessandro & Hincapie, 1986). O único relato de infecção natural por *T. rangeli*, inclusive em glândulas salivares, por triatomíneos de outros gêneros foi em *Triatoma dimidiata* Latreille, 1811 (D'Alessandro & Saraiva, 1992). Relatos sobre infecção natural de *Rhodnius* por *T. rangeli* já foram descritas em várias regiões do Brasil e outros países da América Latina (Barrett & Oliveira, 1977; D'Alessandro & Hincapie, 1986; Diotaiuti et al., 1992; Ramirez et al., 1998; Feliciangeli et al., 2002; Urrea et al., 2005; Calzada et al., 2006). No Brasil, *T. rangeli* foi descrito pela primeira vez por Deane (1958) em *Didelphis marsupialis*, no Estado do Pará. Sua ocorrência também já foi assinalada no Estado da Bahia, em *R. domesticus* Neiva & Pinto (1923); no Estado do Amazonas, Santa Catarina e Minas Gerais (Barrett & Oliveira, 1977; Miles et al., 1983; Steindel et al., 1991; Ramirez et al., 1998). O *T. rangeli* é

transmitido ao hospedeiro vertebrado através da saliva dos triatomíneos infectados, no momento do repasto sangüíneo. Nestes animais, o *T. rangeli* não é patogênico, apresentando parasitemia baixa e de curta duração. A distribuição do *T. rangeli* muitas vezes sobrepõe-se geograficamente com *T. cruzi*, permitindo a ocorrência de infecções simples ou mistas tanto em hospedeiros vertebrados, quanto nos triatomíneos (D'Alessandro, 1976). Em ensaios sorológicos, devido às semelhanças antigênicas entre *T. cruzi* e *T. rangeli*, podem apresentar reação cruzada (Grisard et al., 1999). Como diagnóstico diferencial, a técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é recomendada devido a sua especificidade e sensibilidade (Grisard et al., 1999).

Utilizando a técnica da PCR a partir da análise do gene do mini-exon, Souto et al (1996) conseguiram separar duas principais linhagens filogenéticas de *T. cruzi* que posteriormente foram denominadas *T. cruzi* I, associada ao ciclo silvestre e *T. cruzi* II, associada ao ciclo doméstico (Anonymous, 1999).

1.2.4. Taxonomia de *Rhodnius*

Devido às grandes semelhanças morfológicas existentes entre espécies do gênero *Rhodnius*, a taxonomia deste gênero é bastante discutida por diversos autores, principalmente entre *R. prolixus* e *R. robustus* Larrousse, 1927, devido ao fato de ocorrer em áreas de simpatria e semelhança no padrão cromático. Este fato levou Barrett (1988) a agrupá-las, juntamente com *R. nasutus* e *R. neglectus*, em um complexo de espécies denominado “Complexo *R. prolixus*”.

No entanto, várias ferramentas têm sido empregadas com êxito na diferenciação das espécies deste complexo, como morfologia geral (Lent & Wygodzinsky, 1979), morfometria (Harry, 1994) morfologia da genitália masculina (Lent & Jurberg, 1969; Harry, 1993), estudo bioquímico de isoenzimas (Solano et al., 1996), estudo protéico da saliva (Soares et al., 2000), estudos citogenéticos (Schreiber et al., 1972; Perez et al., 1992; Panzera et al., 1996) e moleculares, como RAPD (Garcia et al., 1998). No entanto, a grande dificuldade taxonômica do grupo refere-se à diferenciação

entre *R. robustus* e *R. prolixus*. Isto é devido às grandes semelhanças cromáticas e sobreposição de áreas de distribuição geográfica, coincidentes com florestas tropicais e subtropicais úmidas, apesar de *R. prolixus* ocorrer nos limites mais ao norte e *R. robustus* estender-se para áreas amazônicas mais ao sul (Schofield & Dujardin, 1999). Monteiro et al. (2003) analisaram seqüências de DNA mitocondrial (mtDNA) de 12 populações de *R. prolixus* e 14 populações de *R. robustus*, inclusive espécimes de *R. robustus* procedentes das localidades muito próxima às localidades tipo (local de descrição da espécie por Larousse, na Amazônia brasileira, próximo a foz do rio Tefé, e na região de Cayenne, Guiana Francesa). Apesar da grande controvérsia taxonômica entre estas duas espécies, foi possível verificar que *R. prolixus* e *R. robustus* são espécies distintas. *R. prolixus* mostrou ser uma espécie monofilética enquanto os espécimes de *R. robustus* analisados da região Amazônica formaram três clados na árvore filogenética devido às diferenças nas seqüências do mDNA, constituindo um grupo parafilético (Monteiro et al, 2003).

1.2.5. Ecologia de *R. nasutus* e *R. neglectus*

Muitas espécies de aves que habitam palmeiras concomitantemente com os triatomíneos atuam como agentes dispersores de ovos, ninfas, e até mesmo o inseto adulto (Lent & Wygodzinsky, 1979). Espécies do gênero *Rhodnius* também podem ser capazes de colonizar o ambiente artificial. *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 é o principal vetor da doença de Chagas na Colômbia, Venezuela e alguns países da América Central (Schofield, 1994). Outras espécies de importância epidemiológica secundária (Silveira & Rezende, 1994), como o *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 e *R. neglectus* têm sua presença constante no ambiente artificial, especialmente no peridomicílio (Alencar, 1987).

Segundo Carcavallo et al (1998), Lent & Wygodzinsky (1979) e Schofield (1994), o *R. neglectus* é uma espécie com distribuição geográfica coincidente à área de cerrado no Brasil, e o *R. nasutus* à caatinga (figura 2).



Figura 2: Mapas mostrando a distribuição de triatomíneos no Brasil. (A) *R. nasutus*; (B) *R. neglectus*, segundo Carcavallo et al., 1998.

R. neglectus é uma espécie de triatomíneo com ampla distribuição geográfica, abrangendo no Brasil os Estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco e São Paulo (Galvão et al, 2003). Geralmente são encontrados em babaçus (*Attalea speciosa* Mart. ex. Spreng.), macaubeiras (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.), buritis (*Mauritia flexuosa* L.f.) e ariruris (*Attalea butyracea* Mutis ex L.f.) (Diotaiuti & Dias, 1984; Diotaiuti et al, dados não publicados). Às vezes estão associados a ninhos de aves (Barretto, 1979). É um importante vetor do *T. cruzi*, pois tem sido encontrado naturalmente infectado no ambiente silvestre, no peridomicílio e no intradomicílio (Lent & Wygodzinsky, 1979; Barretto, 1979; Diotaiuti & Dias, 1984; Teixeira et al., 2001; Gurgel-Gonçalves et al., 2004b).

No Estado do Maranhão, Teixeira et al. (2001) admitem a hipótese de *R. neglectus* deixarem as palmeiras à noite, atraídos pelas luzes dos domicílios, para exercerem a hematofagia e em seguida retornarem às palmeiras. Segundo estes mesmos autores, entretanto, esta observação necessita maiores investigações. Este comportamento dos triatomíneos já foi confirmado para *R. brethesi* Matta, 1919 na região amazônica por Coura et al (1994) e

parece também ser usual de *R. robustus* na Amazônia Equatoriana (Aguilar et al., 1999) e de *R. nasutus* no Ceará (Sarquis et al, 2004)

A infestação de palmeiras do cerrado por *R. neglectus* foi extensamente estudada por Barretto (1979) nos estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo, estando associada, principalmente, à palmeira babaçu, buriti, macaúba (*Acrocomia sclerocarpa* Mart.) e aricuris. Sua distribuição atinge limites ao norte de Tocantins (Diotaiuti, Silveira, Elias, 1984), alcançando Paço do Lumiar, situada na Ilha de São Luis, Maranhão (Teixeira et al., 2001), provavelmente seguindo a rota dos grandes palmeirais originados na região do Bico de Papagaio, Tocantins (Diotaiuti et al., 1985).

Recentemente, inserido no contexto da caatinga, mas a uma altitude de 500-800 metros, foi observada a infestação de *R. nasutus* em babaçus que ocorrem na Serra de Meruoca, norte do Ceará, região de maior umidade, considerada como remanescentes da Mata Atlântica do período que havia continuidade entre a mesma e a Amazônia (Cavalcante, 2005). Muito proximamente, e separada quase que apenas pela altitude, encontram-se a 90 metros de altitude grandes carnaubais da caatinga, também infestados pelo *R. nasutus*. Neste estudo, o impacto das características de cada palmeira sobre a população de triatomíneo ficou muito evidenciado pela diferença de tamanho dos insetos, muito maiores nos que procediam de babaçus (Diotaiuti et al., 2005). O cruzamento entre *R. nasutus* das carnaúbas e babaçus produziu indivíduos de tamanho intermediário, o que parece descartar que estas características tenham origem genética, mas sim, sejam influenciadas pelas condições ambientais (Dias et al., 2005).

Em estudo realizado no estado do Ceará, Alencar (1987) encontrou seis principais espécies de triatomíneos, estando o *R. nasutus* incluído nesta lista, com constante presença no peridomicílio, associados a galinhas (*Gallus gallus*) e gato (*Felis catus*), como revelam os resultados da reação de precipitina aplicada para identificação das fontes alimentares utilizadas pelo triatomíneo. Segundo este mesmo autor, *R. nasutus* foi considerada a quarta espécie mais capturada no Ceará, presente em 35,5% dos municípios pesquisados, totalizando sua ocorrência em 50 municípios cearenses, incluindo Crato e Barbalha, cidades inseridas na região da Chapada do Araripe, objeto de estudo

deste trabalho. Também foram encontrados espécimes naturalmente infectados pelo *T. cruzi*, demonstrando sua participação no ciclo de transmissão do parasito no ambiente artificial no Estado do Ceará. Ademais, não houve relato sobre a ocorrência de *R. neglectus* neste estudo.

Estudo realizado em Jaguaruana, Ceará, município situado em áreas planas, pertencente ao domínio da caatinga, a única espécie de triatomíneo encontrada por Sarquis et al (2004), associada à carnaúba (*Copernicia purnifera* (Mill.) H.E. Moore)), a única espécie de palmeira da região, foi o *R. nasutus*, com índice de infecção pelo *T. cruzi* de 25%. Esta espécie também relatada habitando o peri e intradomicílio com índices de infecção de 30,6% ($n = 62$) e 100% ($n = 2$), respectivamente. Esses dados reforçam ainda mais a associação entre o *R. nasutus* e a palmeira carnaúba, e importância deste vetor na transmissão da tripanosomíase americana.

1.3. ÁREA DE ESTUDO

A caatinga é um dos biomas brasileiros de que menos se dispõe de informações sobre os seus componentes e das relações entre eles (Nascimento & Nascimento, 1998). A Chapada do Araripe localiza-se entre os Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí, região Nordeste brasileira. Trata-se de uma região morfogeográfica de aproximadamente 1.063.000 hectares, em continuidade com o Planalto Sertanejo e a Depressão Sertaneja. Grande parte de sua extensão é composta por área de preservação ambiental (APA), denominada APA-Araripe. É considerada uma região de transição cerrado/caatinga com vegetação arbórea aberta, apresentando elementos típicos de cerrado, Amazônia e Mata Atlântica. O uso das terras baseia-se na agricultura de subsistência, principalmente feijão, mandioca, milho e cana-de-açúcar. A Chapada do Araripe está localizada na Bacia Sedimentar do Araripe, um importante sítio paleontológico por apresentar registros fossilíferos do período Cretáceo (Bagnoli, 1998)

A Chapada do Araripe é um divisor de águas das três grandes bacias hidrográficas do nordeste: bacia Jaguaribe, bacia do Rio São Francisco e do Rio Parnaíba (figura 3). Em sua porção leste e separada da APA Araripe, encontra-se a Floresta Nacional do Araripe (FLONA Araripe) com 38.262 hectares de mata basicamente secundária, altitudes variando entre 840 e 920m e classificada em cinco diferentes fisionomias: transição floresta úmida/cerrado, cerrado, floresta úmida degradada pelo fogo, floresta úmida semi-perenifólia e carrasco. Possui cerca de 307 fontes ou nascentes de águas, o que justifica elevada umidade e diversidade vegetal na região (Bagnoli, 1998). O índice pluviométrico anual é aproximadamente de 920mm e a temperatura oscila entre 24°C e 26°C, com mínima no inverno (julho) entre 21°C e 23°C e máxima no verão (janeiro) entre 25°C e 27°C. A amplitude térmica anual é relativamente baixa na região. No município de Barbalha, a amplitude térmica anual é em torno de 3°C (Costa et al, 1998).

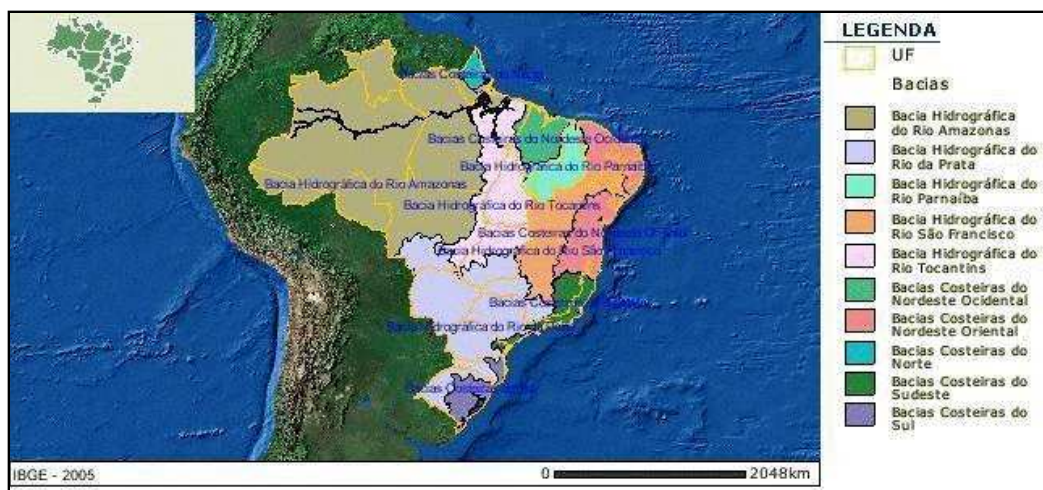


Figura 3: Localização das bacias hidrográficas brasileiras. Fonte: IBGE.

De acordo com Henderson, Galeano, Bernal (1995) e Lorenzi et al. (1996 e 2004) (figura 4) é provável encontrar na região da Chapada do Araripe as palmeiras macaúba, macaúba-barriguda (*Acrocomia intumescens* Drude), carnaúba, catolé ((*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.), buriti e babaçu, sendo a macaúba-barriguda desprovida de qualquer informação referente a infestação por triatomíneos, na literatura. A região da Chapada do Araripe é formada por grandes palmeirais. Nas planícies aluviais, aliadas às altas temperaturas, encontra-se o habitat de preferência da carnaúba (figura 5). Entretanto, em altitudes mais elevadas (cerca de 700m) é constante a presença da macaúba-barriguda (figura 6), babaçu (figura 7), buriti (figura 8) e catolé (figura 9) sendo o catolé, uma palmeira indicadora de áreas mais secas, quando comparada às demais (Figueiredo et al, 1998).

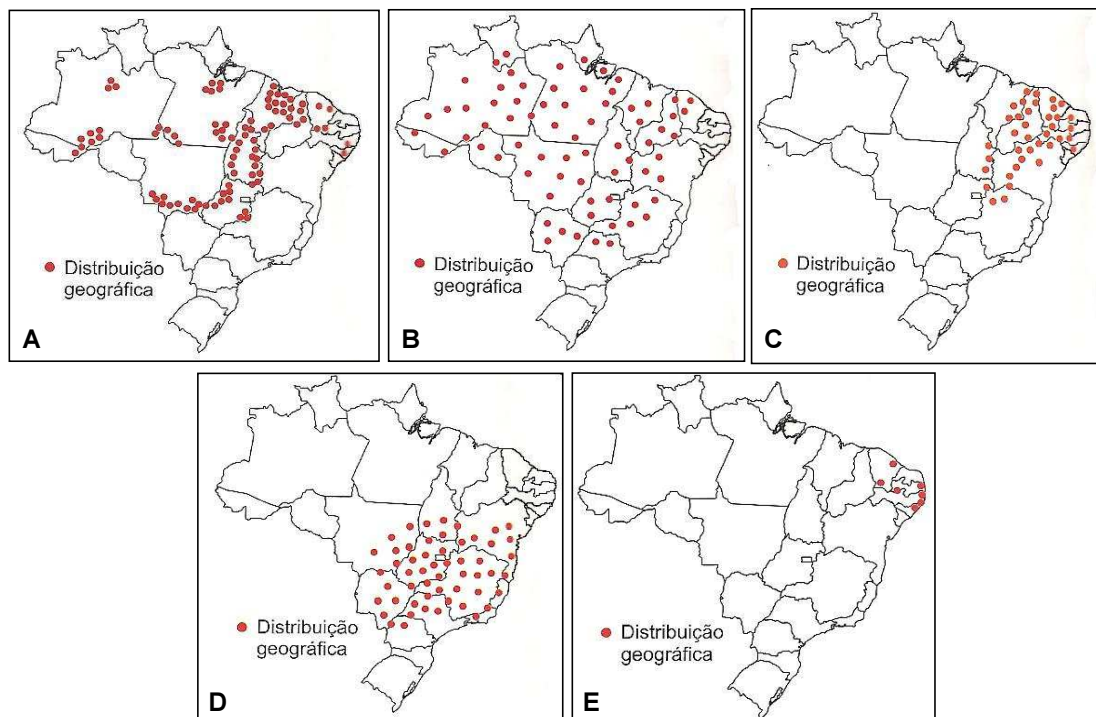


Figura 4: Mapas de distribuição de espécies de palmeiras, segundo Lorenzi et al. (2004). A) babaçu; B) buriti; C) carnaúba; D) catolé e E) macaúba-barriguda.



Figura 5: A) Grande concentração de carnaúbas (*Copernicia prunifera*) em regiões mais planas (aproximadamente 350m de altitude), município de Missão Velha-CE (foto do autor). B) Detalhe da axila foliar e das fibras da carnaúba mostrando a coloração avermelhada, semelhante à coloração do *R. nasutus*. No círculo, presença de ovos de triatomíneos. (foto: Francisco Cialdine Frota Carneiro).



Figura 6: Macaúba-barriguda (*Acrocomia intumescens*), palmeira com distribuição em áreas mais serranas e sem dados sobre infestação por triatomíneos, município de Barbalha-CE (foto do autor).



Figura 7: Babaçu (*Attalea speciosa*), palmeira encontrada em regiões com altitude mais elevada, município de Barbalha-CE (foto do autor).



Figura 8: Buriti (*Mauritia flexuosa*), palmeira de regiões com elevadas altitudes e solos pantanosos no município de Santana do Cariri-CE (foto do autor).



Figura 9: Catolé (*Syagrus oleracea*), palmeira com distribuição em regiões com altitudes mais elevadas. Município de Crato-CE (foto do autor).

Os mapas de distribuição de *R. neglectus* e *R. nasutus* confeccionados por Carcavallo et al (1998), parecem ser complementares, cujos limites entre o sul do Ceará e Pernambuco, coincidem com a Chapada do Araripe. Muito pouco se conhece sobre os triatomíneos presentes na região, exceto pelas informações do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh), que relatam o encontro de *Rhodnius* nas casas, identificado como *R. nasutus*. Seria realmente esta espécie presente na região, ou, devido às condições biogeográficas, existiria condições para a ocorrência de *R. neglectus*?

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar as espécies de *Rhodnius* presentes em palmeiras na Chapada do Araripe, Brasil, e sua importância na transmissão silvestre do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Identificar as espécies de triatomíneos existentes em cinco espécies palmeiras na região da Chapada do Araripe, Brasil;

2.2.2 Determinar a taxa de infestação por *Rhodnius* em cinco espécies de palmeiras;

2.2.3 Determinar a densidade populacional de *Rhodnius*, em cinco espécies de palmeira, na referida região;

2.2.4 Determinar a taxa de infecção natural dos triatomíneos capturados pelo *T. cruzi* e *T. rangeli*;

2.2.5 Caracterizar molecularmente as cepas de tripanosomatídeos isoladas dos triatomíneos infectados;

2.2.6 Determinar as fontes de alimentação dos triatomíneos e suas possíveis fontes de infecção pelo *T. cruzi*;

2.2.7 Determinar o microclima na axila foliar das palmeiras;

2.2.8 Determinar a variabilidade genética entre as diferentes populações de *Rhodnius* através da morfometria geométrica das asas.

3. METODOLOGIA

3.1. PROCEDÊNCIA E COLETA DOS TRIATOMÍNEOS

Os triatomíneos estudados neste projeto foram procedentes de regiões inseridas na Chapada do Araripe, que se localiza geograficamente a sul do Estado do Ceará, noroeste de Pernambuco, e englobando também uma pequena porção leste do estado do Piauí. (figura 11). As coletas localizaram-se no Estado do Ceará, abrangendo os municípios de Barbalha ($\phi 7^{\circ}18'S$ $\lambda 38^{\circ}55'W$), Crato ($\phi 7^{\circ}14'S$ $\lambda 39^{\circ}24'W$), Juazeiro do Norte ($\phi 7^{\circ}12'S$ $\lambda 39^{\circ}18'W$), Missão Velha ($\phi 7^{\circ}15'S$ $\lambda 39^{\circ}08'W$) e Santana do Cariri ($\phi 7^{\circ}11'S$ $\lambda 39^{\circ}44'W$) (figura 10) fazendo parte da micro-região do Cariri.



Figura 10: Mapa político do estado do Ceará. Ao sul do estado e em cinza, os municípios onde foram realizadas as coletas dos triatomíneos.

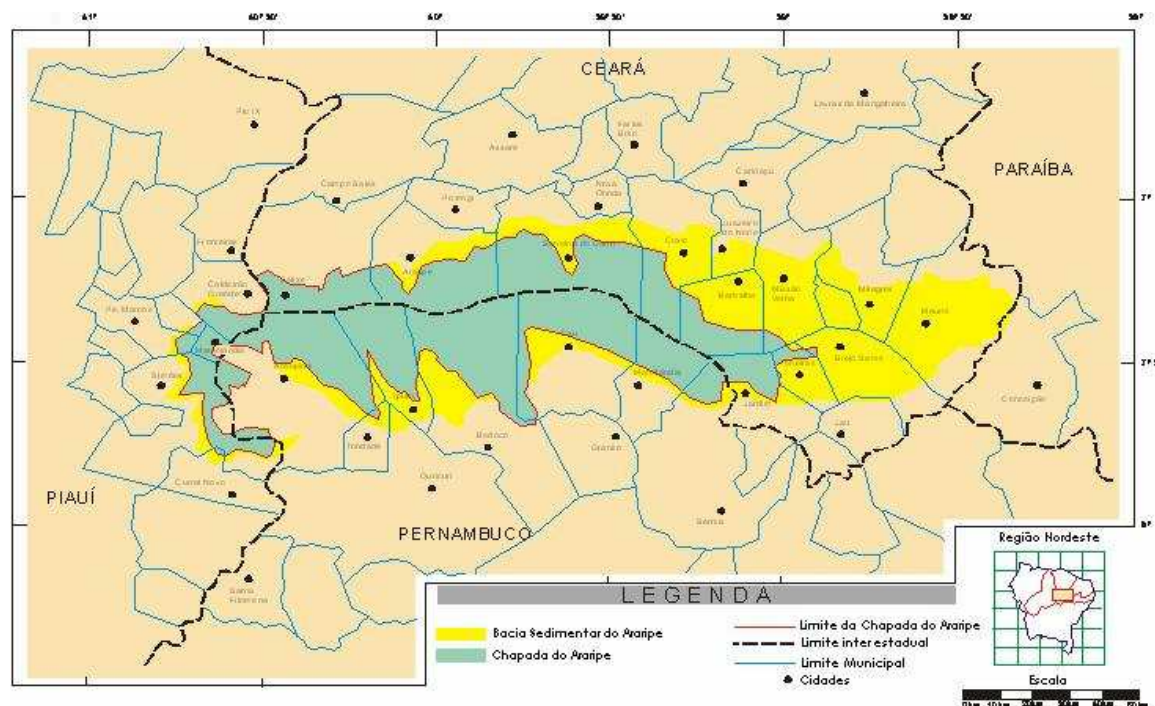


Figura 11: Mapa esquemático da região da Chapada do Araripe (área verde). Fonte: IBAMA-CE.

As coletas dos triatomíneos foram realizadas no período de 14 de março a 06 de abril de 2006 com a participação de agentes da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará (SESA-CE).

A seleção das áreas trabalhadas foi determinada junto ao IBAMA-Araripe, de acordo com a ocorrência das espécies de palmeiras existentes nos municípios da região da Chapada do Araripe. As palmeiras foram identificadas de acordo com Lorenzi et al (1996, 2004) e Henderson, Galeano, Bernal (1995). O critério para a escolha dos exemplares de palmeiras trabalhados foi aleatório, mas evitou-se dissecar palmeiras que estavam muito próximas uma das outras. O critério do tamanho amostral ($n = 50$) foi baseado na disponibilidade de tempo e dos recursos financeiros. Os triatomíneos foram coletados através da derrubada das palmeiras, de acordo com Diotaiuti & Dias (1984), após autorização do IBAMA (anexos I e II). Cada palmeira foi identificada com um código e preenchida uma ficha de campo (anexo III), com data e horário da derrubada, condição climática local, espécie e tamanho da palmeira, fauna associada à palmeira, temperatura na axila foliar. Logo após a derrubada, as palmeiras eram dissecadas cortando-se na base da bainha foliar.

Cada folha era retirada cuidadosamente e procurada minuciosamente a presença dos triatomíneos. Foram também realizadas buscas nas brácteas, cachos de cocos e caule. Todas as palmeiras foram referenciadas geograficamente com auxílio de um GPS (*Global Positioning System*).

No campo, os insetos coletados foram acondicionados em potes de plástico e identificados com o código da palmeira, contendo em seu interior um suporte de papel em forma de sanfona para facilitar a movimentação dos insetos. No laboratório, todos os triatomíneos foram contabilizados por estágio evolutivo e sexo, por palmeira, para cálculo da densidade, taxas de infestação e colonização. A identificação das espécies capturadas foi realizada através das chaves de classificação propostas por Lent & Wygodzinsky (1979).

Os triatomíneos capturados em cada espécie de palmeira constituíram uma colônia de estudo com um determinado código, totalizando cinco grupos.

Definiu-se como palmeira positiva àquela que tivesse no mínimo um exemplar de triatomíneo, presença de exúvia, ou mesmo somente ovos.

3.2. MANUTENÇÃO DE COLÔNIAS

A partir das coletas, foram estabelecidas cinco colônias de acordo com a espécie de palmeira, no Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas do Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ (LATEC), em condições de temperatura e umidade semi-controladas ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%\text{UR}$). Os barbeiros foram acondicionados em frasco de polietileno devidamente identificado (aproximadamente 15cm de diâmetro e 20cm de altura), tendo ao fundo duas folhas de papel de filtro para a absorção das fezes e da urina produzidas pelos insetos. Um papel cartolina foi dobrado em forma de sanfona até a altura do frasco a fim de facilitar a movimentação e alimentação dos mesmos. A superfície do frasco foi vedada com pano de malha fina envolvida por esparadrapo e elásticos (gominhas).

Cada colônia foi mantida separadamente por geração, e semanalmente, os triatomíneos eram alimentados em galinhas (*Gallus gallus*) imobilizadas. Da mesma forma, semanalmente, as colônias eram limpas para a retirada de exúvias e ovos, e separação das gerações.

Os insetos de campo que morreram foram montados em alfinetes entomológicos, identificados e guardados como insetos de referência para coleção de triatomíneos do LATEC.

3.3. EXAME DOS TRIATOMÍNEOS

Todos os triatomíneos coletados no campo e que chegaram vivos (n=26) no laboratório foram examinados quanto a presença de tripanosomatídeos. Este procedimento foi realizado através de exame parasitológico das fezes a fresco, através da técnica de compressão abdominal. As fezes dos triatomíneos foram diluídas em uma gota de solução salina 0,15M, colocadas sobre lâmina e lamínula e observadas em microscópio óptico de acordo com as objetivas disponíveis, sendo aumento de 400x, no laboratório da SESA-CE, e 160x, no LATEC. Esse procedimento foi realizado no laboratório da 20ª Regional da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, no município de Crato, e no LATEC.

Pelas limitações na estrutura do laboratório no Ceará, o exame da presença de *T. rangeli* na hemolinfa foi realizado somente no LATEC, pois o procedimento exige o isolamento imediato dos parasitos em meio de cultura e condições estéreis. Assim, somente os triatomíneos positivos ao exame do tubo digestivo e sobreviventes ao chegarem no LATEC, tiveram uma perna seccionada, e uma micro gota de hemolinfa (aproximadamente 10µl) foi colocada sobre lâmina e lamínula. O material foi visualizado em microscópio óptico, utilizando aumento de 160x. Os insetos com resultado negativo no tubo digestivo foram destinados à criação.

3.4. CULTIVO DE *TRIPANOSOMA* TÍDEOS

Os tripanosomatídeos foram isolados retirando-se o tubo digestivo e cultivados em meio de cultura. Para isso, 26 insetos que foram positivos para *Trypanosoma*, no exame das fezes ou na hemolinfa, tiveram a superfície externa desinfetadas com álcool 70% (v/v), e em seguida dissecados em capela de fluxo laminar, removendo-se o tubo digestivo e as glândulas salivares com auxílio de pinças e tesoura de dissecação estéreis. O material proveniente de cada inseto foi adicionado, individualmente, a 1ml de meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964), em tubos de vidro com tampa de rosca. Posteriormente, o tubo digestivo foi macerado e transferido para tubos contendo meio ágar-sangue+LIT. Os tubos foram mantidos em estufa incubadora a 27,5°C para multiplicação dos parasitos. Semanalmente, alíquotas das culturas foram examinadas em microscópio óptico (aumento 160x) e repicadas quando necessário.

As amostras que apresentavam aproximadamente 10^9 parasitos/ml foram submetidas à centrifugação (1500x *g* por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido em solução salina 0,15M. Este processo foi repetido três vezes, sendo o sedimento obtido após a última centrifugação criopreservado a -70°C até a sua utilização para extração do DNA (Romanha, 1982).

Alíquotas das cepas isoladas foram criopreservadas em nitrogênio líquido (-196°C), de acordo com a técnica padronizada por Filardi & Brener (1975), utilizando como agente crioprotetor, o glicerol 10%, fazendo parte do banco de cepas do LATEC.

3.5. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE *TRIPANOSOMA TÍDEOS*

A tipagem molecular foi baseada na amplificação de parte da região intergênica do gene de mini-exon do *T. cruzi* (Souto et al, 1996) e do *T. rangeli* (Grisard et al 1999), por meio da técnica da PCR, realizada em Termociclador modelo PTC-100™ (MJ Research, Inc. – Watertown, USA).

O DNA dos parasitos foi extraído utilizando a técnica de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, de acordo com Steindel et al (1993) (anexo IV). A concentração de DNA foi determinada por meio de espectrofotômetro (Eppendorf Biophotometer– Hamburg, Germany), a 260nm de comprimento de onda, sendo o grau de pureza das amostras determinado pela relação da absorbância 260/280nm.

Os produtos da PCR esperados apresentam 300pb para *T. cruzi* I, 350pb para *T. cruzi* II. Foram utilizados os iniciadores TCI - 5'-CCT GCA GGC ACA CGT GTG TGT G-3' (específico para *T. cruzi* I), TCII - 5'-GTG TCC GCC ACC TCC TCC GGC CC-3' (específico para *T. cruzi* II), TC - 5'-CCC CCC TCC CAG GCC ACA CTG-3' (comum aos dois grupos) (Souto et al, 1996). Para *T. rangeli* o produto esperado apresenta 360pb, com os seguintes iniciadores: TrINT-1 - 5'-CGC CCA TTC GTT TGT CC-3', TrINT-2 - 5'-TCC AGC GCC ATC ACT GAT C-3' e TrINT-3 - 5'-AAG ATG AGG CGT GGC TCT G-3' (Grisard et al, 1999). Todos iniciadores foram sintetizados pelo laboratório Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canadá). Os reagentes usados na PCR foram: tampão de PCR (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl; 0,75mM MgCl₂), 200μM dNTP, 2pmoles de cada iniciador e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carisbad, CA, USA) e 1μl de DNA molde, perfazendo volume total de 10μl/reação. As condições da PCR estão descritas nas tabelas I e II.

Para a visualização dos produtos amplificados, 3μL da amostra amplificada foram diluídos em igual volume de tampão de amostra 6x (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol e 15% de ficol) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em sistema de minigel (BIO-RAD), sendo posteriormente corados com nitrato de prata 0,2% (Souto et al., 1996).

Como padrão de peso molecular, foi utilizado o DNA do bacteriófago Φ X174 digerido pela enzima de restrição HaeIII.

Em todas as etapas, foram usadas cepas padrões como controles positivos. Para *T. cruzi* grupo II utilizou-se a cepa Y, isolada de uma paciente na fase aguda da doença de Chagas, via xenodiagnóstico (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953), e para *T. cruzi* grupo I, a cepa YuYu, isolada a partir de um exemplar de *Triatoma infestans* Klug, 1834 capturado na área rural do Vale do YuYu, município de Carinhanha, Bahia (Filard & Brener, 1975). Como controle positivo para *T. rangeli*, utilizou-se a cepa San Agustin isolada de um paciente chagásico colombiano (Tibayrenc et al, 1993). As amostras padrões encontram-se disponíveis no banco de cepas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, FIOCRUZ/MG. Em todas as reações foi feito controle negativo sem adição do DNA molde.

Tabela I: Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase nos estudos da variabilidade do gene de mini-exon do *Trypanosoma cruzi* (Souto et al, 1996)

Temperatura de desnaturação/tempo		Ciclo	Temperatura de anelamento dos iniciadores/tempo		Temperatura de Extensão do DNA/tempo	
94°C	5 min	Primeiro	55°C	30 seg	72°C	30 seg
94°C	1 min	27 ciclos seguintes	55°C	30 seg	72°C	30 seg
94°C	1 min	último ciclo	55°C	30 seg	72°C	10 min

Tabela II: Condições estabelecidas para a Reação em Cadeia da Polimerase nos estudos da variabilidade do gene de mini-exon do *Trypanosoma rangeli* (Grisard, 1999).

Temperatura de desnaturação/tempo		Ciclo	Temperatura de anelamento dos iniciadores/tempo		Temperatura de Extensão do DNA/tempo	
94°C	10 min	Primeiro				
94°C	30 s	6 ciclos seguintes	45°C	2 min	72°C	30 seg
94°C	30 s	26 ciclos seguintes	50°C	1 min	72°C	30 seg
		Último Ciclo	50°C	1 min	72°C	5 min

3.6. REAÇÃO DE PRECIPITINA

A fim de determinar o tipo de fonte alimentar dos triatomíneos, realizou-se a reação de precipitina em colaboração com a SUCEN-SP (Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo). Os triatomíneos que morreram antes da realização do exame para constatação de tripanosomatídeos no tubo digestivo tiveram o conteúdo intestinal retirado e transferido para lâminas de papel de filtro. Para cada inseto foram anotados o estágio evolutivo e o código da palmeira de origem. Para os triatomíneos que já haviam sido examinados, o procedimento foi semelhante, porém sendo anotado também o resultado do exame parasitológico (positivo ou negativo). Os conteúdos intestinais, depois de secos, foram acondicionados dentro de sacos plásticos, individualmente, e mantidos em temperatura ambiente. Os testes de Reação de Precipitação em Tubo Capilar foram realizados segundo a técnica descrita por Siqueira (1960). Cada material foi testado com anti-soros de ave, cão, gambá, gato, humano, porco e roedor, produzidos em coelhos.

3.7. CARACTERIZAÇÃO MICROCLIMÁTICA DAS PALMEIRAS

Em cada palmeira trabalhada, foram coletados dados instantâneos de temperatura. Para isto, logo após a derrubada, era introduzido um termômetro na axila da folha. Após cinco minutos, o termômetro era retirado e anotado seus valores na ficha de campo.

3.8. MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS ASAS

Para o estudo morfométrico, utilizaram-se 30 asas direitas de fêmeas e de machos provenientes de triatomíneos da geração F1, oriundas das cinco colônias estabelecidas a partir das coletas. As imagens das asas foram obtidas utilizando máquina fotográfica digital marca Sony, modelo FD Mavica Interpolated 1.6 megapixel Images, acoplada a ocular de um microscópio estereoscópio Zeiss, modelo Stemi SV 6 (Germany), aumento 8x.

Para cada asa, foram utilizados oito pontos de referências (landmarks) na região membranosa do hemiélitro, todas realizadas pelo mesmo investigador (figura 12). As coordenadas foram geradas a partir do programa COO, versão 36 (Dujardin & Slice, 2006)

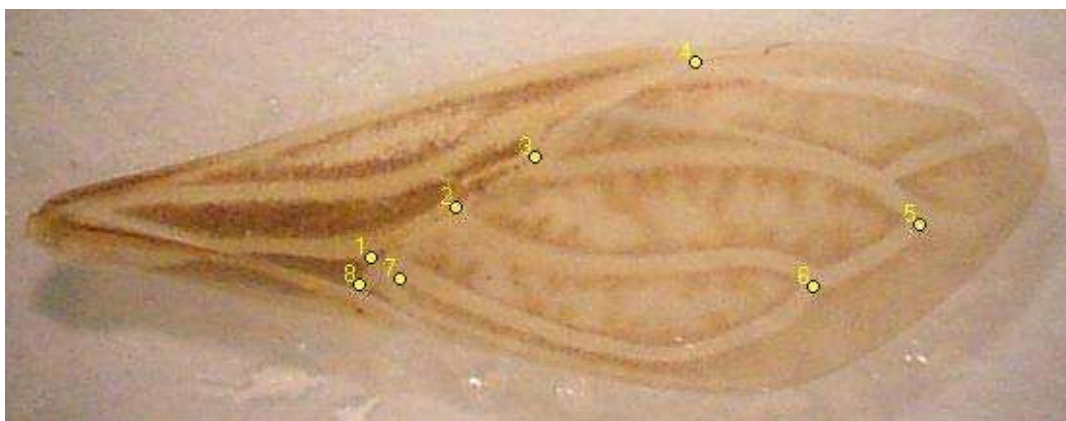


Figura 12: Vista dorsal de uma asa direita de *R. nasutus*. Os círculos e os números indicam os pontos de referências utilizados.

A comparação de tamanho entre os grupos foi obtida através do tamanho centróide, que é o estimador de tamanho isométrico e representa o ponto central do polígono formado pela junção dos pontos de referências. A análise do tamanho isométrico foi realizada através do programa MOG, versão 75 (Dujardin & Slice, 2006).

A Análise Generalizada de Procrustes (AGP) é um algoritmo matemático que elimina os efeitos de escala, de orientação e de posição dos objetos, conseguindo quantificar as variações entre os pontos de referências correspondentes e busca o ajuste para a melhor sobreposição das

configurações geométricas (Jaramillo & Dujardin, 2006). Esta análise foi realizada pelo programa MOG, versão 75 (Dujardin & Slice, 2006). É na AGP que são gerados os valores das variáveis de conformação (Partial Warps) e o tamanho centróide de cada indivíduo.

A Análise dos Componentes Principais foi realizada através do programa COV, versão 46 (Dujardin & Slice, 2006), utilizando os dois primeiros componentes principais. Esta análise foi baseada na matriz das variáveis de conformação e onde se obteve as distâncias Euclidianas entre os grupos analisados. A partir destes resultados, verificou-se através da análise de variância multivariada (MANCOVA) se o resíduo alométrico foi igual entre os grupos e obtida uma árvore UPGMA dos grupos.

A Análise Discriminante foi realizada com a utilização do programa PAD, versão 82 (Dujardin & Slice, 2006), tendo sido calculadas as distâncias de Mahalanobis entre as amostras, a partir das variáveis de conformação. A análise discriminante verificou também a reclassificação dos indivíduos entre os grupos. Uma árvore UPGMA foi gerada a partir das distâncias de Mahalanobis.

Todos os programas utilizados nas análises morfométricas estão disponíveis em <http://www.mpl.ird.fr/morphometrics>.

3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A densidade triatomínica foi testada estatisticamente através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas de Dunn's. As análises estatísticas foram realizadas através dos programas Minitab (versão 13) e/ou Graph Pad Prism (versão 3).

Nos estudos morfométricos, a análise do tamanho centróide entre os grupos foi testada através do teste não paramétrico Mann-Whitney. Na análise discriminante, foi testada a significância estatística entre os grupos através de teste não paramétrico de permutação e correção de Bonferroni. Um teste de regressão linear múltipla foi realizado a fim de verificar a significância do resíduo alométrico na discriminação entre os grupos, utilizando os valores do primeiro fator canônico e o tamanho centróide (Jaramillo et al, 2002).

4. RESULTADOS

4.1. INFESTAÇÃO DAS PALMEIRAS

No período de 14/03/2006 a 06/04/2006 foram dissecadas cinco espécies de palmeiras, num total de 10 exemplares para cada espécie de palmeira, a saber: babaçu (*Attalea speciosa*), buriti (*Mauritia flexuosa*), carnaúba (*Copernicia prunifera*), catolé (*Syagrus oleracea*) e macaúba-barriguda (*Acrocomia intumescens*).

A palmeira babaçu obteve um índice de infestação por triatomíneos de 100%, enquanto a macaúba-barriguda obteve índice de 70%. Buriti, carnaúba e catolé tiveram índice de infestação de 90%, 80% e 90%, respectivamente. A tabela III resume os dados de infestação das diferentes espécies de palmeiras. O tempo médio para a dissecação completa da copa das palmeiras variou de 35 minutos para as carnaúbas a 120 minutos para os babaçus. O tamanho das palmeiras foi mensurado, sendo a carnaúba a palmeira mais baixa, com 5 metros, enquanto as maiores palmeiras foram encontradas nos buritis, alcançando até 20 metros.

Tabela III: Valores absolutos e relativos de infestação de triatomíneos por espécie de palmeira.

Palmeira / Espécie	Infestação	
	Valor absoluto	Valor relativo
babaçu (<i>A. speciosa</i>)	10/10	100%
buriti (<i>M. flexuosa</i>)	09/10	90%
carnaúba (<i>C. prunifera</i>)	08/10	80%
catolé (<i>S. oleracea</i>)	09/10	90%
macaúba-barriguda (<i>A. intumescens</i>)	07/10	70%
Total	43/50	86%

4.2. DENSIDADE POPULACIONAL

Foram coletados 521 triatomíneos, sendo 71 adultos e 450 ninfas, identificados morfologicamente como *R. nasutus* de acordo com Lent & Wygodzinsky (1979), com mediana de 4,0 triatomíneos/palmeira e 5,0 triatomíneos/palmeira infestada. Entretanto, os espécimes coletados nas carnaúbas apresentaram coloração típica de acordo com a descrição da espécie, enquanto os triatomíneos provenientes das outras espécies de palmeiras foram morfologicamente muito similares, apresentando coloração castanha por todo o corpo, porém diferente aos insetos das carnaúbas que apresentaram coloração avermelhada (figura 13).

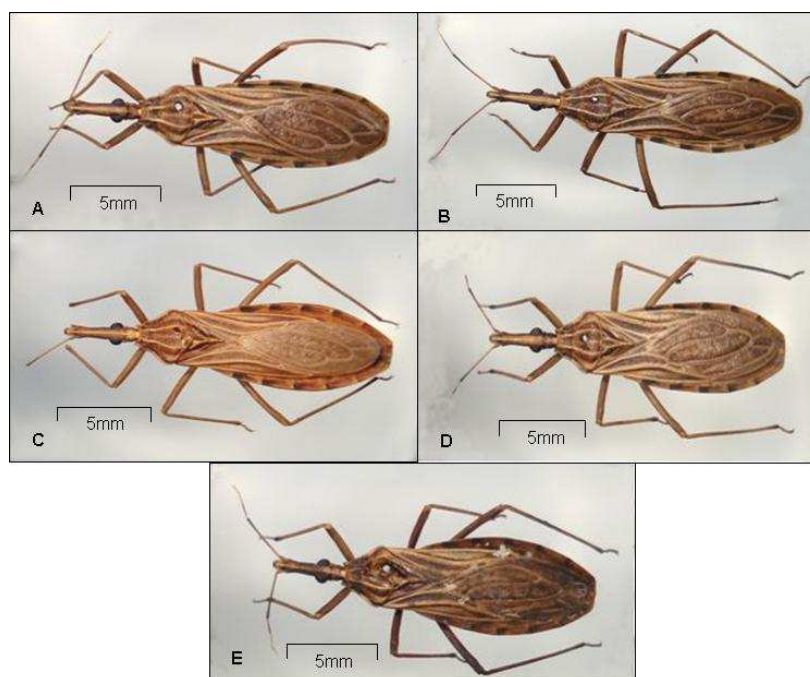


Figura 13: Fêmeas de *R. nasutus* provenientes da geração parental coletados nas cinco espécies de palmeiras na região da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. a) babaçu; b) buriti; c) carnaúba; d) catolé e e) macaúba-barriguda.

Para cálculo da densidade populacional, os triatomíneos coletados no campo foram contabilizados por estágio evolutivo (tabela IV) (figuras 14 e 15). Babaçu foi a palmeira que apresentou maior densidade populacional, totalizando 224 triatomíneos e mediana de 19,0 barbeiros/palmeira positiva,

enquanto buriti foi a palmeira com a menor densidade, totalizando 19 triatomíneos, e média aproximada de um barbeiro/palmeira positiva. Catolé foi a segunda palmeira com a maior densidade populacional, contabilizando 191 triatomíneos coletados (mediana de 11,5 triatomíneos/palmeira positiva), seguido da macaúba e carnaúba com 63 e 24 barbeiros, e mediana de 2,5 barbeiros/palmeira positiva (tabela IV). Do ponto de vista global, os estádios evolutivos mais freqüentes foram o quarto e o quinto estádios, com 161 e 146 triatomíneos, respectivamente. Em nenhuma palmeira estudada foram encontrados ovos viáveis, nem cascas de ovos de triatomíneos. Duas palmeiras (um exemplar de babaçu e outro catolé) apresentaram grande densidade triatomínica com 73 e 77 *R. nasutus*, respectivamente, o que aumentou consideravelmente os valores das medianas. Este fato pode ser explicado pela presença de um marsupial na palmeira de babaçu e pela existência de um ninho de bem-te-vi na palmeira catolé, ambos os animais habitando as palmeiras.

Tabela IV: Número de triatomíneos coletados de acordo com estágio evolutivo e espécie de palmeira

Estádio evolutivo	Quantidade de triatomíneos / espécie de palmeira					Total
	babaçu	buriti	carnaúba	catolé	macaúba	
1º estágio	03	zero	05	05	03	16
2º estágio	27	zero	02	01	02	32
3º estágio	50	03	01	15	26	95
4º estágio	63	08	01	68	21	161
5º estágio	51	06	04	82	03	146
fêmea	12	01	05	11	02	31
macho	18	01	06	09	06	40
Total (%)	224 (43,0)	19 (3,6)	24 (4,6)	191 (36,7)	63 (12,1)	521 (100,0)
med/Q ₁ ; Q ₃ *	19 (7; 28)	1 (1; 2,25)	2,5 (0,75; 4,25)	11,5 (6,25; 26,5)	2,5 (0,0; 9,5)	4 (0,0; 9,5)

*Mediana / 1º quartil; 3º quartil.

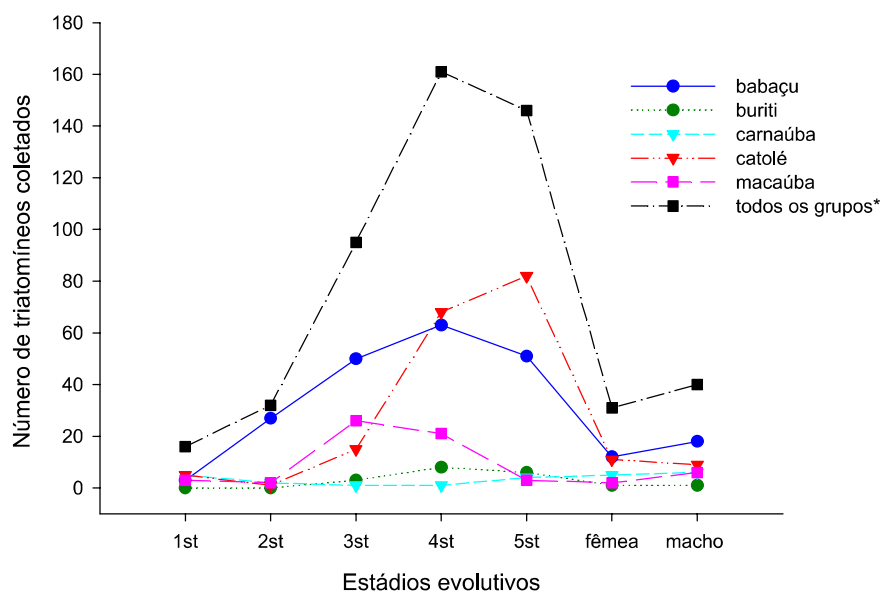


Figura14: Gráfico representativo da densidade populacional de triatomíneos por estágio evolutivo e espécie de palmeira (st = estágio).

*todos os grupos = triatomíneos coletados nas cinco espécies de palmeiras.

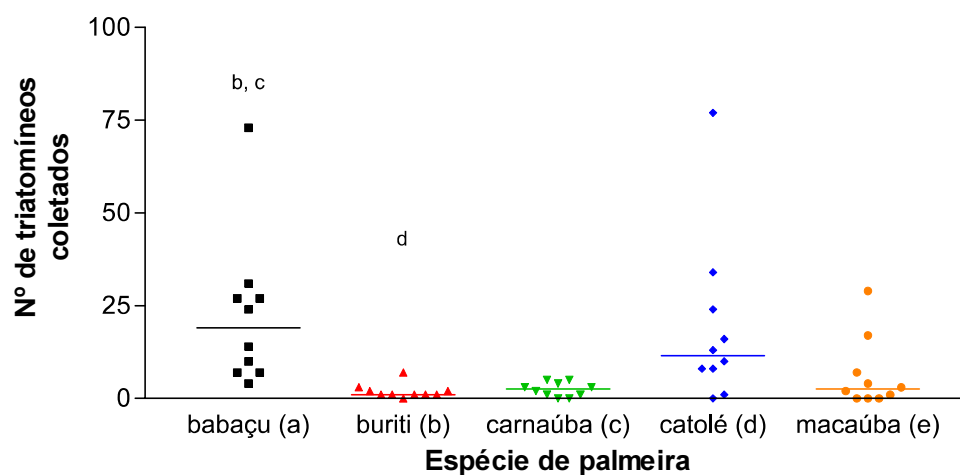


Figura 15: Gráfico representativo da densidade populacional de triatomíneos por espécie de palmeira. A linha horizontal em cada espécie de palmeira refere-se à mediana. As letras correspondem às diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

Tabela V: Diferenças estatísticas encontradas entre as cinco espécies de palmeiras pesquisadas com relação à densidade triatomínica.

Palmeira	babaçu	buriti	carnaúba	Catolé	Macaúba
babaçu					
buriti	p<0,01				
carnaúba	p<0,05	p>0,05			
catolé	p>0,05	p<0,05	p>0,05		
macaúba	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	

Teste estatístico utilizado: Kruskal-Wallis e comparações múltiplas de Dunns.

4.3. EXAME DOS TRIATOMÍNEOS / ÍNDICE DE INFECÇÃO POR TRIPANOSOMATÍDEOS

De 521 triatomíneos capturados, 382 barbeiros (77,3%) foram submetidos a exame de compressão abdominal para constatação de infecção quanto a presença de tripanosomatídeos. Destes 382 triatomíneos examinados, 64 estavam infectados, o que representa um índice de infecção de 16,8%. Os dados globais de captura, exame de triatomíneos, número de triatomíneos infectados e valor percentual de barbeiros infectados estão demonstrados na tabela VI. Apesar da baixa quantidade de triatomíneos examinados nas carnaúbas ($n = 16$) e nos buritis ($n = 15$), a única espécie de palmeira que não apresentou insetos infectados foi a carnaúba, enquanto babaçu apresentou o maior índice de triatomíneos infectados (21,5%). Parece, portanto, com relação à infecção por tripanosomatídeos, que as palmeiras analisadas neste estudo, estejam divididas em dois grupos: o primeiro constituído pelas palmeiras de babaçu e catolé com índices de infecção próximos a 20%, e outro grupo, pertencente às palmeiras de buriti, carnaúba e macaúba com índices de infecção variando de zero a 7%.

Tabela VI: Número de palmeiras infestadas, triatomíneos capturados, examinados, infectados com tripanosomatídeos, e percentual de infecção, por espécie de palmeira.

Palmeira	Número palmeiras infestadas (%)	Triatomíneos capturados (%)	Triatomíneos examinados (%)	Triatomíneos infectados (%)
Babaçu	10 (23,3)	224 (43,0)	144 (64,4)	31 (21,5)
Buriti	9 (20,9)	19 (3,6)	15 (79,0)	1 (6,8)
Carnaúba	8 (18,6)	24 (4,6)	16 (66,7)	zero
Católé	9 (20,9)	191 (36,7)	148 (77,5)	29 (19,6)
Macaúba	7 (16,3)	63 (12,1)	59 (93,7)	3 (5,0)
Total	43 (100)	521 (100)	382 (73,3)	64 (16,8)

4.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS DE TRIPANOSOMA TÍDEOS

Foram isoladas 26 cepas de tripanosomatídeos. Destas, 19 cepas foram caracterizadas molecularmente. Não foi possível a caracterização das cepas restantes (sete cepas) devido à contaminação por bactérias e/ou fungos.

A tipagem molecular de todos os isolados foi compatível com *T. cruzi* pertencente ao grupo I (relativo ao ciclo silvestre da doença de Chagas), apresentando uma banda de 300pb. (figura 16a). Em dois isolados, um procedente de inseto capturado em palmeira buriti (cepa RN01) e outro proveniente de outro inseto capturado em catolé (cepa RN04), apresentaram uma banda com aproximadamente 203pb e duas outras bandas de menor intensidade com 244 e 265 pb, respectivamente (figura 16b), ratificando os achados morfológicos (figura 17), demonstrando, pela primeira vez, ocorrência de infecção mista pelo *T. cruzi* e *T. rangeli* neste vetor e nesta região (tabela VII). A denominação dos isolados foi baseada nos critérios estabelecidos em Reunião Satélite realizada em 1999 em ocasião da comemoração do 90o aniversário da descoberta da doença de Chagas (Anonymous, 1999). As cepas foram criopreservadas para estudos futuros.

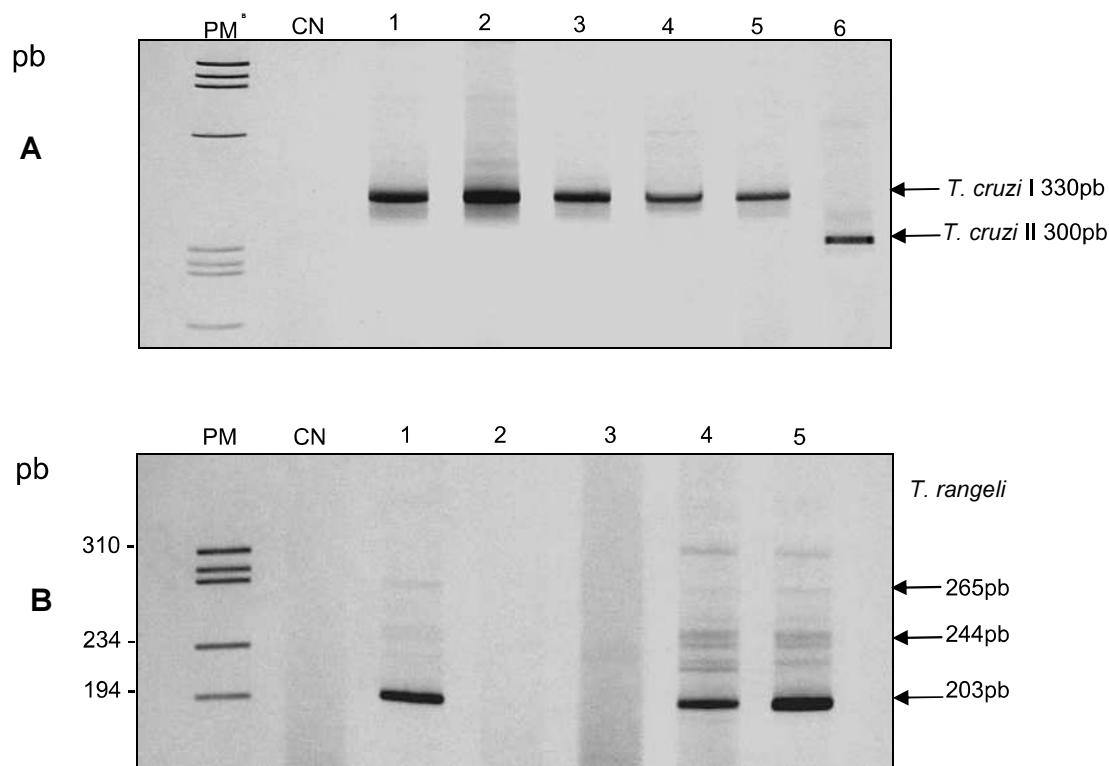


Figura 16: **A)** Amplificação via PCR, utilizando os iniciadores TC, TC I e TC II para caracterização de *T. cruzi*. PM – Padrão de peso molecular, CN – controle negativo da reação (sem adição de DNA), canaletas: 1 – cepa RN01; 2 – RN02; 3 – RN03; 4 – RN04; 5 – cepa YuYu (controle positivo, pertencente ao grupo *T. cruzi* I); 6 – cepa Y (controle positivo pertencente ao grupo *T. cruzi* II). **B)** Amplificação via PCR, utilizando os iniciadores TrINT 1, TrINT 2 e TrINT 3 para a caracterização de *T. rangeli*. PM – padrão de peso molecular, CN – Controle negativo da reação (sem adição de DNA), canaletas: 1 – cepa RN01; 2 – RN02; 3 – RN03; 4 – RN04; 5 – controle positivo da reação (cepa San Agustin). Géis de poliacrilamida a 8% corados pela prata.

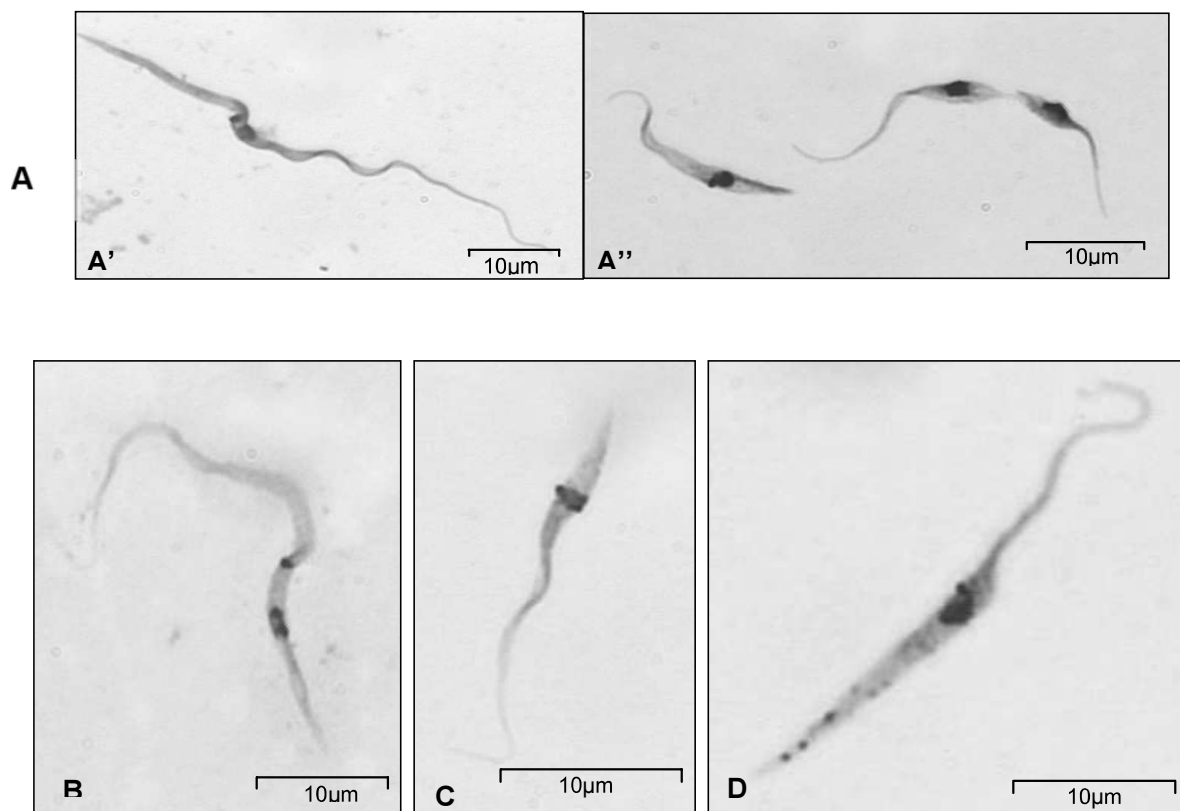


Figura 17: Tripanosomas de meio de cultura LIT, corados pela Giemsa, aumento 1000x. A) cepa RN01 isolada a partir de *R. nasutus* com infecção mista; A') *T. rangeli* isolado da cepa RN01; A'') *T. cruzi* isolado da cepa RN01; B) cepa San Agustin (controle positivo de *T. rangeli*); C) cepa Y (controle positivo de *T. cruzi* grupo II) e D) cepa YuYu (controle positivo de *T. cruzi* grupo I).

Tabela VII: Origem e caracterização molecular das 19 amostras de *Trypanosoma cruzi*, das 2 amostras de *T. rangeli* isoladas e das amostras padrões utilizadas como controles positivos nas reações de PCR.

Amostra	Ecótopo	Ciclo de Transmissão	Hospedeiro	Mini exon
RNAS/BR/2006/RN01*	buriti	Silvestre	<i>Rhodnius nasutus</i>	1
RNAS/BR/2006/RN02	babaçu	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN03	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN04*	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN05	babaçu	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN06	babaçu	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN07	babaçu	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN08	babaçu	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN10	babaçu	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN12	babaçu	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN15	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN17	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN18	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN20	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN21	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN22	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN23	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN24	catolé	“	“	“
RNAS/BR/2006/RN25	catolé	“	“	“
Y		Domiciliar	Homem, fase aguda	2
YuYu		Silvestre	<i>Triatoma infestans</i>	1
San Agustín (<i>T. rangeli</i>)		Domiciliar	Homem	-

*triatomíneos com infecção mista (presença de *T. cruzi* e *T. rangeli*).

4.5. REAÇÃO DE PRECIPITINA

Foram testadas no total, 152 amostras do conteúdo do trato digestivo dos triatomíneos coletados em campo (106 triatomíneos procedentes dos babaçus; dois dos buritis; nove das carnaúbas; 25 dos catolés e 10 das macaúbas). As amostras foram testadas contra anti-soros de ave, cão, gambá, gato, humano, porco e roedor, os únicos disponíveis para este estudo na SUCEN-SP. A reação de precipitina foi reagente em 70 insetos (46,1%), sendo 20 *R. nasutus* reagentes para sangue de ave (13,2%) e 53 para sangue de gambá (34,9%) (tabela VIII). Apenas três exemplares alimentaram-se das duas fontes de alimentação reagentes.

Dos triatomíneos procedentes das palmeiras babaçus, 26 insetos estavam infectados, sendo 18 destes reagentes para gambás, dois exemplares com material insuficiente para a reação e seis amostras não reagiram contra os anti-soros testados. Em relação aos triatomíneos oriundos dos catolés, quatro exemplares estavam infectados, sendo dois insetos com material insuficiente e dois não reagiram contra os anti-soros testados. Trinta triatomíneos não tinham conteúdo suficiente para avaliar a fonte alimentar e 52 insetos não reagiram a nenhum dos anti-soros testados. Sob o ponto de vista epidemiológico, o fato mais importante foi a ausência de reação das amostras testadas contra anti-soro humano.

Tabela VIII: Fonte alimentar identificada pela reação de precipitina em *R. nasutus*, por espécie de palmeira e estágio evolutivo, coletados na região da Chapada do Araripe, Ceará.

Palmeira	Estádio	Resultado					
		Ave	Ave + Gambá	Gambá	Material insuficiente	Não reagente	Examinados/ Reagente (%)
babaçu	ninfas	2	1	14	5	5	106/53 (56,2%)
	adultos	3	zero	33	13	30	
buriti	ninfas	zero	zero	zero	zero	zero	2/0 (0%)
	adultos	zero	zero	zero	zero	2	
carnaúba	ninfas	zero	1	3	zero	zero	9/5 (45%)
	adultos	1	zero	zero	3	1	
catolé	ninfas	2	zero	zero	1	1	25/9 (36%)
	adultos	7	zero	zero	4	10	
macaúba	ninfas	zero	zero	zero	3	1	10/3 (30%)
	adultos	2	1	zero	1	2	
Total	ninfas	4	2	17	9	7	152/70 (46,1%)
	adultos	13	1	33	21	45	

Observação: Total de triatomíneos reagentes para:

ave = 20 (6 ninfas e 14 adultos) e gambá = 53 (19 ninfas e 34 adultos).

4.6. MICROCLIMA

O período das coletas (março e abril/2006) está incluído no período chuvoso da região. Dentre as cidades trabalhadas, Missão Velha e Juazeiro do Norte correspondem aos únicos municípios com altitude de região de caatinga (Fernandes, 1994), sendo encontrada apenas a palmeira carnaúba. Os demais municípios estão inseridos em região serrana, com altitudes acima de 700 metros.

Carnaúba foi a palmeira que apresentou temperatura média mais elevada na axila foliar com 30,1°C (tabela IX). A temperatura da axila foliar dos babaçus e buritis apresentou microclima mais estável, com menor variação de temperatura, enquanto carnaúba e macaúba apresentaram a maior variação térmica (figura 18). A figura 18 apresenta os dados de temperatura das palmeiras. Todas as espécies foram capazes de amenizar a temperatura na axila foliar em relação à temperatura ambiente, favorecendo a colonização triatomínica nas palmeiras.

Tabela IX: Temperatura (°C) medida em cada palmeira na axila foliar, após a derrubada e do ambiente.

Palmeira	Temperatura	
	Axila foliar (X / DP)*	Ambiente (X / DP)*
babaçu	23,3 ± 0,5	27,4 ± 2,4
buriti	25,1 ± 0,9	26,9 ± 1,1
carnaúba	26,2 ± 1,5	30,1 ± 1,4
catolé	23,3 ± 1,1	25,4 ± 1,8
Macaúba-barriguda	24,2 ± 1,6	27,7 ± 2,8
Média geral	24,4 ± 1,6	27,5 ± 2,5

*X / DP = média e desvio padrão

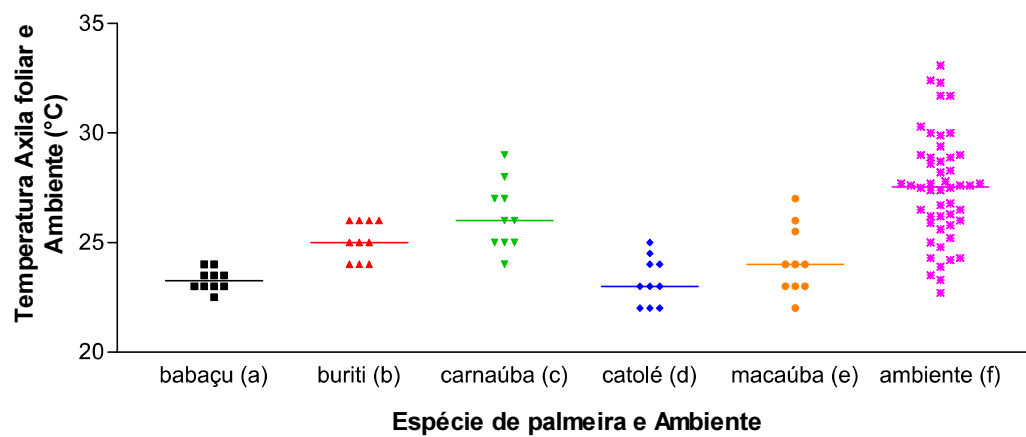


Figura 18: Gráfico representativo da temperatura da axila foliar das cinco espécies de palmeiras e temperatura ambiente. A linha horizontal em cada espécie de palmeira refere-se a mediana das temperaturas.

4.7. FAUNA ASSOCIADA AOS TRIATOMÍNEOS NAS PALMEIRAS

A tabela X apresenta os dados de ocorrência referente aos animais observados nas palmeiras durante a dissecação das mesmas, considerados como possíveis fontes de alimentação para os triatomíneos (figura 19). Foram observadas várias espécies de artrópodes (insetos e aracnídeos), como formigas, cupins, baratas, besouros, gafanhotos, outros Heteroptera, pseudoescopiões, centopéias, aranhas que não puderam ser identificadas. Chamou a atenção a frequência com que foram observadas aranhas caranguejeiras, e centopéias medindo cerca de 20 centímetros.

Tabela X: Frequência absoluta das possíveis fontes de alimentação para os triatomíneos, observadas nas diferentes espécies de palmeiras*.

palmeira	anfíbio	ave ou indícios**	cobra	gambá	lagarto	morcego	Total
babaçu	2	7	zero	1	5	2	17
buriti	2	4	1	zero	1	3	11
carnaúba	zero	2	zero	zero	3	1	6
catolé	1	3	zero	zero	6	zero	10
macaúba	1	2	zero	zero	3	1	7
Total	6	18	1	1	18	7	51

*10 palmeiras de cada espécie

** Presença de ninhos não habitados e/ou somente penas de aves.



Figura 19: Fauna associada aos triatomíneos nas diferentes espécies de palmeiras da Chapada do Araripe, Brasil.

- A) Morcego capturado em um babaçu.
- B) Gambá (*Didelphis albiventris*) habitando um babaçu. Na seta, presença de um lagarto.
- C) Detalhe do gambá capturado com sua prole.
- D) Ninho com cinco filhotes de bem-te-vi (*Pitangus sulphuratus*) em uma carnaúba.
- E) Cobra-cipó que habitava um buriti.
- F) Aranha caranguejeira na folha de um buriti.
- G) Urubu em uma folha do babaçu
- H) Gafanhoto (*Tropidacris cristata*) que habitava uma palmeira carnaúba
- I) Perereca que habitava um buriti entre o pecíolo e a bainha foliar.

4.8. MORFOMETRIA GEOMÉTRICA DAS ASAS

Embora tenha sido observado dimorfismo sexual em todas as populações (dados não mostrados), a análise morfométrica foi realizada utilizando juntamente, os machos e as fêmeas de cada grupo (figura 20). A análise do tamanho centróide demonstrou diferença estatística entre as populações (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$), sendo os insetos provenientes dos buritis maiores aos demais grupos, e os insetos procedentes dos babaçus menores ($p < 0,05$) (tabela XI).

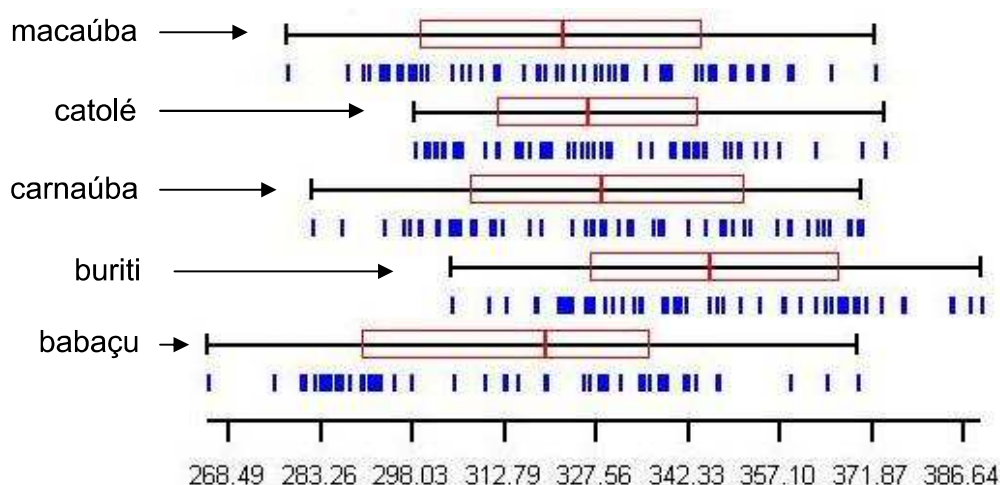


Figura 20: Distribuição dos indivíduos analisados em relação ao Tamanho Centróide (CS). Os nomes das palmeiras indicam a origem dos *R. nasutus* analisados. Cada traço azul representa a asa direita de cada indivíduo. A linha central em cada box plot refere-se a mediana do tamanho centróide de cada grupo.

Tabela XI: Diferenças estatísticas encontradas entre as cinco espécies de palmeiras pesquisadas em relação ao tamanho centróide. Os valores em negrito apontam as diferenças estatísticas significativas.

Palmeira	babaçu	buriti	carnaúba	catolé	Macaúba
babaçu					
buriti	p<0,01				
carnaúba	p<0,01	p<0,01			
catolé	p<0,01	p<0,01	p>0,05		
macaúba	p<0,05	p<0,01	p>0,05	p>0,05	

Teste estatístico utilizado: Teste não paramétrico Mann-Whitney.

A análise discriminante (AD) das variáveis de conformação mostrou que a primeira variável canônica contribuiu com 55% da variação entre os grupos, e a segunda variável contribuiu com 29%, no entanto, não foi possível observar separação entre os grupos. Esta análise não conseguiu discriminar os grupos estudados (figura 21), demonstrando grande semelhança os grupos em relação à conformação, o que geralmente é esperado para estudos intrapopulacionais.

A reclassificação baseada nas distâncias de Mahalanobis foi maior para os triatomíneos procedentes dos buritis (85%) e menor para os insetos da macaúba (38%).

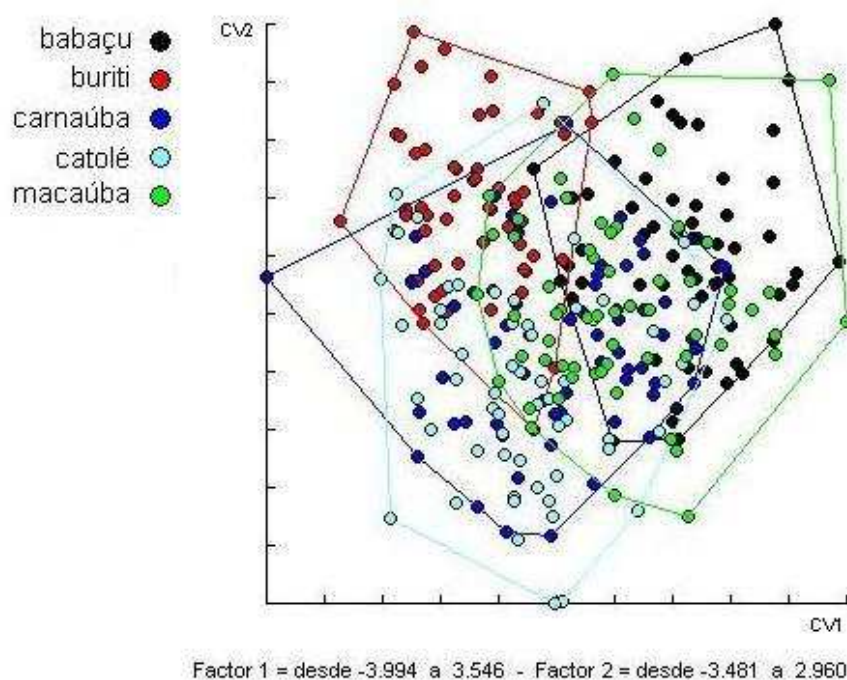


Figura 21: Mapa fatorial da análise discriminante. Os eixos CV1 e CV2 representam a primeira e a segunda variável de conformação (variável canônica), respectivamente. O nome das palmeiras refere-se aos grupos estudados. Cada ponto do gráfico representa um indivíduo.

Apesar da grande semelhança entre os grupos apontada pelo mapa fatorial da análise discriminante, tanto a árvore UPGMA criada a partir das distâncias de Mahalanobis (AD), quanto a árvore UPGMA das distâncias Euclidianas demonstram que os insetos procedentes dos buritis formaram o grupo mais isolado. Porém, estudos complementares, com a utilização de marcadores moleculares, serão necessários para a verificação e determinação das distâncias genéticas e das diferenças intrapopulacionais. Houve a formação de dois agrupamentos: um composto entre os insetos de babaçus com macaubeiras, e outro entre carnaúba e catolé. (figuras 22 e 23). As permutações múltiplas das distâncias de Mahalanobis demonstraram diferenças significativas entre todas as distâncias dos grupos ($p < 0,005$). Da mesma forma, as diferenças foram significativas entre as distâncias Euclidianas.

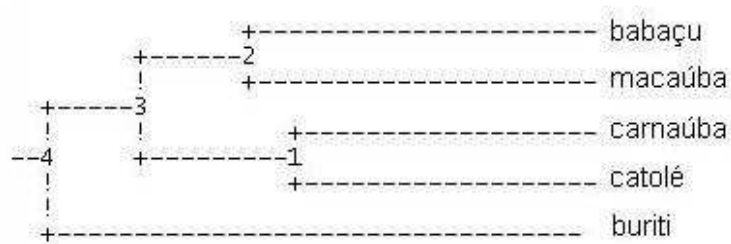


Figura 22: Árvore UPGMA obtida a partir das distâncias de Mahalanobis das variáveis de conformação, derivadas da análise discriminante. Os nomes das palmeiras indicam a procedência das populações de *R. nasutus* estudadas.

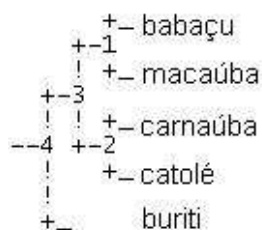


Figura 23: Árvore UPGMA obtida a partir das distâncias Euclidianas das variáveis de conformação, derivadas da análise dos componentes principais comuns. Os nomes das palmeiras indicam a procedência das populações de *R. nasutus* estudadas.

5. DISCUSSÃO

DOENÇA DE CHAGAS NO CEARÁ

Durante algumas décadas, o Estado do Ceará foi muito estudado, abrangendo diferentes contextos que envolvem a doença de Chagas: infestação triatomínica no ambiente silvestre, peri e intra-domiciliar, infecção de mamíferos hospedeiros, inquéritos sorológicos da população e características sócio-ambientais (Alencar, 1987). Este autor encontrou seis espécies de triatomíneos nos municípios pesquisados: *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835, *P. lutzi* Neiva & Pinto, 1923, *R. nasutus* e *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965. No município de Crato, Alencar (1987) estudando um pouco sobre a ecologia do *R. nasutus*, em babaçus e macaubeiras, encontrou este triatomíneo naturalmente infectado (índice de infecção 77,8%, n = 9) e associado com gambás e morcegos. Para este autor, apesar de *R. nasutus* não exercer papel na transmissão do *T. cruzi* ao homem, esta espécie está estritamente associado ao ambiente silvestre com os gambás e morcegos.

A condição sócio-econômica de grande parte da população rural e as informações sobre a doença de Chagas e seus vetores eram precárias. As características das casas também eram muito precárias, que segundo Alencar (1987): “as características das casas são típicas de região pobre, sendo o piso e as paredes de barro batido ou ‘taipa’”. Esses fatores favoreceram a domiciliação triatomínica, com elevados índices de colonização no ambiente artificial (peri e intradomicílio). Inquéritos sorológicos realizados no período de 1942 a 1967 no Ceará demonstram que a taxa de positividade média dos municípios pesquisados era de 14,8%. Neste período, os dois municípios cearenses que apresentavam as mais elevadas taxas foram Crato, com 40,7%, seguido de Juazeiro do Norte, com 37,5% (Alencar, 1987).

Embora o controle da transmissão vetorial da DC tenha sido institucionalizado em 1950 pelo Serviço Nacional de Malária, a sistematização e estruturação do controle ao nível nacional foram implantadas somente em 1975, com o criação do Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh) pela SUCAM (Superintendência de Campanhas em Saúde Pública). Nessa época, a área de risco vetorial englobava 36% do território nacional, em 18

estados. Dentre as espécies de triatomíneos catalogadas no Brasil, cinco foram apontadas como tendo participação direta na transmissão domiciliar, sendo o *T. brasiliensis*, espécie autóctone da região Nordeste, considerado o principal vetor na região (Vinhaes & Dias, 2000). O PCDCh preconiza a borrifação das unidades domiciliares (UD's) infestadas com inseticidas, tendo a infestação domiciliar diminuída gradativamente. A partir dos dados do PCDCh, Silveira, Feitosa, Borges (1984) catalogaram as espécies de triatomíneos capturadas no ambiente domiciliar de 1942 municípios brasileiros. Nesse período foram encontradas cinco espécies de triatomíneos no estado do Ceará, *P. lutzi*, *P. megistus*, *R. nasutus*, *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata*. Com exceção de Santana do Cariri, todos os outros municípios trabalhados no presente estudo foram notificadas quanto à presença do *R. nasutus* no intradomicílio, sendo esta espécie considerada por Alencar (1987) a quarta mais capturada no Ceará.

Em todas as áreas trabalhadas neste projeto, após a coleta dos triatomíneos nas palmeiras, os insetos eram apresentados ao proprietário da localidade e grande parte da população local. Quase a totalidade desses moradores não reconheceu o *R. nasutus*, e não sabiam que esta espécie trata-se de um vetor da doença de Chagas, embora os dados do PCDCh demonstrem sua ocorrência no peridomicílio (entre 2003 e 2005). Nos últimos anos, na região da Chapada do Araripe, *R. nasutus* é considerada a segunda espécie mais capturada no peridomicílio, com presença também no intradomicílio, perdendo apenas para o *T. pseudomaculata*. Nas localidades trabalhadas, muitos moradores fizeram referência sobre o encontro dentro das casas de um único “procotó”, de coloração preta e de porte maior que, possivelmente, de acordo com as espécies de ocorrência no Ceará parece ser *P. megistus*.

MÉTODOS DE COLETA DOS TRIATOMÍNEOS

Recentemente, Sarquis et al (2004) trabalhando no município de Jaguaruana, região de caatinga no nordeste do Ceará, encontraram *T.*

brasiliensis, *T. pseudomaculata*, *R. nasutus* e *P. lutzi* nos ambientes artificiais (peri e intradomicílio). Destas, somente o *P. lutzi* não foi notificado dentro das casas. A coleta dos triatomíneos no ambiente silvestre foi realizada com a utilização de armadilhas (Noireau et al, 2002), apenas na palmeira carnaúba, a única presente na região. Foram investigadas 523 palmeiras em quatro localidades (infestação de 24,9%) e a única espécie de triatomíneo encontrada nas carnaúbas foi o *R. nasutus*, com índice de infecção de 25%, entretanto o índice global de infecção do *R. nasutus*, incluindo todos os ecótopos analisados, foi de 27,2%. A presença constante do *R. nasutus* no peri e intradomicílio, juntamente com os dados do PCDCCh, reforçam a possibilidade desta espécie ser considerada uma potencial vetora da doença de Chagas humana e entre os reservatórios silvestres.

VARIAÇÃO CROMÁTICA EM R. NASUTUS

A distribuição geográfica do *R. nasutus* é restrita à região Nordeste brasileira, englobando os Estados do Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte. (Lucena & Lima-Borba, 1977; Carcavallo et al, 1998; Galvão et al, 2003) Embora *R. nasutus* esteja incluído em um complexo de espécies, os espécimes coletados foram facilmente identificados através da morfologia, embora tenha sido observada ligeira variação cromática. Os triatomíneos coletados nas carnaúbas apresentaram coloração padrão de acordo com a descrição da espécie (avermelhada) (Lent & Wygodzinsky, 1979) enquanto os insetos das demais espécies de palmeiras apresentaram coloração castanha. Gaunt & Miles (2000) suspeitam que a variação no padrão de coloração dos triatomíneos, principalmente de algumas espécies do gênero *Rhodnius*, pode ser um indicativo da influência do habitat (espécie de palmeira) em relação aos triatomíneos. Nossas observações em campo corroboram com essa teoria, pois principalmente nas carnaúbas a coloração avermelhada dos *R. nasutus* (ninfas e adultos) é extremamente semelhante às fibras existentes na copa das palmeiras, ao caule e à base das folhas, possibilitando que *R. nasutus* se camufle nessas estruturas da palmeira (figura 5, página 34). Para

as demais palmeiras de tronco e axilas foliares mais escuras, *R. nasutus* também apresentaram padrão mais escuro.

R. nasutus é apontada por Abad-Franch et al (2005) como uma espécie especialista, associada apenas à palmeira carnaúba e ninhos de pássaros. No entanto, a partir do presente estudo, podemos incluir o *R. nasutus* juntamente com outras espécies do gênero (e.g. *R. neglectus*, *R. pictipes* Stål, 1872, *R. prolixus*, *R. robustus*), no grupo das espécies generalistas, pois foi encontrada nas cinco espécies de palmeiras pesquisadas na região da Chapada do Araripe, sendo a macaúba-barriguda sem nenhuma informação na literatura, até então, sobre infestação triatomínica.

PALMEIRAS COMO O ECÓTOPO PARA R. NASUTUS

Cada espécie de palmeira apresenta uma arquitetura própria e representa um ecossistema muito peculiar. Entretanto, em todas as cinco espécies de palmeiras, a grande maioria dos triatomíneos foi capturada entre a bainha foliar e, às vezes, no início do pecíolo.

Como um dos objetivos do presente trabalho foi determinar a densidade populacional entre as espécies de palmeiras, a metodologia utilizada através da dissecação das palmeiras e coleta manual dos triatomíneos foi a mais adequada, pois outras metodologias (coleta manual, sem dissecação, na copa das palmeiras ou utilização de armadilhas) podem não garantir a captura total da fauna triatomínica. Uma vez que os barbeiros encontram-se em locais de difícil acesso para a captura sem dissecação, utilizada por Gurgel-Gonçalves et al (2004a), e devido ao grande porte de algumas espécies de palmeiras, a utilização de armadilhas, como feito por Sarquis et al (2004), pode não atrair todos os triatomíneos.

Somente recentemente algumas espécies de palmeiras em outras regiões do Ceará (Serra da Meruoca) estão sendo estudadas em relação à sua associação com triatomíneos do gênero *Rhodnius* onde destacam-se o babaçu em regiões serranas e a carnaúba na caatinga (Diotaiuti et al., 2005).

Palmeiras do gênero *Attalea* já vêm sendo estudadas em várias regiões brasileiras e em outros países das Américas Central e do Sul, servindo como ecótopo para várias espécies de triatomíneos, principalmente do gênero *Rhodnius* (Barretto, 1979; Romana et al., 1999; Teixeira et al., 2001; Diotaiuti et al., 2005; Sanchez-Martin et al., 2006). Romaña et al (1999) investigando possíveis ecótopos silvestres de *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 no Panamá, representados por cinco espécies de palmeiras, apontam a *Attalea butyracea* como o principal ecótopo deste triatomíneo na região, principalmente devido à alta densidade triatomínica encontrada nesta palmeira. No presente trabalho, babaçu foi a palmeira que obteve a maior infestação por *R. nasutus*, maior densidade triatomínica na região da Chapada do Araripe, bem como uma grande diversidade de possíveis fontes alimentares (aves e mamíferos). Dados semelhantes já foram descritos por Barreto (1979) em Uberaba, Minas Gerais em babaçus infestados por *R. neglectus*. Os triatomíneos foram capturados no tronco das palmeiras, debaixo das bainhas das folhas, mas parece que entre as espécies de palmeiras estudadas, babaçu apresentou o maior número de barbeiros nos cachos dos cocos e brácteas. A forma de inserção das folhas do babaçu no caule, constituindo um ambiente aparentemente bastante protegido, provavelmente permite maior estabilidade microclimática, servindo de abrigo para animais hospedeiros da doença de Chagas e refúgios para os triatomíneos. Lorenzo et al., (2003) trabalhando com várias espécies de palmeiras no estado do Tocantins, e utilizando sensores programáveis de temperatura e umidade, demonstram que as palmeiras do gênero *Attalea* possuem menor variação climática, mantendo um microclima muito estável e favorável para os triatomíneos.

Por outro lado, a macaúba-barriguda foi a espécie de palmeira com o menor índice de infestação. Diotaiuti & Dias (1984) estudando outra espécie de macaubeira (*Acrocomia sclerocarpa*, hoje *A. aculeata*) em municípios da periferia de Belo Horizonte, Minas Gerais, encontraram um índice de infestação de 60,5% por *R. neglectus*, estando algumas palmeiras co-habitadas por *P. megistus*. Embora tenham sido encontradas várias possíveis fontes de alimentação para *R. nasutus* nas macaubeiras da região da Chapada do Araripe, talvez o que justifica sua menor taxa de infestação em relação às

demais palmeiras seja a presença de enormes espinhos, distribuídos por toda a palmeira, desde o início do caule até a bainha foliar, pecíolos e folhas, o que pode dificultar a instalação de um número maior de animais que sirvam de fontes de alimentação para os barbeiros. Nesta espécie de palmeira, a variação microclimática na axila foliar foi ampla, fato já demonstrado para *A. aculeata* por Lorenzo et al (2003) em Tocantins, o que possivelmente pode estar relacionado a uma arquitetura da planta que constitua um ambiente menos estável.

Embora a infestação encontrada nos buritis tenha sido alta (90%), a densidade triatomínica foi a mais baixa entre as espécies de palmeiras pesquisadas (19 triatomíneos). Esta palmeira é mais difícil para a coleta dos triatomíneos, por dois motivos: i) devido ao seu grande porte, tendo as bases foliares muito grandes, exigindo a movimentação da palmeira durante todo o trabalho de dissecação da mesma, e ii) local de ocorrência: os buritis ocorrem em solos alagados (brejos) e pantanosos, sendo popularmente conhecida como palmeira-do-brejo. Em algumas localidades, muitas famílias em Santana do Cariri-CE vivem da extração da polpa do fruto do buriti para a venda ou da fabricação do doce. Assim, somente era permitida a derrubada dos espécimes machos, que não produzem os cachos dos cocos, limitando o estudo às palmeiras com menor número de esconderijos para os triatomíneo, ocasionando uma sub-avaliação da infestação. Além disso, também podem influenciar nos resultados: i) o formato das folhas do buriti é em forma de leque e os pecíolos formam uma espécie de “calha”, onde acumula água no interior da palmeira, local onde os barbeiros ficam alojados ii) por ocorrer em solos pantanosos, e por apresentar a copa aberta, no momento da queda da palmeira a região interna de alguns dos pecíolos, bem próximos à axila foliar fica preenchida de lama, impossibilitando a procura dos triatomíneos.

Todas as palmeiras estudadas foram capazes de amenizar a temperatura na axila das folhas, em relação ao ambiente externo, reduzindo claramente as amplitudes, principalmente a amplitude máxima, favorecendo a infestação triatomínica. Em relação às medianas, não foram estatisticamente diferentes do ambiente externo as temperaturas das axilas das folhas do buriti e carnaúba.

Assim como o buriti, as folhas da carnaúba são em formato de leque (palmatipartida), no entanto, com bainhas bem menores e estreitas, inseridas alternadamente ao longo do caule, permitindo maior entrada de radiação solar por toda a copa. As temperaturas na axila foliar foram as maiores registradas entre todas as palmeiras investigadas e com elevada amplitude, variando a temperatura de acordo com o meio externo, mas, ainda assim, mantendo maior umidade em relação ao ambiente. Provavelmente, um fator determinante para a ocorrência de *R. nasutus* nas carnaúbas seja a umidade do ar, já que os artrópodes perdem mais água em ambientes mais secos, utilizando o fechamento dos espiráculos para o seu equilíbrio hídrico (Edney, 1967). A palmeira carnaúba é incriminada como ecótopo natural de *R. nasutus*. Silva & Silva (1989) verificando a influência da temperatura na biologia deste triatomíneo, demonstrou uma significativa redução no ciclo evolutivo quando os insetos eram mantidos a 30°C (comparados com 25°C). Nesta temperatura, além da diminuição no ciclo, os insetos ingeriam maior quantidade de sangue e havia maior fecundidade. Considerando que na carnaúba as condições sejam semelhantes a este experimento no laboratório, pode-se concluir pela grande adaptação do *R. nasutus* a esta palmeira, permitindo-lhe sobreviver em condições inviáveis para outras espécies de triatomíneos. Provavelmente, um fator importante determinação da densidade triatomínica nas palmeiras seja a disponibilidade de fontes alimentares e refúgios para os insetos. A carnaúba foi a única espécie de palmeira que não apresentou triatomíneos infectados. Dentre as cinco espécies de palmeiras pesquisadas, a arquitetura da carnaúba configura menor número de esconderijos para os triatomíneos, o que também pode estar relacionado à população de vertebrados que buscam abrigo na copa desta palmeira, interferindo negativamente na infecção dos triatomíneos. A distribuição desta palmeira foi restrita às menores altitudes (cerca de 360 metros), em solos arenosos, muitas vezes em locais alagados no período chuvoso, ensolarados e com elevadas temperaturas. Trata-se de uma palmeira que, na região da Chapada do Araripe, é preservada por muitos moradores que vivem do artesanato realizado a partir das folhas jovens, confeccionando chapéus e outros objetos. É interessante assinalar que a coleta destas folhas é realizada subindo-se na palmeira e apoiando o abdômen na copa da mesma

para equilibrar-se. Considerando a hiperatividade de *R. nasutus*, pode ser que neste momento haja possibilidade do inseto picar o indivíduo. Este fato pode ser interessante e merece investigação.

O índice de infestação dos catolés foi igual ao do buriti (90%), mas diferiu significativamente em relação à densidade populacional, sendo a segunda palmeira com maior número de *R. nasutus* coletados. O índice de infecção dos triatomíneos foi de 19,6%. Pelas limitações da bateria de anti-soros utilizadas para o processamento da reação de precipitina, não foi possível comprovar a importância de alguns animais encontrados nas copas das palmeiras como fonte de alimentação para os triatomíneos, conforme os resultados obtidos por Diotaiuti & Dias (1984) em Minas Gerais. Em um ninho de bem-te-vi (*Pitangus sulphuratus*) presente em um catolé foram encontrados 32 espécimes de *R. nasutus*, quase todos ingurgitados. Na mesma palmeira, alguns triatomíneos estavam infectados. Este fato demonstra que hospedeiros da DC freqüentam as palmeiras. Neste caso, vários moradores das localidades trabalhadas no município de Crato, relataram a existência de marsupiais (gambás) nas localidades, que provavelmente possam atuar como agentes dispersores da DC e até mesmo, dos triatomíneos no ambiente silvestre. Catolé foi a segunda espécie de palmeira com maior número de triatomíneos e apresentou em quase todos os espécimes répteis e anfíbios.

Abad-Franch et al (2005) trabalhando com *Phytelephas aequatorialis* infestadas por *R. ecuadoriensis* Lent & León, 1958, região oeste do Equador, correlacionaram a quantidade de matéria orgânica em decomposição nas palmeiras (folhas mortas, fibras) e a densidade triatomínica. Estes autores encontraram maior densidade em palmeiras com maior quantidade de matéria orgânica. Apesar desta correlação não ter sido observada neste estudo em campo, nossas observações parecem estar de acordo com estes dados, considerando-se que quanto maior a palmeira, maior é a quantidade de matéria orgânica disponível.

R. nasutus é considerada uma espécie de triatomíneo em vias de adaptação ao ambiente artificial. Na região estudada, esta espécie tem sido freqüentemente coletada em ambientes artificiais conforme demonstram os dados do PCDCh, inclusive de exemplares infectados pelo *T. cruzi*. Sarquis et

al (2004) apontam que a presença do *R. nasutus* no intradomicílio seja devido à proximidade das palmeiras às residências. Desta forma, os insetos possivelmente invadem o intradomicílio a procura de alimento, atraídos à noite pela luz, conforme já descrito na região amazônica para o *R. brethesi* (Coura et al., 1994).

PREFERÊNCIAS ALIMENTARES DOS TRIATOMÍNEOS

Apesar do hábito hematófago obrigatório dos triatomíneos, Brumpt (1914) e Lent & Wygodzinsky (1979) relatam a possibilidade de cleptofagia, e até mesmo o canibalismo, entre estes insetos. Vários estudos têm demonstrado a preferência alimentar dos triatomíneos no ambiente silvestre e ambientes artificiais, assim a avaliação do comportamento alimentar dos triatomíneos torna-se uma ferramenta de pesquisa importante para o esclarecimento da epidemiologia da DC. Algumas espécies de triatomíneos geralmente estão associadas a poucas fontes de alimentação, enquanto outras espécies são bastante ecléticas. Diotaiuti & Dias (1984) verificando as fontes alimentares dos *R. neglectus* capturados em macaubeiras nas proximidades de Belo Horizonte-MG, demonstram que esta espécie de triatomíneo é bem eclética. O estudo da reação de precipitina reagiu com animais de sangue frio, aves e mamíferos, incluindo o homem. Entretanto, o sangue de ave foi o alimento mais constante para *R. neglectus*. Barretto (1979) avaliando as fontes alimentares de triatomíneos em diversas espécies de palmeiras encontraram maior frequência em sangue de gambá, morcegos e roedor, conforme indicam os resultados da precipitina, sendo estes animais importantes veiculadores de tripanosomatídeos. Em nossos estudos, utilizando a metodologia da reação de precipitina e testando as amostras contra anti-soros de ave, cão, gambá, gato, humano, porco e roedor, somente foi possível a identificação de duas fontes alimentares (ave e gambá) nas cinco espécies de palmeiras estudadas. Todos os anti-soros testados reagiram ao respectivo soro homólogo diluído, a pelo menos, 1:10.000 e não reagiram aos soros heterólogos diluídos a 1:10, demonstrando alta sensibilidade da técnica. Cinquenta e dois espécimes não

reagiram aos anti-soros testados, dados que, provavelmente, podem sugerir a alimentação destes triatomíneos em outros vertebrados que não constam da bateria de anti-soros utilizada. Não deve ser completamente descartada a possibilidade de que os triatomíneos exerçam o predatismo, se alimentando da hemolinfa de outros artrópodes que fazem parte da biocenose da palmeira, como observado para outras espécies de triatomíneos (Salvatella et al., 1994; Sandoval et al., 2000; Lent & Wygodzinsky, 1979). Um fator importante observado a partir desses resultados foi o elevado número de insetos com material insuficiente, o que pode estar relacionado ao período de dispersão das aves e escassez de hospedeiros vertebrados nas palmeiras.

Talvez uma possível fonte de alimentação dos triatomíneos nas diferentes palmeiras da Chapada do Araripe sejam os morcegos. Somente nos catolés não foi observada a presença deste animal e nos buritis, era constante sua presença, sendo contabilizados mais de 30 morcegos em uma única palmeira dissecada.

TRYPANOSOMA CRUZI e TRYPANOSOMA RANGELI

O *T. rangeli* foi anteriormente descrito no Nordeste brasileiro por Lucena & Vergetti (1973) em fezes de *P. megistus*, no estado de Alagoas, e por Barrett & Oliveira (1977) em *R. domesticus*, na Bahia, com base em características morfológicas. Possivelmente, a transmissão do *T. cruzi* e do *T. rangeli* aos triatomíneos na região da Chapada do Araripe está associada fortemente ao gambá, conforme demonstram os dados de precipitina. O índice de infecção por tripanosomatídeos encontrado no tubo digestivo dos triatomíneos foi de 16,8% (n=64). O *T. rangeli* é um parasito patogênico para os triatomíneos e o único capaz de se instalar na hemolinfa e glândulas salivares dos triatomíneo (D'Alessandro & Saraiva, 1992). Optamos em fazer o exame da hemolinfa somente no LATEC, pois o isolamento destes necessita ser imediato e em condições estéreis. Desta forma, foi possível examinar apenas os insetos sobreviventes (n=26). O índice de infecção pelo *T. rangeli* encontrado na hemolinfa foi de 7,7%. Devido à grande variabilidade morfológica que *T. rangeli*

apresenta nas diferentes formas evolutivas, o diagnóstico específico é difícil por meio da morfologia. Além disso, também dificulta o diagnóstico na possibilidade de infecções mistas com o *T. cruzi*, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no inseto vetor. Pelas facilidades oferecidas pela técnica da biologia molecular via PCR, a caracterização dos parasitos isolados neste trabalho foi realizada utilizando como marcador molecular, uma região intergênica do gene do mini-exon (Souto et al, 1996; Grisard et al, 1999). Esta metodologia mostrou-se específica tanto para a caracterização das cepas de *T. cruzi*, quanto para *T. rangeli*, não apresentando reações cruzadas, nem resultados duvidosos. Dois espécimes de *R. nasutus* estavam com infecção mista, porém em nenhum destes exemplares o *T. rangeli* chegou a invadir as glândulas salivares.

Cepas de tripanosomatídeos podem apresentar diferentes comportamentos nos insetos vetores. Machado et al (2001), testando a suscetibilidade de *R. prolixus*, *R. neglectus*, *R. nasutus* e *R. domesticus* com três diferentes cepas de *T. rangeli*, demonstraram maior infectividade nas espécies cuja distribuição geográfica se sobrepõe ao local de descrição das cepas. Sessenta dias após o repasto sangüíneo infectante em camundongos, 100% dos *R. domesticus* apresentaram nas glândulas salivares formas de *T. rangeli* de uma cepa isolada de um roedor em Santa Catarina; no mesmo período pós-repasto, esta mesma espécie de triatomíneo não apresentou nenhum inseto com infecção nas glândulas salivares com as cepas Macias, isolada de paciente chagásico, via xenodiagnóstico e Choachi, isolada de *R. prolixus* (Steindel et al, 1994). Guhl et al (2002) observaram que cepas de *T. rangeli* isoladas de *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999 e de *R. pallescens* foram incapazes de invadir e se desenvolverem dentro das glândulas salivares de *R. prolixus*, o que reforça a existência de um relacionamento complexo entre parasito-vetor. Vallejo et al (2003) divide *T. rangeli* em dois grupos filogenéticos associados com vetores específicos, na Colômbia e em outros países Latino Americanos. As espécies de *Rhodnius* são mais suscetíveis à infecção pelo *T. rangeli* (D'Alessandro & Hincapie, 1986), já sendo relatada infecção experimental de 12 entre 14 espécies testadas ou encontradas naturalmente infectadas (Guhl et al., 2002). No presente estudo, o fato de *T. rangeli* não ter sido detectado nas glândulas salivares de *R. nasutus*

pode estar relacionado à suscetibilidade da espécie de triatomíneo à cepa ou relacionado com o tempo de infecção.

MORFOMETRIA

A morfometria geométrica pode ser considerada uma ferramenta útil na detecção da variação fenotípica resultante de causas genéticas ou ambientais. Esta técnica possui a vantagem sobre a morfometria tradicional, pois a morfometria geométrica é fundamentada em uma estatística denominada Análise de Procrustes. Nesta análise, a partir das coordenadas dos pontos de referência, pode-se construir uma configuração geométrica da estrutura analisada (Jaramillo & Dujardin, 2006). A partir de nossas análises, o tamanho centróide foi estatisticamente diferente entre os grupos. Os triatomíneos procedentes dos buritis foram nitidamente maiores aos demais grupos e os insetos do grupo babaçu, menores aos demais. Jaramillo & Dujardin (2006) admitem que as causas mais freqüentes de tamanho entre indivíduos da mesma espécie sejam fisiológicas.

Na análise discriminante, a primeira variável de conformação é responsável pela maior parte da variabilidade. Em nosso estudo, esta variável contribuiu com 55% e foi possível observar uma ligeira separação dos insetos procedentes de babaçus e macaúbas. A segunda variável de conformação contribuiu com 29% da variabilidade dos grupos, mas não foi possível observar separação entre os mesmos. Na análise discriminante, a árvore UPGMA, obtida pelas distâncias de Mahalanobis, apontou o grupo de *R. nasutus* procedentes dos buritis como sendo o mais externo, demonstrando, possivelmente, ser este o grupo mais distante geneticamente. No entanto, os demais grupos formaram agrupamentos, sendo o babaçu mais próximo geneticamente de macaúba, e carnaúba mais próximo do catolé. Possivelmente, este fato pode ser explicado pela distribuição geográfica das espécies de palmeiras entre os grupos estudados. Na região da Chapada do Araripe, babaçu e macaúba são palmeiras que ocorrem em simpatria. Alguns dos triatomíneos coletados nessas duas espécies de palmeiras foram

procedentes da mesma localidade. Assim, o fato destes grupos de insetos serem muito próximos geneticamente pode ser devido ao fluxo gênico de *R. nasutus* entre babaçu e macaúba, o que merece ser investigado com maior cautela utilizando marcadores moleculares.

Diotaiuti et al (2005) sugerem que as características ambientais de cada espécie de palmeira possam ser um fator relevante para o tamanho dos insetos. Estes autores, utilizando a morfometria tradicional da cabeça e comparando *R. nasutus* procedentes de babaçus e de carnaúbas, verificaram diferenças no tamanho dos insetos, sendo os triatomíneos dos babaçus muito maiores que os das carnaúbas. Neste estudo, nossos dados apontam como maiores os insetos dos buritis. Esta espécie de palmeira ocorre em grande quantidade no município de Santana do Cariri, aproximadamente 100km de distância das demais espécies de palmeiras, e muito próxima à Floresta Nacional do Araripe, local com grande diversidade de animais, incluindo mastofauna. Possivelmente, o isolamento geográfico e a diversidade de fontes alimentares para os triatomíneos ao redor das localidades trabalhadas possam ter influenciado no tamanho dos barbeiros.

CONSIDERAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Os dados aqui apresentados mostram a existência de uma grande população de *R. nasutus* nos palmeirais da Chapada do Araripe. Considerando a extensão destes palmeirais, a densidade triatomínica deve ser, provavelmente, surpreendente, principalmente nos babaçus e catolés. Estes fatores associados aos dados do PCDCh, faz da Chapada do Araripe uma importante área de transmissão da doença de Chagas silvestre. Fora o processo já bem descrito de colonização das casas e transmissão vetorial do *T. cruzi*, os achados de formas alternativas de transmissão na Amazônia (Coura et al., 1994) e no Equador (Aguilar et al., 1999) devem ser investigados, na perspectiva da vigilância epidemiológica da DC na Chapada do Araripe, conforme já sugerido por Sarquis et al. (2004).

6. CONCLUSÕES

- A única espécie de triatomíneo encontrada em 50 palmeiras da região da Chapada do Araripe foi *R. nasutus*.
- Foi observada diferença cromática nos *R. nasutus* das diferentes espécies de palmeiras. Os triatomíneos coletados nas carnaúbas foi o único grupo que apresentou coloração avermelhada, típica da descrição da espécie.
- A infestação das palmeiras pelos triatomíneos na amostra estudada foi elevada (86%).
- As maiores densidades triatomínicas estão relacionadas às palmeiras babaçu e catolé (mediana de 19 e 11,5 triatomíneos/palmeira positiva, respectivamente).
- Neste estudo, em todas as espécies de palmeiras, exceto na carnaúba foram encontrados *R. nasutus* naturalmente infectados pelo *T. cruzi*.
- As cepas de *T. cruzi* isoladas dos triatomíneos pertenciam ao grupo I, típica de cepas circulantes no ambiente silvestre.
- Relatamos pela primeira vez a ocorrência de *T. rangeli* no estado do Ceará, parasitando *R. nasutus*, ampliando ainda mais a área de ocorrência deste tripanosomatídeo.
- Neste estudo a reação de precipitina foi reagente em 70 (46,1%) insetos, sobre um total de 152 examinados, sendo 13,2% reagentes para ave e 34,9% reagentes para gambá. Outras possíveis fontes de alimentação como anfíbios, aves, cobra, lagartos e morcegos foram detectadas em 29 das 50 palmeiras estudadas.
- Os dados de precipitina sugerem que os gambás foram potenciais reservatórios do *T. cruzi* e *T. rangeli* no ambiente silvestre.
- Todas as espécies de palmeiras foram capazes de amenizar a temperatura da axila das folhas, local principalmente colonizado por triatomíneos em relação ao ambiente externo, tendo os babaçus apresentado menores amplitudes.
- Na análise morfométrica, os triatomíneos procedentes dos buritis foram maiores que os demais grupos de insetos.

- *R. nasutus* é um triatomíneo não somente adaptado à caatinga, mas também ocorre em regiões serranas, consideradas como remanescentes de matas úmidas e infestando as mais diversas espécies de palmeiras.
- Nossos resultados sugerem a existência de uma enorme área de transmissão enzoótica de *T. cruzi* e *T. rangeli* mantida pelo *R. nasutus* com capacidade de infestação em ambientes artificiais, o que pode acarretar risco para a população local.
- Sugerimos às autoridades locais a instalação de vigilância entomológica na região, com treinamento das comunidades e da equipe de saúde para identificação, notificação e combate de focos triatomínicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-FRANCH, F; PAUCAR, A; CARPIO, C; CUBA-CUBA, CA; VALENTE, MA; MILES, M.A. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: Implications for the Design of Control Strategies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(5): 611-620, 2001.

ABAD-FRANCH, F; PALOMEQUE, FS; AGUILAR, HM & MILES, MA. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Trop Med Intern Health*. 10: 1258-1266, 2005.

AGUILAR HM, ACAD-FRANCH F, RACINES J & PAUCAR A. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94: 387-393, 1999.

ALENCAR JE. História Natural da Doença de Chagas no Ceará. Imprensa Universitária, Universidade Federal do Ceará, Brasil, 1987.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94 (Suppl. I): 429-432, 1999.

BAGNOLI E. Projeto Araripe – 1ª parte: Conhecendo o Araripe: Atividades produtivas da população. Turismo, Ecoturismo, Turismo Cultural e Científico. In: *Projeto Araripe*. [s.l]: [s.n.], p. 292-318, 1998

BARRETT TV & OLIVEIRA TS. A *Trypanosoma* indistinguishable from *Trypanosoma rangeli* in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*. 71: 445-446, 1977.

BARRETT TV. Current research on Amazonian Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 (suppl I): 441-447, 1988

BARRETTO MP. Epidemiologia. In: Brener, Z. & Z. Andrade, *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap. 3, p. 89-151, 1979.

BRUMPT E. Importance du cannibalisme et de la coprophagie chez les Réduvidés hématophages (*Rhodnius*, *Triatoma*) pour la conservation des Trypanosomes pathogènes en dehors de l'hôte vertébré. Bull Soc Pathol Exot. 7: 702-705, 1914

CALZADA JE, PINEDA V, MONTALVO E, ALVAREZ D, SANTAMARIA AM, SAMUDIO F, BAYARD V, CACERES L & SALDANA A. Human trypanosome infection and the presence of intradomicile *Rhodnius pallescens* in the western border of the Panama Canal, Panama. Am J Trop Med Hyg. 74:762-5, 2006.

CAMARGO EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev Inst Med Trop São Paulo, 6(3): 93-100, 1964.

CARCAVALLO RU; CURTO DE CASAS SI; SHERLOCK IA; GALÍNDEZ GIRÓN I; JURBERG J; GALVÃO C, MENA SEGURA CA & NOIREAU F. Distribuição geográfica e dispersão altitudinal. In: *Atlas of Chagas' disease vector in the Americas*. (RU. Carcavallo, I. Galíndez Girón, J. Jurberg & H. Lent org.). Editora Fiocruz – Rio de Janeiro, vol. III: p.747-792, 1998.

CAVALCANTE A. Jardins suspensos no sertão. Scientific American Brasil, São Paulo, n. 32, janeiro, 2005

COSTA J & FELIX M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 102: 87-90, 2007.

COSTA J, ARGOLO A, FELIX M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Zootaxa 1385: 47-58, 2006.

COSTA VD, CAMPELLO NETO MSC, COSTA FILHO VD & SOUZA FJA. Projeto Araripe – 1ª parte: Recursos Naturais e Patrimônio: Recursos Hídricos. In: *Projeto Araripe*. [s.l]: [s.n.], p. 488-586, 1998

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 27(4): 251-253, 1994.

- D'ALESSANDRO A. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. In: Biology of Kinetoplastida. (WHR Lumsden and DA Evans, eds.), vol. 1. Academic Press, London, p.327-403, 1976.
- D'ALESSANDRO A & HINCAPIE, O. *Rhodnius neivai*: a new experimental vector of *Trypanosoma rangeli*. *Am J Trop Med Hyg.* 35: 512-514, 1986.
- D'ALESSANDRO A & SARAIVA NG. *Trypanosoma rangeli*. In: Parasitic Protozoa, 2nd ed., Vol. 2, Academic Press, San Diego. p. 1-54, 1992.
- DEANE LM. Novo hospedeiro de tripanosomas dos tipos *cruzi* e *rangeli* no Estado do Pará. O marsupial *Metachirops opossum opossum*. *Rev Bras Malar Doenças Trop.* 10: 531-541, 1958
- DIAS FBS, FARIA TCM, PAULA AS, LORENZO, MG, BEZERRA CM & DIOTAIUTI L. Variabilidade de *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera:Reduviidae) provenientes de carnaúbas e babaçus, Ceará, Brasil.. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre, RS, 2005.
- DIAS, JCP. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol Today*, 3: 336-341, 1987.
- DIAS JCP. Epidemiologia. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas, 2. ed. Rio Janeiro, Guanabara Koogan, p. 48-74, 2000.
- DIOTAIUTI L & DIAS JCP. Ocorrência e biologia do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em macaubeiras da periferia de Belo Horizonte-MG. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 293-301, 1984.
- DIOTAIUTI L, SILVEIRA AC & ELIAS M. Sobre o encontro de *Rhodnius prolixus* Stål, 1859, em macaubeiras. *Rev Bras Malar Doenças Trop*, 36: 11-14, 1984.
- DIOTAIUTI L, SILVEIRA AC, MATOS CA & ELIAS M. Estudo do *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 em ecótopos silvestres do Estado de Goiás, Brasil. XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo, 1985.

DIOTAIUTI L, SILVEIRA AC, ELIAS M & STEINDEL M. The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the state of Tocantins, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87(3): 451, 1992.

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, Brasil. In: *XLI Congresso Soc Bras Med Trop*, 2005, Florianópolis, SC. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 38. p. 44, 2005.

DUJARDIN JP & SLICE, DE. Contributions of Morphometrics to Medical Entomology. In: *Encyclopedia of Infectious Disease – Modern Methodologies*, 2006.

EDNEY EB. Water balance in desert arthropods. *Science*. 156: 1059-1066, 1967.

FELICIANGELI MD, DUJARDIN JP, BASTRENTA B, MAZZARRI M, VILLEGAS J, FLORES M, MUNOZ M. Is *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae) responsible for Chagas disease transmission in Western Venezuela? *Trop Med Int Health*. 7:280-7, 2002.

FERNANDES A. A Caatinga e sua flora. In: MONTEIRO S & KAZ L, Caatinga Sertão Sertanejos. Livroarte Editora. Rio de Janeiro. 255p. 1994.

FERREIRA MS, LOPES ER, CHAPDEIRO E, DIAS JCP & CHIARI E. Doença de Chagas. In: Veronesi R. & Focaccia R. (Ed.). *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu, cap. 93, p. 1175-1213, 1997.

FIGUEIREDO MA, SILVA AP, VERDE LWL & ALBUQUERQUE VM. Projeto Araripe – 1ª parte: Conhecendo o Araripe: Botânica. In: *Projeto Araripe*. [s.l]: [s.n.], p. 367-419, 1998

FILARD LS & BRENER, Z. Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *J Protozool*, 22(3): 398-401, 1975.

FORERO, D; WEIRAUCH, C; BAENA, M. Synonymy of the reduviid (Hemiptera: Heteroptera) genus *Torrealbaia* (Triatominae) with *Amphibolus* (Harpactorinae), with notes on *Amphibolus venator* (Klug, 1830). *Zootaxa*, 670: 1-12, 2004.

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

GALVÃO C & ANGULO VM. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa*, 1241: 61-68, 2006

GAMBOA J. Comprobación de *Rhodnius prolixus* extradoméstico. *Bol Inf Dir Malar San Amb*. Vol. 1. n. 5. 139-142, 1961.

GARCIA BA, CARRASCO HJ, SCHOFIELD CJ, STTHARD JR, FRAME IA, VALENTE SAS & MILES MA. Random Amplification of Polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol.*, 35 (1): 38-45, 1998.

GAUNT M & MILES M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated Trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 95: 557-565, 2000.

GRISARD, EC. Estudo da variabilidade do gene do mini-exon e produção de cepas transfectadas de *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. DCS Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 206p. 1999.

GUHL F, JARAMILLO C, CARRANZA JC, VALLEJO GA. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Arch. Med. Res*. 33, 362–370, 2002.

GURGEL-GONÇALVES R, DUARTE MA, RAMALHO ED, PALMA ART, ROMANHA 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*. 37: 241-247, 2004a.

GURGEL-GONÇALVES R, RAMALHO ED, DUARTE MA, PALMA ART, ABAD-FRANCH, F CARRANZA JC & CUBA-CUBA CA. Enzootic Transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 46: 323-330, 2004b.

HARRY M. Use of the process of the pygophore in identification of *Rhodnius nasutus*, *R. neglectus*, *R. prolixus* and *R. robustus* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann Trop Med Parasit*. 87: (3), 277-282, 1993.

HARRY M. Morphometric variability in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Jpn J Genet*. 69: 233-250, 1994.

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

JARAMILLO N, CASTILLO D, WOLFF M. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 667-673, 2002.

JARAMILLO N & DUJARDIN JP. Análisis Morfométrico: significado biológico del tamaño y la conformación. Belo Horizonte; [texto da Disciplina Morfometria Geométrica – Curso de Pós-Graduação – Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ], 2006.

LENT H & JURBERG J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859, com um estudo sobre genitália das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Rev Bras Biologia*, 29: 487-560, 1969.

LENT H & WYGODZINSKY P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Amer Mus Nat Hist.*, vol 163. New York, 1979.

LORENZI H, SOUZA HM, MEDEIROS-COSTA JT; CERQUEIRA LSC, BEHR N. Palmeiras no Brasil nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, 303p. 1996.

LORENZI H, SOUZA HM, CERQUEIRA LSC, COSTA JTM & FERREIRA E. Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas. Nova Odessa, SP: Ed. Plantarum, 416p. 2004.

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. In: XXXIX Congresso da Soc Bras Med Trop Belém, PA. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 36. p. 425-425, 2003.

LUCENA, DT & LIMA-BORBA, H. *Panstrongylus megistus leucofasciatus* Lucena, 1959 e *Rhodnius nasutus* Stål, 1859, (Hemiptera: Triatominae) em Pernambuco, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 19: 332-334, 1977.

LUCENA DT & VERGETTI JG. Infecção natural de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) por *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), no interior do Estado de Alagoas. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 15: 171-178, 1973.

MACHADO PE, EGER-MANGRICH I, ROSA G, KOERICH LB, GRISARD EC & STEINDEL M. Diferencial susceptibility of triatomines of the genus *Rhodnius* to *Trypanosoma rangeli* strains from different geographical origins. *Int J Paras*. 31: 632-634, 2001.

MILES MA, ARIAS JR, VALENTE SAS, NAIFF RD, SOUZA AA, et al. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazon basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 32: 1251-1259, 1983.

MONCAYO A. Chagas disease: Epidemiology and prospects for interruption of transmission in the Americas. *World Health Stat. Q*, 45: 276-279, 1992

MONTEIRO FA, BARRETT TV, FITZPATRICK S, CORDON-ROSALES C, FELICIANGELI D, BEARD CB. Molecular Phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecology*. 12: 997-1006, 2003.

NASCIMENTO JXN & NASCIMENTO ILS. Projeto Araripe – 1ª parte: Conhecendo o Araripe: Recursos Naturais e Patrimônio: Biodiversidade: Fauna – Aves. In: *Projeto Araripe*. [s.l]: [s.n.], p. 451-466, 1998

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 Silvatic Habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 61-63, 2002.

PANZERA, F; PÉREZ, R; HORNOS, S; PANZERA, Y; CESTAU, R; DELGADO, V & NICOLINI P. Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97: 515-518, 1996.

PAULA AS, DIOTAIUTI L, SCHOFIELD CJ. Testing the sister-group of the Rhodiniini and Triatomini (Insecta: Reduviidae: Triatominae). *Mol Phylog Evolution*. 35: 712-718, 2005.

PEREIRA DA SILVA LH & NUSSENZWEIG V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para camundongos brancos. *Folia Clin. Biol*. 20: 191-208, 1953.

PEREZ R, PANZERA Y, SCAFIEZZO S, MAZZELLA MA, PANZERA F, DUJARDIN JP & SCOVORTZOFF E. Cytogenetics as a tool for Triatominae species distinction (Hemiptera-Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 87: 353-361, 1992.

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*. Vol. 2. n. 2. 3-29, 1973.

POINAR JR, G. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae). The First Fossil Evidence of Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. *Vector-Borne and Zoonotic Disease*, 5(1): 72-81, 2005

RAMIREZ LE, MACHADO MI, MAYWALD PG, MATOS A, CHIARI E & SILVA EL. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 31:99-102, 1998.

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

- ROMANHA, AJ. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. DCS Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 110p. 1982.
- SALVATELLA R, CALEGARI L, BASMADJIAN Y, ROSA R, GUERRERO J, MARTINEZ M, MENDARO G, BRIANO D, MONTERO C, et al. Feeding pattern of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) (Hemiptera, Triatominae) in peridomiciliary habitats, of a rural area of Uruguay. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 36(4): 311-20, 1994.
- SANCHEZ-MARTIN MJ, FELICIANGELI MD, CAMPBELL-LENDRUM D, DAVIES CR. Could the Chagas disease elimination programme in Venezuela be compromised by reinvasion of houses by sylvatic *Rhodnius prolixus* bug populations? *Trop Med Int Health*. 11:1585-93, 2006.
- SANDOVAL CM, JOYA MI, GUTIERREZ R & ANGULO VM. Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. *Med Vet Entom*. 14: 100-101, 2000.
- SARQUIS O, BORGES-PEREIRA J, MAC CORD, JR; GOMES TF; CABELLO PH & LIMA MM. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceará, Brazil. I. Presence of triatomines and index of *Trypanosoma cruzi* infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99: 263-270, 2004.
- SCHEREIBER, G; BOGLIOLO AR & PINHO, AC. Cytogenetics of Triatominae: Caryotype, DNA content, nuclear size and heteropyknosis of autosomes. *Rev Bras Biol*. 32: 255-263, 1972.
- SCHOFIELD, CJ. Triatominae: Biologia y Control. *Eurocommunica Publications*: United Kingdom, 80p, 1994.
- SCHOFIELD CJ & DUJARDIN JP. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actual Biol*. 21(71): 183-199, 1999
- SHERLOCK, IA. Vetores. In: Brener Z & Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 42-88, 1979.
- SILVA IG & SILVA HHG. Influência da temperatura na biologia de triatomíneos. XI. *Rhodnius nasutus* Stal, 1859 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 84: 377-382, 1989.

SILVEIRA AC, FEITOSA VR & BORGES R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período de 1795/1983, Brasil. *Rev Bras Malar Doenças Trop*. 36: 15-312, 1984.

SILVEIRA AC & REZENDE DF. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 27 (suppl. III): 11-22, 1994.

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

SOARES, RPP; SANT'ANNA, MRV; GONTIJO, NF; ROMANHA, AJ; DIOTAIUTI, L. & PEREIRA, MH. Identification of morphologically similar *Rhodnius* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) by electrophoresis of salivary heme proteins. *Am J Trop Med Hyg*, 62 (1): 157-161, 2000.

SOLANO, P, DUJARDIN, JP, SCHOFIELD, CJ, ROMANHA, C, TIBAYRENC M. Isoenzymes as a tool for identification of *Rhodnius* species. *Res Rev Parasitology*, 56: 41-47, 1996.

SOUTO, R; FERNANDES, O; MACEDO, A; CAMPBELL, D; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetics lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 83: 141-152. 1996.

STEINDEL M, CARVALHO-PINTO JP, TOMA HK, MANGIA HR, RIBEIRO-RODRIGUES R, et al. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasytrix*) in Santa Catarina island, Santa Catarina state: first report of this trypanosome in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 86: 73-79, 1991.

STEINDEL M, DIAS NETO E, MENEZES CLP, ROMANHA AJ, SIMPSON AJG. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol*, 60: 71-80. 1993.

STEINDEL M, DIAS-NETO E, PINTO CJC, GRISARD EC, MENEZES CL, MURTA SMF, SIMPSON AJ & ROMANHA AJ. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Isoenzyme Analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Euk Microbiol*. 41: 261-267, 1994.

TEIXEIRA ARL, MONTEIRO OS, REBELO JM, ARGANARAZ ER, VIEIRA D, LAURIA-PIRES L, ET AL. Emerging Chagas disease: Trophic Network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerging Infectious Disease*. 7 (1): 100-112, 2001.

TIBAYRENC M, NEUBAUER K, BARNABE C, GUERRINI F, SKARECKY D & AYALA FJ. Characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 1335-1339, 1993

URBINA JA & DOCAMPO R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*. 19 (11): 495-501, 2003.

URREA DA, CARRANZA JC, CUBA-CUBA CA, GURGEL-GONÇALVES R, GUHL F, SCHOFIELD CJ, TRIANA O, VALLEJO GA. Molecular characterisation of *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius ecuadoriensis* in Peru, *R. colombiensis* in Colombia and *R. pallescens* in Panama, supports a co-evolutionary association between parasites and vectors. *Infect Genet Evol*. 5:123-9, 2005.

VALLEJO GA, GUHL F, CARRANZA JC, LOZANO LE, SÁNCHEZ JL, JARAMILLO JC, GUALTERO D, CASTAÑEDA N, SILVA JC & STEINDEL M. kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. *Acta Tropica*. 81: 77-82, 2002.

VINHAES, MC & DIAS, JCP. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 16 (supl. 2):7-12, 2000.

WHO. Control of Chagas disease. *WHO Technical Report Series* 811, Geneva. P. 95, 2003

WORLD BANK. World Development Report 1993. Investing in Health. Oxford University Press. New York, 329p, 1993.

8. ANEXOS

Anexo I: Autorização do IBAMA para derrubada das palmeiras.



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA
DIRETORIA DE FLORESTAS
COORDENADORIA DE GESTÃO DOS RECURSOS FLORESTAIS
COORDENADORIA DE MANEJO FLORESTAL – COMAF
SUPERINTENDÊNCIA ESTADUAL DO CEARÁ

LICENÇA PARA COLETA E TRANSPORTE

NÚMERO DA LICENÇA 003/2006	Nº DE REGISTRO NO IBAMA	PERÍODO DE VALIDADE 30/03/2006 a 29/03/2007	PROCESSO IBAMA 02007.002599/2005-02
-------------------------------	-------------------------	--	--

OBJETO:

- ☒ COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA)
☐ TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO
☒ OUTROS: Derrubada de palmeiras na quantidade prevista no projeto alvo do presente licenciamento.

FAVORECIDO:

- ☐ INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA
☒ PESQUISADOR
☐ EXPOSITOR/CONCURSO
☐ OUTROS:

FAVORECIDO: Fernando Braga Stehling Dias

NOME DO PROJETO: Ocorrência de *Rhodnius* spp (Hemiptera: Reduviidae) em diferentes palmeiras da Chapada do Araripe, Brasil.

INSTITUIÇÃO: Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ

ENDEREÇO: Avenida Augusto de Lima 1715 – Bairro Barro Preto – Cidade de Belo Horizonte – Estado de Minas Gerais

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO: Fernando Braga Stehling Dias

TRANSPORTADOR: não haverá transporte.

MEIO DE TRANSPORTE: não haverá transporte.

PROCEDÊNCIA / LOCAL DA COLETA / LOCAL DA PESQUISA: Área de Proteção Ambiental da Chapada do Araripe (Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí).

DESTINO: material a ser tratado no próprio local de coleta.

Nome da espécie / Família / Gênero	Quantidade por espécie	Partes da planta coletada
<i>Acrocomia intumescens</i> / Palmae /	280 (10/município)	-
<i>Attalea speciosa</i> / Palmae /	280 (10/município)	-
<i>Copernicia prunifera</i> / Palmae /	280 (10/município)	-
<i>Mauritia flexuosa</i> / Palmae /	280 (10/município)	-
<i>Syagrus oleracea</i> / Palmae /	280 (10/município)	-

OBSERVAÇÕES / CONDICIONANTES:

- Esta licença não autoriza o uso do material biológico para acessar informação de origem genética, contida no todo ou parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal; em substâncias provenientes do metabolismo desses seres vivos e de extratos obtidos desses organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticadas, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *in situ*, no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva, visando atividade exploratória para identificar componentes do patrimônio genético e informação sobre o conhecimento tradicional associado, com potencial de uso comercial.
- O Responsável pela Expedição deverá apresentar relatório final ao término da validade desta Licença, além de encaminhar cópia das publicações resultantes dos trabalhos objeto da presente licença.
- Esta licença não exige o pesquisador de cumprir o disposto na MP 2186-16/01 que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso a amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante autorização expressa do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN, nos termos da Medida Provisória nº 2186-16/2001 e Decreto nº 3945/2001.

LOCAL E DATA DE EMISSÃO

Fortaleza (CE), 30 de março de 2006.

AUTORIDADE EXPEDIDORA

Fernando Bonfim Braga

Gerente Executivo
IBAMA/CE

• VÁLIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO.

• ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:

- COLETA / TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO CONSTANTE EM PROJETO ESPECÍFICO APROVADO;
- COLETA / TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
- COLETA / TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO, NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL;
- COLETA / TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;
- EXPORTAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS.

• VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.

Outros pesquisadores: Alexandre Silva de Paula, Cláudia Mendonça Bezerra, Liléia Gonçalves Diotaiuti.

Esta Licença de Coleta e Transporte substitui a de número 001/2006, expedida em 10 de março de 2006.

Anexo II: Autorização do IBAMA para coleta e transporte de triatomíneos.

CONFERE COM O Original
Art. 22, § 3º, Lei nº 9.784/99


 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E DA AMAZÔNIA LEGAL
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS
 RENOVÁVEIS - IBAMA/CE
 DIRETORIA DE ECOSISTEMAS - DIREC
 LICENÇA PARA CAPTURA / COLETA / TRANSPORTE / EXPORTAÇÃO

Nº DA LICENÇA	Nº DE REGISTRO NO IBAMA-CE	PERÍODO DE VALIDADE	PROCESSO IBAMA
05/2006		10/03/06 a 31/11/07	02007.002599/2005-02

OBJETO: ☒ CAPTURA E /OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES / MATERIAL ZOOLOGICO ☒ TRANSPORTE DE ANIMAIS SILVESTRES / MATERIAL ZOOLOGICO ☐ COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA) ☐ TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUB-PRODUTOS DA FAUNA ☐ EXPOSIÇÃO E/ OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES ☐ OUTROS (ESPECIFICAR)	FAVORECIDO: ☐ ZOOLOGICO ☐ INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA ☒ PESQUISADOR ☐ EXPOSITOR/CONCURSO ☐ CRIADOURO COMERCIAL ☐ CRIADOURO CIENTÍFICO ☐ OUTROS (ESPECIFICAR)
---	--

FAVORECIDO – ESPECIFICAÇÃO: Fernando Braga Stehling Dias (estudante de mestrado)

ENDEREÇO PROFISSIONAL: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas. Tel (31) 3295-3566 r. 161. E-mail: Fernando@cpqrr.fiocruz.br

ENDEREÇO RESIDENCIAL: Rua Holanda Lima, 203/204, Gutierrez. 30190002. Belo Horizonte, MG. Tel: (31) 3335-5445/ Fax: (31) 9999-1822.

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO (NO CASO DE COLETA / CAPTURA): Fernando Braga Stehling Dias

PROCEDÊNCIA/LOCAL DA CAPTURA / LOCAL DA PESQUISA: Municípios inseridos na Chapada do Araripe

DESTINO: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Belo Horizonte-MG.

QUANTIDADE ESPÉCIMES / TIPO (POR ESPÉCIE)	NOME CIENTÍFICO (FAMÍLIA)	NOME COMUM
DIVERSAS	<i>Rhodnius neglectus</i>	Barbeiro
DIVERSAS	<i>Rhodnius nasutus</i>	Barbeiro
DIVERSAS	<i>Triatoma</i> sp.	Barbeiro

OBS: EQUIPE DO PROJETO (PESSOAS ENVOLVIDAS): Fernando Braga Stehling Dias, Liléia Gonçalves Diotaiuti, Cláudia Mendonça Bezerra e Alexandre Silva de Paula

1. Esta licença autoriza a captura e coleta de animais silvestres ou material biológico para fins de pesquisa científica.

2. Esta licença não exime o pesquisador de cumprir o dispositivo na Medida Provisória nº 2186-16/01, que versa sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso a amostra de componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante autorização expressa do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), nos termos da Medida Provisória nº 2.186-16/2001 e Decreto nº 3.945/2001.

Fernando Bonfim Braga
 Gerente de Registro
 IBAMA/CE

LOCAL E DATA DE EMISSÃO: FORTALEZA/CE, 10/03/2006

ASSINATURA E CARIMBO/AUTORIDADE EXPEDIDORA

Fco. Antônio de Brito
 Analista Ambiental Veterinário
 IBAMA/CE
 CADASTRADO

VALIDA EXCLUSIVAMENTE NO TERRITÓRIO BRASILEIRO

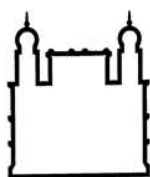
ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE ESPÉCIES AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, SALVO QUANDO ESPECIFICADO

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO

CAPTURA/COLETA/TRANSPORTE EM ÁREA DE DOMÍNIO PRIVADO SEM O CONSENTIMENTO EXPRESSO OU TÁCITO DO PROPRIETÁRIO NOS TERMOS DOS ARTIGOS 594, 595, 596, 597 E 598 DO CÓDIGO CIVIL.

Anexo III: Modelo da ficha de coleta de triatomíneos utilizada neste projeto.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

FICHA DE COLETA DE TRIATOMÍNEOS EM CAMPO

Data: ____/____/____

Horário Início: _____ Término: _____

Condição Climática: ☐ Sol ☐ Parcial. Nublado ☐ Nublado ☐ Chuvoso

Localidade (município): _____

Número Palmeira: _____

Espécie de Palmeira: _____

Tamanho da Palmeira: _____

Espécie de Palmeira mais próxima: _____

Altitude: _____

Referência Geográfica: _____

Fauna Associada à palmeira: _____

Palmeira: ☐ Positiva☐ Negativa

Ovos: _____

1º estágio: _____

2º estágio: _____

3º estágio: _____

4º estágio: _____

5º estágio: _____

Fêmeas: _____

Machos: _____

Espécies de Triatomíneos Capturadas: _____

Temp. à sombra: _____

Umidade à sombra: _____

Temp. na copa após derrubada: _____

Umidade: _____

Temp. axila foliar: _____

Observações: _____

Av. Augusto de Lima, 1715, 30190-002 Belo Horizonte - MG - Brasil

Tel: (31) 3349-7700 (ramal 7761) - Fax: (31) 3295-3115

e-mail: fernando@cpqrr.fiocruz.br

Anexo IV: Protocolo utilizado para a extração do DNA genômico dos tripanosomatídeos pela técnica de fenol-clorofórmio álcool-isoamílico.

EXTRAÇÃO DE DNA – MÉTODO DE FENOL-CLOROFÓRMIO

1. Adicionar ao material (pellet de *T. cruzi* ou sangue) volume igual de tampão de extração com SDS e 5µL de proteinase K (50 a 100µg/mL), misturando suavemente por inversão do tubo, para homogeneizar.
2. Deixar incubando a 37°C overnight ou a 52°C por 1 hora, agitando periodicamente.
3. Adicionar volume igual de fenol (pH 8,0) neutralizado e misturar suavemente por 10 minutos.
4. Centrifugar a 14000RPM por 10 minutos, à temperatura ambiente.
5. Retirar o sobrenadante e transferir para um novo tubo contendo ½ volume de fenol e ½ volume de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) e misturar por 10 minutos.
6. Centrifugar a 14000RPM por 10 minutos, à temperatura ambiente.
7. Retirar o sobrenadante e transferir para um novo tubo contendo 1/10 do volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2.
8. Adicionar 2,5x o volume de etanol 100% gelado (o etanol deverá estar a -70°C por 1 hora ou a -20°C overnight) e misturar delicadamente, por inversão do tubo, para homogeneizar.
9. Centrifugar a 14000RPM, 4°C, por 10 minutos.
10. Lavar o pellet por 2x com etanol 70% gelado (cerca de 1mL), misturando delicadamente por inversão do tubo e centrifugando a 14000RPM por 10 minutos a 4°C
11. Após a última lavagem, retirar o sobrenadante com a pipeta e deixar secar no multi-block por alguns minutos.
12. Acrescentar 50µL de TE ou DDW e deixar ressuspensando a 37°C por 30 minutos, agitando periodicamente.
13. Estocar a -20°C se for estocar ou a 4°C, se for utilizar em breve.

Anexo V: Soluções utilizadas em géis de poliacrilamida

SOLUÇÕES UTILIZADAS EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA

1. "Sopas Primitivas"

4%	Bis-acrilamida 30%	13,32 ml
	TBE 5X	20,00 ml
	H ₂ O MQ	65,88 ml
6%	Bis-acrilamida 30%	20,00 ml
	TBE 5X	20,00 ml
	H ₂ O MQ	60,00 ml
8%	Bis-acrilamida 30%	27,00 ml
	TBE 5X	20,00 ml
	H ₂ O MQ	53,00 ml
10%	Bis-acrilamida 30%	33,20 ml
	TBE 5X	20,00 ml
	H ₂ O MQ	46,70 ml

APS

1g Persulfato

100ml DDW

2. Bis-acrilamida 30%

Acrilamida (C ₃ H ₅ NO)	29g	PM 71,08
Bis (N,N'-methylene-bis-acrylamide)	1g	PM 154,17
H ₂ O MQ	qsp 100ml	

3. Solução Fixadora (1 a 3 géis)

Etanol PA	15ml
Ácido Acético	750ml
Água MQ	150ml

4. Solução Fixadora Glicerizada (500ml)

10%	20%
Glicerina 50ml	Glicerina 100ml
Solução Fixadora 450ml	Solução Fixadora 400ml

5. Solução Corante

AgNO ₃	0,3g	2g
Água MQ	150ml	1000ml

6. Solução de Revelação

NaOH 0,75M	4,5g	30g
Água MQ	150ml	1000ml

Não esquecer de acrescentar 450µl de formaldeído 0,1M antes de colocar os géis em contato com a solução (senão não revela)

Anexo VI: Dados do PCDCh dos cinco municípios trabalhados da Chapada do Araripe, Ceará.

Dados do Programa de Controle da Doença de Chagas dos cinco municípios estudados da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil.

Ano: 2003									
Espécie	capturado		examinado		positivo		índice de infecção (%)		
	intra	peri	intra	peri	intra	peri	intra	peri	global
<i>R.nasutus</i>	4	113	0	106	0	1	0%	0,9%	0,9%
<i>P. lutzi</i>	0	0	0	0	0	0	0%	0%	0%
<i>P.megistus</i>	0	18	0	18	0	2	0%	11,1%	11,1%
<i>T.brasiliensis</i>	9	23	8	20	0	0	0%	0%	0%
<i>T.pseudomaculata</i>	82	657	70	625	0	6	0%	1,0%	0,9%
Total	95	811	78	769	0	9	0%	1,2%	1,1%

Ano: 2004									
Espécie	capturado		examinado		positivo		índice de infecção (%)		
	intra	peri	intra	peri	intra	peri	intra	peri	global
<i>R.nasutus</i>	15	147	14	146	0	3	0%	2,1%	1,9%
<i>P. lutzi</i>	1	0	1	0	0	0	0%	0%	0%
<i>P.megistus</i>	2	12	2	11	0	0	0%	0%	0%
<i>T.brasiliensis</i>	25	48	24	48	0	0	0%	0%	0%
<i>T.pseudomaculata</i>	64	646	62	628	3	4	4,8%	0,6%	1,0%
Total	107	853	103	833	3	7	2,9%	0,9%	1,1%

Ano: 2005									
Espécie	capturado		examinado		positivo		índice de infecção (%)		
	intra	peri	intra	peri	intra	peri	intra	peri	global
<i>R.nasutus</i>	3	199	3	193	0	4	0%	2,1%	2,0%
<i>P. lutzi</i>	5	41	3	31	1	0	33,3%	0%	2,9%
<i>P.megistus</i>	0	1	0	1	0	0	0%	0%	0%
<i>T.brasiliensis</i>	33	32	25	32	2	0	8,0%	0%	3,6%
<i>T.pseudomaculata</i>	51	738	38	657	0	11	0%	1,7%	1,7%
Total	92	1011	69	914	3	15	4,3%	1,6%	1,8%

intra = intradomicílio; peri = peridomicílio



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE
COORDENADORIA DE DESENVOLVIMENTO E APOIO E ATENÇÃO À SAÚDE - CODAS
NÚCLEO DE CONTROLE DE ENDEMIAS TRANSMISSÍVEIS POR VETORES - NUEND

PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS - PCDCh
Identificação e Exame de Triatomíneo por município Período: 01/01/2003 a 31/12/2003.

Nº DE ORDEM	NÍVEL		TRIATOMÍNEOS																		TOTAL DE POSITIVOS	ÍNDICE DE INFECÇÃO
	CERES / MUNICÍPIO	ESPÉCIE DO TRIATOMÍNEO	CAPTURADOS						EXAMINADOS						TOTAL DE POSITIVOS							
			INTRA			PERI			INTRA			PERI			INTRA			PERI				
			A	N	T	A	N	T	A	N	T	A	N	T	A	N	T	A	N	T		
1	CRATO	<i>T.brasiliensis</i>	3	1	4	3	10	13	17	3	1	4	3	10	13	17	0	0	0,00	0	0,00	
		<i>T.pseudomaculata</i>	2	41	43	50	267	317	360	2	37	39	49	263	312	351	0	0	1,60	5	1,42	
		<i>P.megistus</i>	0	0	0	4	2	6	6	0	0	0	4	2	6	6	0	0	0,00	0	0,00	
		<i>R.nasutus</i>	1	2	3	37	46	83	86	1	2	3	35	46	81	84	0	0	0,00	1	1,19	
	Total no Município		6	44	50	94	325	419	469	6	40	46	91	321	412	458	0	0	0,00	6	1,46	
2	SANT. DO CARIRI	<i>T.brasiliensis</i>	0	1	1	0	5	5	6	0	1	1	0	5	5	6	0	0	0,00	0	0,00	
		<i>T.pseudomaculata</i>	1	8	9	37	135	172	181	0	5	5	37	128	165	170	0	0	0,00	0	0,00	
		<i>R.nasutus</i>	0	0	0	9	10	19	19	0	0	0	9	10	19	19	0	0	0,00	0	0,00	
	Total no Município		1	9	10	46	150	196	206	0	6	6	46	143	189	195	0	0	0,00	0	0,00	
3	BARBALHA	<i>T.pseudomaculata</i>	0	0	0	2	15	17	17	0	0	0	2	15	17	17	0	0	0,00	0	0,00	
		<i>R.nasutus</i>	1	0	1	5	3	8	9	0	0	0	3	2	5	5	0	0	0,00	0	0,00	
	Total no Município		1	0	1	7	18	25	26	0	0	0	5	17	22	22	0	0	0,00	0	0,00	
4	MISSÃO VELHA	<i>T.brasiliensis</i>	0	0	0	3	2	5	5	0	0	0	1	1	2	2	0	0	0,00	0	0,00	
		<i>T.pseudomaculata</i>	11	18	29	21	90	111	140	9	16	25	19	79	98	123	0	0	0,00	1	1,02	
		<i>P.megistus</i>	0	0	0	10	2	12	12	0	0	0	10	2	12	12	0	0	0,00	2	16,7	
		<i>R.nasutus</i>	0	0	0	3	0	3	3	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0,00	0	0,00	
	Total no Município		11	18	29	37	94	131	160	9	16	25	31	82	113	138	0	0	0,00	3	2,17	



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE
COORDENADORIA DE DESENVOLVIMENTO E APOIO E ATENÇÃO À SAÚDE - CODAS
NÚCLEO DE CONTROLE DE ENDEMIAS TRANSMISSÍVEIS POR VETORES - NUEND

PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS - PCDCh
Identificação e Exame de Triatomíneo por município Período: 01/01/2004 a 31/12/2004.

NÍVEL		TRIATOMÍNEOS																	TOTAL DE POSITIVOS	ÍNDICE DE INFECÇÃO					
CERES / MUNICÍPIO	ESPECIE DO TRIATOMÍNEO	CAPTURADOS						TOTAL DE CAPTURA-DO	EXAMINADOS						POSITIVOS										
		INTRA			PERI				INTRA			PERI			INTRA		PERI								
		A	N	T	A	N	T		A	N	T	A	N	T	A	N	T	A			N	T			
1	CRATO	9	1	10	1	14	15	25	8	1	9	1	14	15	24	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0,0
	<i>T.brasiliensis</i>																							1	0,4
	<i>T.pseudomaculata</i>	4	5	9	37	216	253	262	4	5	9	36	213	249	258	1	0	1	11,1	0	0	0	0,0	0	0,0
	<i>P.megistus</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0
	<i>P.lutzi</i>	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0
	<i>R.nasutus</i>	3	11	14	45	50	95	109	3	11	14	45	50	95	109	0	0	0	0,0	2	0	2	2,1	2	1,8
	Total no Município	17	17	34	83	281	364	398	16	17	33	82	278	360	393	1	0	1	3,0	2	0	2	0,6	3	0,8
2	SANTANA DO CARIRI	1	14	15	1	32	33	48	1	14	15	1	32	33	48	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0
	<i>T.brasiliensis</i>																							5	1,8
	<i>T.pseudomaculata</i>	5	11	16	62	201	263	279	5	11	16	62	199	261	277	0	2	2	12,5	3	0	3	1,2	5	1,8
	<i>R.nasutus</i>	0	0	0	20	8	28	28	0	0	0	20	8	28	28	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0
	Total no Município	6	25	31	83	241	324	355	6	25	31	83	239	322	353	0	2	2	6,5	3	0	3	0,9	5	1,4
3	BARBALHA	3	2	5	7	12	19	24	3	2	5	7	11	18	23	0	0	0	0,0	1	0	1	2	2	8,7
	<i>T.pseudomaculata</i>																							1	4,6
	<i>R.nasutus</i>	0	0	0	11	12	23	23	0	0	0	10	12	22	22	0	0	0	0,0	1	0	1	4,6	1	4,6
	Total no Município	3	2	5	18	24	42	47	3	2	5	17	23	40	45	0	0	0	0,0	2	1	3	7,5	3	6,7
4	MISSÃO VELHA	12	9	21	20	21	41	62	12	8	20	16	19	35	55	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0
	<i>T.pseudomaculata</i>																							0	0,0
	<i>P.megistus</i>	2	0	2	10	1	11	13	2	0	2	9	1	10	12	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0
	Total no Município	14	9	23	30	22	52	75	14	8	22	25	20	45	67	0	0	0	0,0	0	0	0	0,0	0	0,0
5	JUAZEIRO DO NORTE	5	8	13	21	49	70	83	4	8	12	19	46	65	77	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0,0
	<i>T.pseudomaculata</i>																							0	0,0
	<i>R.nasutus</i>	1	0	1	1	1	0	2	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	Total no Município	37	8	14	22	49	71	85	4	8	12	20	46	66	78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
	Total Geral	77	61	107	236	617	853	960	43	60	103	227	606	833	936	1	2	3	2,9	7	1	8	1,0	11	1,2



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE
COORDENADORIA DE DESENVOLVIMENTO E APOIO E ATENÇÃO À SAÚDE - CODAS
NÚCLEO DE CONTROLE DE ENDEMIAS TRANSMISSÍVEIS POR VETORES - NUEND

PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS - PCDCh
Identificação e Exame de Triatomíneo por município Período: 01/01/2005 a 31/12/2005.

NÍVEL		TRIATOMÍNEOS																TOTAL DE POSITI- VOS	ÍNDICE DE INFECÇÃO							
CERES / MUNICÍPIO	ESPÉCIE DO TRIATOMÍNEO	CAPTURADOS						TOTAL DE CAPTURA- DOS	EXAMINADOS						TOTAL DE EXAMI- NADOS											
		INTRA			PERI				INTRA			PERI														
A	N	T	A	N	T	A	N	T	A	N	T	A	N	T	A	N	T	% INFEÇ	% INFEÇ							
1	CRATO	<i>T.brasiliensis</i>	8	13	21	1	22	23	44	6	13	19	1	22	23	42	1	0	1	5,26	0	0	0	2,38		
		<i>T.pseudomaculata</i>	18	6	24	146	246	392	416	17	4	21	131	231	362	383	0	0	0	4	3	7	1,93	7	1,83	
		<i>P.megistus</i>	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>P.lutzii</i>	3	0	3	23	18	41	44	2	0	2	16	15	31	33	1	0	1	50	0	0	0	1	3,03	
		<i>R.nasutus</i>	2	0	2	66	111	177	179	2	0	2	66	106	172	174	0	0	0	0	0	3	1	4	2,33	4
Total no Município		31	19	50	237	397	634	684	27	17	44	215	374	589	633	2	0	2	4,55	7	4	11	1,87	13	2,05	
2	SANTANA DO CARIRI	<i>T.brasiliensis</i>	1	1	2	1	6	7	9	0	1	1	1	6	7	8	0	1	1	100	0	0	0	0	1	12,5
		<i>T.pseudomaculata</i>	0	4	4	56	141	197	201	0	4	4	54	139	193	197	0	0	0	0	2	1	3	1,55	3	1,52
		<i>R.nasutus</i>	0	0	0	14	8	22	22	0	0	0	13	8	21	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total no Município	1	5	6	71	155	226	232	0	5	5	68	153	221	226	0	1	1	20	2	1	3	1,36	4	1,77
3	MISSÃO VELHA	<i>T.brasiliensis</i>	4	6	10	0	0	0	10	1	4	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>T.pseudomaculata</i>	14	8	22	45	37	82	104	7	5	12	30	22	52	64	0	0	0	0	1	0	1	1,92	1	1,56
		<i>P.lutzii</i>	2	0	2	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>R.nasutus</i>	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total no Município	21	14	35	45	37	82	117	10	9	19	30	22	52	71	0	0	0	0	1	0	1	1,92	1	1,41
4	JUAZEIRO DO NORTE	<i>T.brasiliensis</i>	0	0	0	2	0	2	2	0	0	0	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>T.pseudomaculata</i>	1	0	1	22	45	67	68	1	0	1	11	39	50	51	0	0	0	0	1	0	1	2	1	1,96
		Total no Município	1	0	1	24	45	69	70	1	0	1	13	39	52	53	0	0	0	0	1	0	1	1,92	1	1,89
		Total Geral	54	38	92	377	634	1011	1103	38	31	69	326	588	914	983	2	1	3	4,35	11	5	16	1,75	19	1,93

OBS. O MUNICÍPIO DE BARBALHA NÃO TRABALHOU EM 2005



GOVERNO DO ESTADO DO CEARÁ
SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE
COORDENADORIA DE DESENVOLVIMENTO E APOIO E ATENÇÃO À SAÚDE - CODAS
NÚCLEO DE CONTROLE DE ENDEMIAS TRANSMISSÍVEIS POR VETORES - NUEND

ATIVIDADES / ANO	1996	1999	2002	2005	2006**
1. CAPTURA					
1.1 Nº Municípios Trabalhados	96	99	153	163	107
1.2 Nº Localidades Trabalhadas	12.262	8.172	16.286	13.043	2.945
1.3 Nº UD's/Casas Trabalhadas	363.547	315.898	552.920	445.055	102.434
1.4 Nº Localidades Positivas	6.905	5.150	9.396	6.798	1.712
1.5 Nº UD's Positivas	28.234	27.379	40.655	24.669	6.767
1.6 Nº Casas Positivas	9.921	11.191	10.329	6.146	1.793
1.7 % Localidades Positivas	56,31	63,02	58	52	58
1.8 % UD's Positivas	7,77	8,67	7,35	5,5	6,6
1.9 % Casas Positivas	2,73	3,54	1,87	1,4	1,8
2. BORRIFAÇÃO					
2.1 Nº Municípios Trabalhados	94	102	152	156	107
2.2 Nº Localidades Trabalhadas	6.649	5.439	9.293	6.561	1.640
2.3 Nº UD's/Casas Trabalhadas	120.547	52.578	47.051	30.742	7.497
2.4 Nº Habit. Diretamente Protegidos	395.574	141.098	166.103	97.949	24.128
3. TRIATOMÍNEOS					
3.1 Nº Triatomíneos Capturados	66.012	55.168	78.023	55.333	16.115
3.2 Nº Triatomíneos Examinados	39.820	38.023	64.553	45.897	14.509
3.3 Nº Triatomíneos Positivos	175	150	309	421	128
3.4 % Triatomíneos Positivos	0,44	0,39	0,48	0,92	0,88
4. SOROLOGIA HUMANA *					
4.1 Nº Amostras Examinadas	3.959	314	0	0	0
4.2 Nº Amostras Positivas	0	0	0	0	0
4.3 % Amostras Positivas	0	0	0	0	0

Convenções: (*) Crianças de 7-9 anos ;

** - Dados até abril no nível central (sujeito a revisão).

Anexo VII: Artigo aceito para publicação.

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz
Av. Brasil 4365, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Tel.: +55-21-2598.4335
Telefax: 00-55-21-2280.5048 / 2561.1442
E-mails: memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br
Site: <http://memorias.ioc.fiocruz.br>



April 26, 2007

Dr Lileia Diotaiuti
CPq René Rachou
Fiocruz
diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br

Accession N°.: 5761
Date of acceptance: April 26, 2007

Title: “*First report on the occurrence of Trypanosoma rangeli Tejera, 1920 in the state of Ceará, Brazil, in naturally infected triatomine Rhodnius nasutus (Hemiptera, Reduviidae)*”

I have the pleasure of informing you that your above-mentioned manuscript was accepted for publication in the *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, according to the decision of the Editorial Board.

Sincerely yours,

Ricardo Lourenço-de-Oliveira
Editor



Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas *Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil ** Secretaria do Estado da Saúde do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

The aim of this work was to identify and report the occurrence of Trypanosoma rangeli and Trypanosoma cruzi in naturally infected Rhodnius nasutus (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the state of Ceará, Brazil. Triatomines feces, salivary glands, and hemolymph were collected for fresh examination, and specific detection of T. rangeli and T. cruzi DNA by polymerase chain reaction was carried out. The specific characterization of these two parasites showed the simultaneous presence of both parasites in two (7.7%) of the 26 positive insects. Our results provide further knowledge on the geographical distribution of T. rangeli in Brazil.

Key words: *Trypanosoma rangeli* - *Rhodnius nasutus* - Ceará

Trypanosoma rangeli Tejera, 1920 and *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, are hemoflagellate protozoa of the Family Trypanosomatidae, belonging to the Order Kinetoplastida (D'Alessandro 1976). Both parasites are sympatric in Americas with a wide geographic distribution. *T. cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, and *T. rangeli* is responsible for a non-pathogenic infection in mammals (D'Alessandro & Saraiva 1992). Both parasites can be found in the same triatomine vector species, and in the same vertebrate hosts, which are mammals belonging to different orders and genera, including man (D'Alessandro & Saraiva 1992). Although *T. rangeli* is not pathogenic for the vertebrate host, its occurrence should be recorded as it frequently presents an overlapping distribution with *T. cruzi* (D'Alessandro 1976). *T. rangeli* bears similarities with *T. cruzi* regarding surface antigens, impairing the diagnosis of Chagas disease when serological assays are carried out. Moreover, considering the fact that *T. rangeli* is highly pleomorphic, its morphological identification may be rather difficult, being misidentified as *T. cruzi* (Urdaneta-Morales & Tejero 1992).

Interactions between *T. rangeli* and its invertebrate host starts after ingestion of trypomastigote forms during the triatomine blood feeding. Following ingestion, trypomastigotes undergo differentiation to epimastigotes that multiply in the insect vector intestine. After reaching the intestine lumen, the epimastigote forms invade hemocelle, in which they remain to multiply either

inside or outside hemocytes and, then, they actively penetrate through salivary glands, especially in *Rhodnius* species, where metacyclogenesis occurs (D'Alessandro & Hincapié 1986). In vertebrate hosts, *T. rangeli* has been reported to infect more than 20 genera in five different animal orders (D'Alessandro & Saraiva 1992). The vertebrate host infection occurs during the triatomine blood feeding, through which infective trypomastigotes are released together with the vector saliva (Vallejo et al. 1988).

In Brazil, the first report on the occurrence of *T. rangeli* was issued by Deane (1958) in *Didelphis marsupialis*, in the state of Pará. Steindel et al. (1991) reported the presence of *T. rangeli* in the rodent *Echimyis dasythrix* in Southern Brazil. Several other reports on *T. rangeli* occurrence in Brazil have been given by some investigators such as those by Diotaiuti et al. (1992) who reported the occurrence of that flagellate, based on its morphology, in *R. neglectus* in the state of Tocantins; Lucena and Vergueti (1973) reported *Panstrongylus megistus* infections with the flagellate, also based on its morphological traits, in the state of Alagoas; in Bahia, Barrett and Oliveira (1977) reported natural infection of a *R. domesticus* nymph with *T. rangeli*; Ramirez et al. (2002) demonstrated *D. albiventris* infection with *T. rangeli* in the Southeast. A single report on human infection with *T. rangeli* was made by Coura et al. (1996) in the Amazon region, and *R. brethesi* may be considered the most likely vector in the region.

The current investigation was aimed at verifying the occurrence of *T. rangeli* in *R. nasutus* specimens collected on different palm tree species, namely: babaçu palm (*Attalea speciosa*); buriti (*Mauritia flexuosa*); carnaúba palm (*Copernicia prunifera*); catolé palm (*Syagrus oleracea*); and macaúba-barriguda (*Acrocomia intumescens*), in rural areas from five municipalities of Chapada do Araripe, in the southern region of Ceará, Brazil, between 14 March and 06 April, 2006.

Financial support: Fapemig, CNPq, CPqRR-Fiocruz

+ Corresponding author: diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br

Received 20 December 2006

Accepted 26 April 2007

The insects were evaluated regarding the presence of trypanosome in their intestinal content through analyzing their fresh feces obtained by abdominal compression; hemolymph analysis on glass slides was also carried out after sectioning one of the insect legs. Salivary glands from positive hemolymph were dissected in order to verify the presence of parasites. All biological material obtained was analyzed under light microscopy (magnification 160 x). The trypanosomes were isolated from insects in LIT medium added to blood agar maintained at 27.5°C, keeping weekly passages.

Polymerase chain reaction (PCR) has been known to be more sensitive than optical microscopy for detection and specific characterization of these trypanosomes in insect vectors, mainly concerning the possibility of mixed infection (Machado et al. 2000). Hence, we have used PCR for specific detection of *T. rangeli* and *T. cruzi* in samples of isolated parasites; DNA was obtained from parasite cultures using standard phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction (Steindel et al. 1993). Detection of *T. rangeli* was based on amplification of an intergenic region of *T. rangeli* mini-exon with the following primers: TrINT-1 – 5'-CGC CCA TTC GTT TGT CC-3'; TrINT-2 – 5'-TCC AGC GCC ATC ACT GAT C-3'; and TrINT-3 – 5'-AAG ATG AGG CGT GGC TCT G-3' (Grisard et al. 1999). For *T. cruzi* detection, specific primers were designed to amplify an intergenic region of the mini-exon gene (Souto et al. 1996). As positive control, the *T. rangeli* San Agustín strain, isolated from a Colombian chagasic patient, was used. The products were submitted to electrophoresis in polyacrylamide gel and then revealed after being silver stained.

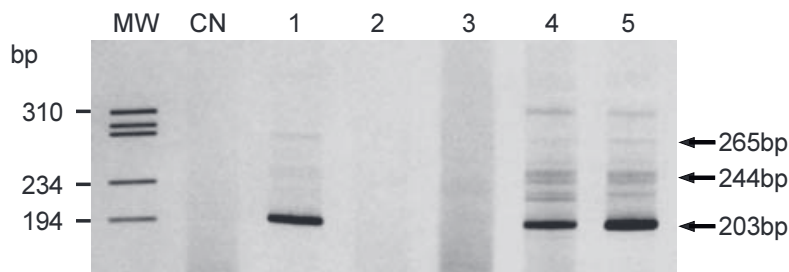
Out of the 26 insects positive for trypanosome in their intestines, two (7.7%) showed to be positive for trypanosome in hemolymph without showing parasites in their salivary glands though. Molecular typing of isolated samples using TrINT primers showed to be specific for *T. rangeli*, amplifying a band of approximately 203 bp and two other bands of less intensity, 244 and 265 bp, respectively, which provided corroborating evidence to our microscopic findings (Fig. 1). In all isolates, *T. cruzi* was identified (data not shown), including

the samples in which *T. rangeli* was isolated, which confirmed the presence of mixed infection.

In the present study, identification of Trypanosomatidae found in the insect intestine tract by means of morphological analysis was not possible, requiring a diagnosis confirmation through PCR. An overlapping geographic distribution of both *T. cruzi* and *T. rangeli*, occurrence of mixed infection in vertebrate and invertebrate hosts and, *T. rangeli* pleomorphism account for the need for molecular techniques for identification of Trypanosomatidae species. By using PCR, that enabled amplification of the intergenic region of the mini-exon gene, we were able to identify the Trypanosomatidae species in *R. nasutus* collected in the state of Ceará, Brazil. The present communication is the first to report the occurrence of *T. rangeli* in the state of Ceará, Brazil, identified in naturally infected triatomines of the species *R. nasutus*.

Chapada do Araripe is comprised in the mountain regions of the Brazilian semi-arid, regarded as remaining areas of humid forests in the caatinga vegetation. It presents typical elements of the Brazilian Amazon, Mata Atlântica and cerrado (Bagnoli 1998), what is validated through geologies, floristics, and faunistics evidences (Monteiro & Kaz 1994). In regions with an overlapping of the geographic distribution of *T. cruzi* and *T. rangeli*, co-infections in vectors and vertebrates are common (D'Alessandro & Saraiva 1992). The presence of marsupials in the palms, being this important reservoir of both parasites, may favour the occurrence of co-infection in the same insect, as suggested for other authors (Cuba-Cuba 1998, Ramirez et al. 2002), specially considering that blood of these animals in the stomachal content of infected triatomines was identified through the precipitin technique (data not shown).

The occurrence of *T. rangeli* in naturally infected *R. nasutus* from palm trees in Ceará provides further knowledge on the geographical distribution of this parasite in Brazil. Considering that in the Brazilian caatinga there are areas similar to the Chapada do Araripe (Ca-Valcante 2005), it is very likely that the occurrence of *T. rangeli* in triatomines colonizing palm trees in the Northeast,



Polymerase chain reaction amplification products of the mini-exon gene generated by *Trypanosoma* samples isolated from naturally infected *Rhodnius nasutus* using the primers TrINT 1, TrINT 2, and TrINT 3. MW: molecular weight, the numbers on the left are the size markers (ϕ X174 digested by the restriction enzyme *HaeIII*); NC: negative control (no DNA add). Lanes - 1: strain RN01; 2: RN02; 3: RN03; 4: RN04; 5: strain San Agustín (positive control), visualized on 8% polyacrylamide gel, silver stained.

as well as associated with vertebrate hosts, may be even higher. As is known, there was a link among the Brazilian caatinga, Amazon, and Mata Atlântica regions that reinforces this hypothesis (Cavalcante 2005). Studies about genetic proximity among *T. rangeli* strains from several geographic regions may collaborate to clarify a possible migratory route that culminated in the establishment of this parasite in Brazilian Northeast. This observation also reinforces the idea that false-positive results of diagnostic tests for *T. cruzi* infection are possible, as mentioned by Gurgel-Gonçalves et al. (2004).

ACKNOWLEDGMENTS

To the Secretaria de Estado da Saúde do Ceará for helping us to collect the insects.

REFERENCES

- Bagnoli E 1998. Projeto Araripe – 1ª parte: Conhecendo o Araripe: Atividades produtivas da população. Turismo, Ecoturismo, Turismo Cultural e Científico. In Projeto Araripe. [s.i]: [s.n.], p. 292-318.
- Barrett TV, Oliveira TS 1977. A *Trypanosoma* indistinguishable from *Trypanosoma rangeli* in the haemolymph of *Rhodnius domesticus* from Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71: 445-446.
- Cavalcante A 2005. *Jardins Suspensos no Sertão*, Scientific American Brasil, Duetto Editorial, São Paulo, n. 32, janeiro.
- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, Barrett TV, Carrara N, Degraive W, Campbell DA 1996. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 278-279.
- Cuba-Cuba CA 1998. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 207-220.
- D'Alessandro A 1976. Biology of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. In WHR Lumsden, DA Evans (eds), *Biology of Kinetoplastida*, vol. 1, Academic Press, London, p. 327-403.
- D'Alessandro A, Saraiva NG 1992. *Trypanosoma rangeli*. In *Parasitic Protozoa*, 2nd ed., Vol. 2, Academic Press, San Diego, p. 1-54.
- D'Alessandro A, Hincapié O 1986. *Rhodnius neivai*: a new experimental vector of *Trypanosoma rangeli*. *Am J Trop Med Hyg* 35:512-514.
- Deane LM 1958. Novo hospedeiro de tripanosomas dos tipos *cruzi* e *rangeli* no Estado do Pará. O marsupial *Metachirops opossum opossum*. *Rev Bras Malar Doenças Trop* 10: 531-541.
- Diotaiuti L, Silveira AC, Elias M, Steindel M 1992. The possibility of occurrence of *Trypanosoma rangeli* in the state of Tocantins, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 451.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ 1999. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology* 118: 375-382.
- Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F, Carranza JC, Cuba-Cuba CA 2004. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 46: 323-330.
- Lucena DT, Vergetti JG 1973. Infecção natural de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) por *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920), no interior do Estado de Alagoas. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 15: 171-178.
- Machado EMM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC 2000. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 836-866.
- Monteiro S, Kaz L 1994. *Caatinga – Sertão Sertanejos*, Alumbamentos Livroarte, Rio de Janeiro, 255 pp.
- Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, Zingales B 2002. Abstract high prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop* 84: 189-198.
- Souto R, Fernandes O, Macedo A, Campbell D, Zingales B 1996. DNA markers define two major phylogenetics lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83: 141-152.
- Steindel M, Carvalho Pinto JC, Toma HK, Mangia HR, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha, AJ 1991. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920) isolated from a sylvatic rodent (*Echymys dasythrix*) in Santa Catarina island, Santa Catarina state: first report of this trypanosome in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 73-79.
- Steindel M, Dias-Neto E, Carvalho CJ, Grisard E, Menezes C, Murta SM, Simpson AJ, Romanha AJ 1993. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. *J Euk Microbiol* 4: 261-267.
- Urdaneta-Morales S, Tejero F 1992. *Trypanosoma rangeli* (Tejera, 1920): observations upon pleomorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 511-516.
- Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, Sánchez N 1988. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* em el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Rev Bras Biol* 48: 577-587.