

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO DA INFESTAÇÃO DOMICILIAR E  
DINÂMICA DE POPULAÇÕES DE  
*Triatoma vitticeps* (STÅL, 1859) E *Trypanosoma cruzi* EM  
ITANHOMI, MINAS GERAIS.**

**POR**

**RITA DE CÁSSIA MOREIRA DE SOUZA**

Belo Horizonte – Minas Gerais  
Fevereiro 2009

TESE DDIP-CPQRR

R.C.M. SOUZA

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO DA INFESTAÇÃO DOMICILIAR E DINÂMICA DE  
POPULAÇÕES DE *TRITOMA VITTEPS* (STÅL, 1859) E  
*TRYPANOSOMA CRUZI* EM ITANHOMI, MINAS GERAIS.**

Rita de Cássia Moreira de Souza

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

**Orientadora: Dra. Liléia Diotaiuti**

Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas

Belo Horizonte – Minas Gerais

Fevereiro 2009

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

S719c Souza, Rita de Cássia Moreira de.  
2009

Caracterização da infestação domiciliar e dinâmica de populações de *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) e *Trypanosoma cruzi* em Itanhomi, Minas Gerais. / Rita de Cássia Moreira de Souza . – Belo Horizonte, 2009.

xix, 136 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 118 - 133

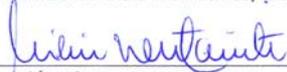
Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Doenças de Chagas/prevenção & controle
  2. *Triatoma*/ crescimento e desenvolvimento
  3. *Trypanosoma cruzi*/ crescimento e desenvolvimento
  4. Reação em Cadeia da Polimerase/instrumentação.
- I. Título. II. Diotaiuti, Líléia Gonçalves (Orientação).

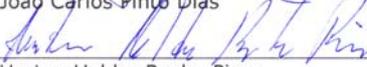
CDD - 22. ed. - 616.936 3

**Ata da vigésima defesa de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Rita de Cássia Moreira de Souza, sob a orientação da Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti.**

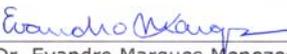
Aos dezessete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e nove, às quatorze horas, realizou-se no auditório do Centro de Pesquisa René Rachou, a defesa da vigésima tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências – área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias. A tese da aluna Rita de Cássia Moreira de Souza intitula-se "Caracterização da infestação e dinâmica de populações de *Triatoma vitticeps* (STAL, 1859) e *Trypanosoma cruzi* em Itanhomi, Minas Gerais". A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti - CPqRR/FIOCRUZ (orientadora e presidente da banca), Dr. João Carlos Pinto Dias - CPqRR/FIOCRUZ (membro titular), Dr. Herton Helder Rocha Pires - UFVJM (membro titular), Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves - IOC/FIOCRUZ (membro titular), Dr. Evandro Marques Menezes Machado - UFOP (membro titular) e Dra. Silvia Ermelinda Barbosa Leite CPqRR/FIOCRUZ (membro suplente). Após arguir a aluna e considerando que a mesma 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, a aluna foi considerada APROVADA. Uma vez encerrado o exame, eu, Liléia Gonçalves Diotaiuti, presidente da Banca, assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, dezessete de fevereiro de dois mil e nove.

  
Dra. Liléia Gonçalves Diotaiuti

  
Dr. João Carlos Pinto Dias

  
Dr. Herton Helder Rocha Pires

  
Dra. Teresa Cristina Monte Gonçalves

  
Dr. Evandro Marques Menezes Machado

...e o futuro é uma astronave  
Que tentamos pilotar  
Não tem tempo, nem piedade  
Nem tem hora de chegar  
Sem pedir licença  
Muda a nossa vida  
E depois convida  
A rir ou chorar

Nesta estrada não nos cabe  
Conhecer ou ver o que virá  
O fim dela ninguém sabe  
Bem ao certo onde vai dar  
Vamos todos  
Numa linda passarela  
De uma aquarela  
Que um dia enfim  
Descolorirá...

***Aquarela (Toquinho / Vinicius de Moraes / G.Morra / M.Fabrizio)***

AOS MEUS PAIS ALTAMIRO E MARIA HELENA,  
PELO EXEMPLO DE VIDA E HUMILDADE, AMOR INCONDICIONAL E DEDICAÇÃO.

AO MEU MARIDO PEDRO,  
A QUEM TANTO AMO E ADMIRO, PELA PRESENÇA, CARINHO E INCENTIVO  
CONSTANTE.

AOS MEUS FILHOS PEDRO HENRIQUE E LUANA,  
POR TRANSFORMAREM MINHA VIDA EM UMA LINDA AQUARELA.

## AGRADECIMENTOS

À Dr. Liléia Diotaiuti, minha admiração e gratidão eterna. Meus sinceros agradecimentos pela orientação, confiança, carinho, amizade, paciência e, sobretudo pela grande oportunidade;

Ao Centro de Pesquisa René Rachou, na pessoa do atual diretor Dr. Álvaro Romanha, pelo apoio logístico;

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do atual Coordenador Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta e também a Dra. Virgínia Torres Schall e Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito pelo empenho nas gestões passadas;

À amiga e companheira Sílvia Ermelinda Barbosa, pela relatoria e principalmente pela convivência, cumplicidade, apoio ao longo de todos estes anos, e orientação, desde a iniciação científica;

À amiga Maria Angélica de Oliveira, a quem tanto respeito e admiro, pela confiança, apoio e incentivo constantes, pelos anos de convivência e amizade, e pela preciosa ajuda no final da tese;

Ao Dr. Marcos Horácio Pereira, pela constante contribuição, sugestões e bom humor sempre presente;

Ao Dr. Davi Gorla, CRILAR/Argentina, pelo acolhimento, carinho, e cuidado durante minha estadia em seu laboratório e também pela ajuda nas análises de geoprocessamento;

Ao Dr. Evandro Marques de Menezes Machado pela valiosa contribuição, disponibilidade e ensinamentos no trabalho de isolamento das cepas e infecção em camundongos.

Ao Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo, pela disponibilidade na realização da citometria de fluxo.

Ao amigo e professor Judas Tadeu Gandra, pela correção ortográfica e gramatical deste trabalho;

À Maria Inês Mascarenhas, pela amizade, carinho, cuidado, e pela valiosa ajuda nos serviços de secretaria e formatação;

Ao Dr. João Carlos Pinto Dias, exemplo de simplicidade e compromisso com a ciência, e Dr. Herton Helder Rocha Pires, companheiro desde a iniciação científica, pela contribuição no exame de Qualificação;

Aos colegas do Laboratório de Triatomíneos, pela convivência e amizade, em especial à Alessandra, Ana Vitta, Dona Maria, João Paulo e Raquel, companheiros de longa caminhada;

Ao técnico Ademilson, pela ajuda indispensável;

A Dra. Adriana Coelho Soares, pela força, amizade e colaboração nos estudos de comportamento alimentar;

Ao Dr. Ricardo T. Gazzinelli, pela concessão de camundongos C57BL/6, "knockout" para interferon  $\gamma$ , utilizados nos experimentos de infecção;

A Ceres Luciana Alves, pela força e auxílio nos ensaios de saliva;

À Andréia e Cristiane, secretárias acadêmicas, pela disponibilidade;

Ao bibliotecário Segemar e aos colegas de informática do René Rachou, pelo socorro sempre que necessário;

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Dra. Silvane Murta, Rosana e Daniel Liarte, pela disponibilidade e ensinamentos nos trabalhos envolvendo *Trypanosoma cruzi*;

Ao Bernardino Vaz de Mello Azeredo, pelo bom humor, carinho, grande disponibilidade e auxílio nos serviços epidemiológicos e de captura;

Aos agentes da Fundação Nacional de Saúde, cedidos à Secretaria Municipal de Saúde de Itanhomi, especialmente ao Clévio, Aluísio e Paulo, pela disposição e apoio durante os trabalhos de campo e envio de material;

Ao meu irmão pela alegria, carinho e respeito;

A FIOCRUZ e TDR, pelo suporte financeiro;

Enfim, a todos que auxiliaram de alguma forma para a concretização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	XIII
<b>LISTA DE TABELAS</b>	XVI
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b>	XVII
<b>RESUMO</b>	XIX
<b>ABSTRACT</b>	XX
<b>I Introdução</b>	20
1.1 Aspectos Gerais	21
1.2 Aspectos biológicos e eco-epidemiológicos relacionados ao <i>T. vitticeps</i>	22
1.3 Aspectos Comportamentais	26
1.3.1 Alimentação e dejeção	26
1.3.2 Fatores ambientais	28
1.3.3 Estudo da fonte alimentar	30
1.4 Estudos de variabilidade genética	31
1.4.1 Perfil eletroforético de isoenzimas	31
1.4.2 Morfometria	32
1.4.3 Polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD)	32
1.5 Aspectos relacionados ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
<b>II Objetivos</b>	38
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
<b>III Materiais e Métodos</b>	40
3.1 Área trabalhada	41
3.2 Os insetos	42
3.3 Comportamento alimentar	46
3.3.1 Teste de precipitina	46
3.3.2 Ação da saliva do <i>T. vitticeps</i> sobre o nervo ciático de rato	46
3.3.3 Montagem do sistema "single sucrose gap"	48
3.3.4 Dinâmica de ingestão sanguínea	50
3.3.5 Dinâmica de alimentação e dejeção	51
3.4 Estudos de higropreferência	53
3.4.1 Os insetos	53

3.4.2	Controle da umidade relativa	53
3.4.3	Efeito da UR na eclosão dos ovos	53
3.4.4	Efeito do estado nutricional sobre a higropreferência das ninfas	54
3.4.5	Análise estatística	55
3.5	Morfometria	55
3.6	Perfil eletroforético das isoenzimas	56
3.7	Polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD)	57
3.7.1	Extração do DNA genômico	57
3.7.2	Iniciadores e ciclos de amplificação	57
3.7.3	Procedimentos	58
3.7.4	Visualização dos produtos amplificados por RAPD-PCR	58
3.7.5	Análises estatísticas dos marcadores de RAPD	59
3.8	Obtenção dos dados de ocorrência do <i>T. vitticeps</i> em ambiente doméstico e peridoméstico	59
3.9	Análise de distribuição espacial	60
3.9.1	Dados ambientais	60
3.9.2	Dados entomológicos	61
3.10	Amostras de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
3.10.1	Nos hospedeiros invertebrados	62
3.10.2	Nos hospedeiros vertebrados	63
3.11	Diagnóstico e caracterização molecular das cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
3.11.1	Amostras	64
3.11.2	PCR multiplex	65
3.11.3	Infecção experimental em camundongos	65
3.11.4	Hemocultura e citometria de fluxo	66
<b>IV Resultados</b>		<b>69</b>
4.1	Pesquisa de infestação das unidades domiciliares	70
4.2	Estudo da fonte alimentar	71
4.3	Ação da saliva do <i>T. vitticeps</i> sobre o nervo ciático de rato	73
4.4	Dinâmica de ingestão sanguínea: monitoramento da bomba cibarial	75
4.5	Dinâmica de alimentação e dejeção	77
4.6	Estudos de higropreferência	79
4.6.1	Efeito da umidade relativa na eclosão dos ovos	79
4.6.2	Higropreferência das ninfas de <i>T. vitticeps</i> : efeito do estado nutricional	79
4.7	Variabilidade genética	80
4.7.1	Morfometria	80
4.7.2	Polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD)	82
4.7.3	Perfil isoenzimático	84

4.8	Obtenção dos dados de ocorrência do <i>T. vitticeps</i> em ambiente doméstico e peridoméstico do Estado de Minas Gerais	86
4.9	Análise de distribuição espacial	88
4.10	Pesquisa de tripanosomatídeos	89
4.10.1	Em hospedeiros invertebrados	89
4.10.2	Em hospedeiros vertebrados (xenodiagnóstico)	92
4.11	Diagnóstico e caracterização do <i>T. cruzi</i>	92
4.12	Infecção experimental em camundongos	94
4.12.1	Hemocultura e citometria de fluxo	94
<b>V Discussão</b>		96
<b>VI Conclusões</b>		115
<b>VII Referências Bibliográficas</b>		118
<b>VIII Anexos</b>		134
<b>IX Artigo Publicado</b>		148

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar adulto de *Triatoma vitticeps* e mapa da distribuição geográfica da espécie (Carcavallo RU et al. 1999). 23
- Figura 2.** Mapa de Minas Gerais (escala 1:250.000) com o município de Itanhomi representado em vermelho ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). 41
- Figura 3** – Imagem de satélite do município de Itanhomi (software Google Earth versão 4.3), com localização aproximada (elipse) das 11 localidades rurais submetidas à pesquisa de infestação triatomínica das unidades domiciliares no ano de 2002. Os quadrados azuis não correspondem às localidades e representam alguns pontos marcados pelo software. 42
- Figura 4.** A) Interior do domicílio com destaque para as frestas no assoalho em continuidade com o porão; B) Fêmea de *T. vitticeps* capturada no intradomicílio. 44
- Figura 5.** C) Vista do peridomicílio e acesso de animais domésticos ao porão, ressaltando um ninho em galinheiro aberto; D) ninfa de *T. vitticeps* capturada no porão de uma das casas trabalhadas. 44
- Figura 6.** Visão da casa em relação ao ambiente silvestre (E e F). 45
- Figura 7A.** Esquema da câmara de registros eletrofisiológicos, projetada pelo Dr. Jader dos Santos Cruz (Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG). 48
- Figura 7B.** Sistema de estimulação e de registro do método de *single sucrose-gap*. 49
- Figura 8.** Desenho esquemático da arena experimental utilizada nos estudos de higropreferência do *T. vitticeps* (adaptado de Guarneri et al. 2002). 54
- Figura 9.** Aspecto dorsal da cabeça de um adulto de *T. vitticeps*, mostrando as medidas morfométricas. AC, tamanho do anteclípeo; At, tamanho do tubérculo antenífero; AO, distância ante-ocular; EO, distância extra-ocular; OE, distância extra-ocular e PO, distância pós ocular (sem pescoço). 55
- Figura 10.** Mapa de Minas Gerais assinalando os municípios onde o *T. vitticeps* foi capturado nos trabalhos de rotina do PCDCh/FUNASA, nos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995. Em vermelho, laranja, verde e amarelo, municípios dos distritos de Montes Claros, Diamantina, Teófilo Otoni e Caratinga, respectivamente. 62
- Figura 11.** Efeito de 1µl de saliva bruta de *T. vitticeps* sobre o Potencial de Ação Composto (PAC) de nervo isolado de rato. Cada curva corresponde um PAC, registrado a cada 10 minutos. 74
- Figura 12.** Porcentagem de redução da atividade de 1µL de saliva de *T. vitticeps* sobre o Potencial de Ação Composto (PAC) (média ± EP). 74
- Figura 13.** Espectro da frequência ao longo do tempo produzido pelos sinais elétricos gerados pelas contrações da bomba cibarial de ninfas de segundo estágio de *T. vittipes*. Alimentação em camundongo (A) e pombo (B), mostrando os perfis elétricos gerados pelas contrações arrítmicas da bomba com sinais elétricos irregulares. Alimentação em camundongo (C) e pombo (D), mostrando os perfis elétricos gerados pelas contrações rítmicas da bomba com sinais elétricos regulares. As cores representam a magnitude da ocorrência de cada frequência na escala representada no topo da figura. 76

- Figura 14.** Comparação do número médio de dejeções ao longo do tempo entre *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* ( $p < 0,05$ ). 78
- Figura 15.** Influência da umidade relativa (UR) no sucesso de eclosão dos ovos de *T. vitticeps*. 79
- Figura 16.** Higropreferência de ninfas de quarto estágio de *T. vitticeps* em função do estado nutricional: (A) recentemente alimentadas, (B) durante a ecdise, (C) 15 dias após alimentação, (D) 30 dias após alimentação. 80
- Figura 17.** Perfil de Guillaumin para *T. vitticeps*, machos (M) e fêmeas (F), utilizando as variáveis: OE – distância extra-ocular; EO - distância extra-ocular ; AC – tamanho do anticlípeo; AT – tamanho do tubérculo antenífero; AO – distância ante-ocular; PO – distância pos-ocular. 81
- Figura 18.** Mapa fatorial mostrando a relação entre as populações de *T. vitticeps* para a análise discriminante de forma. Os polígonos incluem todos os indivíduos de cada população sendo: --- Intradomicílio, — Peridomicílio, ---- Silvestre. 81
- Figura 19.** Perfis de RAPD das populações de *T. vitticeps* usando o "primer" 3303. PM: Padrão de peso molecular; Canaletas 1-7: fêmeas intra; 8-14: machos intra; 15-21: fêmeas peri; 22-28 machos peri; 29-35: fêmeas silvestre; 36-42: machos silvestre; *Rn*: *R. neglectus*. Os números acima do gel representam as canaletas. 82
- Figura 20.** Dendograma construído a partir do Coeficiente de Similaridade de Dice obtido a partir dos perfis eletroforéticos de RAPD para as três amostras de *T. vitticeps* estudadas, utilizando os iniciadores 3302, 3303, 3304 e 3307. A barra vertical corresponde à linha de feion. Os códigos à direita indicam o ambiente de origem de cada indivíduo: I intradomicílio; P, peridomicílio; S, silvestre. 83
- Figura 21.** Dendograma construído a partir da distância genética obtido dos perfis eletroforéticos de RAPD das três amostras de *T. vitticeps* utilizando-se os iniciadores 3302, 3303, 3304 e 3307. 83
- Figura 22.** Esquema do perfil eletroforético das isoenzimas observados nos indivíduos das três amostras de *T. vitticeps* (intra, peri e silvestre). Para identificação das enzimas ver materiais e métodos. 84
- Figura 23.** Número de *T. vitticeps* capturados (colunas) e a taxa de infecção (linhas) no intra e peridomicílio em quatro distritos do Estado de Minas Gerais nos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995. 87
- Figura 24.** Número de adultos e ninfas de *T. vitticeps* capturados (colunas) e a taxa de infecção (linhas) correspondente, em quatro distritos do Estado de Minas Gerais nos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995. 87
- Figura 25.** Áreas de presença (vermelho) e ausência (amarelo) de *T. vitticeps* derivadas da classificação baseada nas variáveis biofísicas pela análise discriminante. Os pontos verdes, azuis e amarelos dentro da área de presença se referem a municípios dos distritos de Caratinga, Teófilo Otoni e Montes Claros/Diamantina, respectivamente. Os pontos vermelhos e azuis dentro da área amarela representam áreas selecionadas aleatoriamente para ausência da espécie. 89
- Figura 26.** Índice de infecção do *T. vitticeps* capturados nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e silvestre do município de Itanhomi, MG, Brasil. 90

**Figura 27.** Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado pela prata) obtido 93 através da PCR multiplex de nove amostras de DNA extraídas de fezes de *T. vitticeps*, coletados em Itanhomi, Minas Gerais. Canaleta 1: padrão de peso molecular; 2, 3 e 9: insetos não infectados; 4 a 7: infecção por *T. cruzi* I; 8 e 10: infecção por *T. cruzi* II; 11: cepa padrão *T. cruzi* I; 12: padrão *T. cruzi* II e 13: controle negativo.

**Figura 28.** Porcentagem de parasitas fluorescentes obtidos pela citometria de fluxo 95 utilizando soro de camundongos inoculados com a cepa Tv06.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Localidades onde foram realizadas as capturas (busca ativa) e notificações de *T. vitticeps*, no intradomicílio e peridomicílio (pa=paiol e po=porão) do município de Itanhomi, no ano de 2002. 71
- Tabela 2.** Fontes alimentares identificadas pela reação de precipitina em *T. vitticeps*, capturados e notificados, no município de Itanhomi, Minas Gerais. 72
- Tabela 3.** Origem e porcentagem das fontes alimentares em relação aos locais de captura de *T. vitticeps* capturados no município de Itanhomi, Minas Gerais. 73
- Tabela 4.** Parâmetros do processo alimentar de ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps* (com aproximadamente 12 dias de jejum pós-muda) em camundongos e em pombos obtidos a partir do eletromiograma da bomba cibarial. TTC: tempo total de contato; TIT: taxa de ingestão total; GP: ganho de peso; F: frequência das contrações da bomba cibarial. 75
- Tabela 5.** Padrão do comportamento alimentar para ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*. Os valores em negrito mostram resultados onde  $p < 0,05$ . 77
- Tabela 6.** Padrão do comportamento de dejeção para ninfas de *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* pós-repasto sanguíneo. Os valores em negrito mostram resultados onde  $p < 0,05$ . ID= Índice de dejeção. 78
- Tabela 7.** Estrutura genética das amostras analisadas, comparadas "pairwise" e separadas de acordo com o ambiente de origem. Ne: número efetivo de alelos; H: heterozigotidade; Gst: índice de endocruzamento; Nm: número efetivo de migrantes por geração; D: distância genética. 82
- Tabela 8.** Resultado das atividades de captura de triatomíneos nos municípios incluídos nos distritos sanitários de Montes Claros, Caratinga, Teófilo Otoni e Diamantina, Minas Gerais, nos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995 pelo Programa de Controle da Doença de Chagas da Fundação Nacional de Saúde: número de triatomíneos e percentual correspondente ao total de capturas no período. 86
- Tabela 9.** Total de triatomíneos capturados por espécie nos municípios incluídos nos distritos sanitários de Caratinga, Diamantina, Montes Claros e Teófilo Otoni, nos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995 pelo Programa de Controle da Doença de Chagas da Fundação Nacional de Saúde. 86
- Tabela 10.** Valores médios e desvio padrão das cinco variáveis que melhor discriminam as áreas de presença e ausência do *T. vitticeps*. BIO2: Variação média diária (diferença entre a temperatura max e min), BIO3: Variação diária/Variação anual da temperatura, BIO12: Precipitação Anual, BIO16: Precipitação do trimestre mais úmido, BIO18: Precipitação do trimestre mais quente. 88
- Tabela 11.** Resultado do exame de conteúdo intestinal dos *T. vitticeps* quanto à infecção por tripanosomatídeos e cepas isoladas. 91
- Tabela 12.** Dados dos hospedeiros vertebrados capturados no ambiente silvestre do município de Itanhomi e resultado obtido no exame das ninfas utilizadas no xenodiagnóstico quanto à infecção por tripanosomatídeos. 92
- Tabela 13.** Classificação das amostras de *T. cruzi* obtidas de *T. vitticeps*, através da PCR multiplex. 93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACPC - Análise Componente Principal Comum  
AC - Tamanho do anticlípeo  
AO - Distância ante-ocular  
AT - Tamanho do tubérculo antenífero  
BIO1 - Temperatura média anual  
BIO2 - Variação diurna média  
BIO3 - Isotermalidade  
BIO4 - Temperatura sazonal  
BIO5 - Temperatura máxima do mês mais quente  
BIO6 - Temperatura mínima do mês mais frio  
BIO7 - Variação anual de temperatura  
BIO8 - Temperatura média do trimestre mais úmido  
BIO9 - Temperatura média do trimestre mais seco  
BIO10 - Temperatura média do trimestre mais quente  
BIO11 - Temperatura média do trimestre mais frio  
BIO12 - Precipitação anual  
BIO13 - Precipitação do mês mais úmido  
BIO14 - Precipitação do mês mais seco  
BIO15 - Coeficiente de variação da precipitação sazonal  
BIO16 - Precipitação do trimestre mais úmido  
BIO17 - Precipitação do trimestre mais seco  
BIO18 - Precipitação do trimestre mais quente  
BIO19 - Precipitação do trimestre mais frio  
cm - Centímetro  
CPqRR - Centro de Pesquisas René Rachou  
D - Distância genética  
EO - Distância extra-ocular  
F - Frequência de contração da bomba cibarial  
F1 - Primeira geração  
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
FUNASA - Fundação Nacional de Saúde  
G - grama  
GP - Ganho de peso  
°C - Grau celsius  
H - Heterozigosidade  
h - Horas  
Hz - Hertz  
ID - Índice de dejeção

IIR – Índice de ingestão relativa  
K – Proporção de locus polimórficos  
kDa - QuiloDalton  
Km - Quilômetro  
Km<sup>2</sup> - Quilômetro quadrado  
LATEC – Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de chagas  
LIT – Liver Infusion Triptose  
M - Macho  
m - Metros  
µg - Micrograma  
µl - Microlitro  
mg - Miligrama  
min - Minuto  
mL - Mililitro  
mM – Milimolar  
mV - Milivolts  
ne – Número efetivo de alelos  
nm – Nanômetro  
OE – Distância extra-ocular  
NNN – McNeal, Novy e Nicole  
PAS - Potencial de ação simples  
PACc - Potencial de ação composto  
Pb - Pares de base  
PCDCh - Programa de Controle da doença de Chagas  
PCR - Polymerase Chain Reaction  
PO – Distância pós-ocular  
PPFP - Percentual de parasitos fluorescentes  
RAPD – Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente  
S – Número de locus polimórficos  
SUCAM - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública  
sp - Espécie  
TIT – Taxa de ingestão total  
TCE – Tempo de contato efetivo  
TTP – Tempo total de contato  
UD - Unidade domiciliar  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
UR - Umidade relativa  
WHO - World Health Organization

## Resumo

Este estudo visa determinar características biológicas, eco-epidemiológicas e a dinâmica de populações de *Triatoma vitticeps* e *Trypanosoma cruzi* no município de Itanhomi, Minas Gerais. As casas da região estudada eram de bom padrão de construção, com a presença de inúmeros animais peridomiciliares, com ausência de colonização do intradomicílio, e a presença de pequenas colônias no peridomicílio. Os estudos de biosistemática também corroboram este dado, uma vez que as metodologias empregadas não foram capazes de discriminar os insetos pelo ambiente de origem, evidenciando uma única população. Sobre o comportamento alimentar dessa espécie, vários parâmetros foram avaliados. A análise do conteúdo estomacal revelado pela reação de precipitina demonstra o ecletismo alimentar desse vetor, com a identificação de oito fontes alimentares diferentes, muitas delas encontradas simultaneamente no mesmo inseto, o que poderia representar dificuldade para obtenção do repasto sanguíneo. Esta observação é reforçada pelos resultados obtidos com o monitoramento elétrico da bomba cibarial durante a alimentação em pombos ou camundongos. As análises demonstraram que a alimentação em camundongo demanda mais esforço do que em pombos. Considerando os primeiros 10 minutos de observação pós-repasto, o número médio de dejeções eliminadas pelo *T. vitticeps* foi significativamente menor que o *T. infestans*, reforçando a menor importância epidemiológica enquanto vetor. Apesar disso, verificou-se que a saliva do *T. vitticeps* inibe de forma gradual e irreversível a geração do impulso nervoso, levando à diminuição da percepção do hospedeiro à picada e demonstrando seu potencial "anestésico". Para inferir o potencial vetorial da espécie no estado de Minas Gerais, foi realizado um levantamento histórico sobre a presença do triatomíneo em ecótopos artificiais, a partir de dados da FUNASA. O resultado obtido serviu como referência para as análises de distribuição espacial, onde as variáveis de precipitação e variação de temperatura foram selecionadas como fortes indicadores de distribuição da espécie. De fato, a eclosão dos ovos de *T. vitticeps* foi influenciada negativamente por umidade relativa baixa e favorecida por umidade alta. Ainda neste contexto, a higropreferência das ninfas também foi estudada. Quando recém alimentadas, as ninfas escolhem os setores mais secos da arena e quando em jejum, os setores mais úmidos, demonstrando uma relação entre a higropreferência e o estado nutricional. Através da PCR multiplex, foi possível diagnosticar e caracterizar amostras de *T. cruzi* sem o isolamento prévio. Apesar da alta prevalência do grupo TcI, a presença de TcII sugere a possibilidade de ocorrência de um ciclo de transmissão envolvendo homens e animais domésticos. Mais ainda, a ocorrência do grupo TcII no ambiente silvestre pode ter significado no processo de evolução e adaptação de cepas ao ciclo doméstico do parasita. Apesar de a precipitina mostrar uma participação efetiva dos roedores na dieta dos *T. vitticeps* analisados, estes não constituem fonte de infecção importante para os insetos, uma vez que o DNA do parasita não foi encontrado em nenhuma das 266 amostras de sangue de roedores analisadas.

## Abstract

The aim of the present study was to determine the biologic, eco-epidemiologic and dynamics characteristics of *Triatoma vitticeps* and *Trypanosoma cruzi* populations from Itanhomi municipality, Minas Gerais. The houses have a good pattern of building, with many peridomestic animals and absence of intradomicile colonization, and the presence of little peridomiciliar colonies. The lack of domestic colonization is once more realized by the infestations pattern. The biosystematics approaches was unable to distinguish insects by habitat origin, confirming a unique population, thereby corroborating the former data. Some of the species feeding behavior parameters were evaluated. The precipitin reactions of gut content shows the vector feed ecletism, being able to identify eight different feeding sources, some of them occurring simultaneously in a same specimen, probably meaning difficulty to obtain a blood meal. This observation is reinforced by results of electronic monitoring of the vector cibarial pump during blood meals in mice and pigeons. The analysis showed that blood meals in mice requires more vector enforce than in pigeons. Considering first ten minutes of post meal observations, the mean number of dejections eliminated by *T. vitticeps* was significantly lower than *T. infestans* one, corroborating its less epidemiological importance status as vector. Nevertheless, was observed that the *T. vitticeps* saliva gradually and irreversibly inhibits the nervous pulse generation, reducing host awareness to the bites and then showing its potential as anesthetic agent. In order to evaluate the species potential role as vector in Minas Gerais, a historical survey of triatomine presence in artificial ecotopes was performed using FUNASA data. The results where useful in the spatial distribution analysis, and indicates that rainfall and temperature variations strongly affects species distribution. In fact lower levels of relative humidity negatively affected *T. vitticeps* egg hatching that was positively affected by higher ones. So on, the nymphs higropreference was also studied. Recently fed nymphs preferred driest sectors of the arena, unfed nymphs the most humid ones, showing that higropreference and nutritional status are related. Using the multiplex PCR, unpreviously isolated samples of *T. cruzi* were identified and characterized. Besides the high prevalence of TcI group, the presence of TcII suggests the possibility of a transmission cycle involving humans and domestic animals. Even so, the TcII group presence in the sylvatic ecotope may have importance in evolutionary and adaptation process of parasite strains to the domestic cycle. Despite the results of precipitin reactions showing an effective role of rodents as hosts for *T. vitticeps* blood meals, they are not important infection sources, as shown by the absence of parasite DNA in all the 266 samples examined.

## I - INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Aspectos gerais

A Tripanossomíase Americana é uma antroponose do Continente Americano e tem como agente etiológico um protozoário da família Tripanosomatidae, o *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Este flagelado parasita mamíferos e sua transmissão está intimamente relacionada ao hábito de vida dos vetores, insetos hemípteros hematófagos, popularmente conhecidos como barbeiros. A doença de Chagas ainda é considerada um grave problema de saúde pública e retrato das desigualdades sociais. Em toda América Latina, a transmissão do *T. cruzi* vem sofrendo grande redução devido a uma série de iniciativas, assistidas pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS). Em 2006, quase um século após a descoberta da doença, o Brasil foi formalmente declarado livre de transmissão pelo *Triatoma infestans* (Klûg, 1834) principal espécie vetora (Dias, 2006). Entretanto, estima-se que haja aproximadamente 10 milhões de pessoas parasitadas e que 40 milhões permaneçam sob risco de infecção nas Américas do Sul e Central (Schofield et al. 2006). No Brasil, a prevalência humana atual é estimada em três milhões de pessoas (Dias, 2001). Apesar do grande número de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, dos quais uma parcela significativa pode desenvolver quadros clínicos graves, a assistência médica e social aos infectados é precária na maioria das regiões endêmicas, consistindo assim em um grande desafio na elaboração de políticas públicas de saúde (Dias, 2006).

Inicialmente o *T. cruzi* era restrito ao ambiente silvestre, circulando entre os mamíferos através de transmissão congênita, por meio da cadeia alimentar ou pelo vetor. Na medida em que o homem invade este ambiente, ele se faz incluir na trajetória natural desta parasitose, ao viver em precárias moradias rurais, fruto de inadequadas relações políticas e sociais (Dias & Borges Dias 1979, Dias & Coura 1997). Várias espécies de triatomíneos adaptaram-se ao ambiente artificial, que oferece uma diversidade de abrigos e fontes alimentares, expondo o homem e animais domésticos ao contato com as fezes do vetor contaminadas pelo *T. cruzi*.

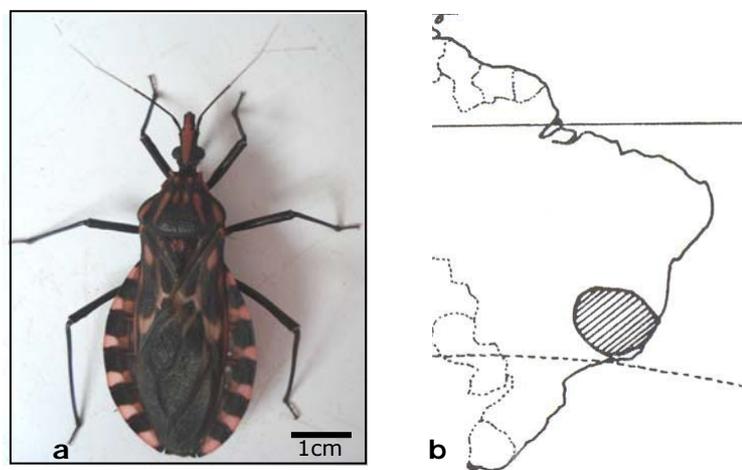
Os triatomíneos são insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae. Existem, atualmente, 140 espécies agrupadas em 19 gêneros e cinco tribos, sendo que 128 espécies, 17 gêneros e cinco tribos ocorrem nas Américas (Schofield & Galvão 2009). A maioria das espécies são estritamente silvestres e vivem associadas a uma variedade de

habitats e hospedeiros; outras podem ocupar também o ambiente peridomiciliar, tal como galinheiros, e umas poucas se encontram completamente adaptadas ao ambiente artificial (Schofield et al. 1999). Desta forma, Dias & Diotaiuti (1998) classificam as espécies de triatomíneos em primárias e secundárias, sendo as primeiras especializadas em colonizar de maneira permanente as habitações humanas de uma determinada região, geralmente em altas densidades, com marcada antropofilia e apresentando significativas taxas de infecção natural pelo *T. cruzi*. As espécies secundárias são geralmente autóctones da região, capazes de invadir e colonizar as casas em pequenas densidades. Na presença de uma espécie primária não são capazes de colonizar o intradomicílio. Além disso, são ubiquistas e em geral, ocupam ecótopos naturais e artificiais próximos às casas, associados a reservatórios silvestres e peridomiciliares, apresentando diferentes graus de antropofilia. Em situações particulares, podem constituir grandes colônias. As espécies que oferecem maior risco de transmissão da doença de Chagas, sob o ponto de vista epidemiológico, são as mais estudadas. Dessa forma, estudos que avaliam parâmetros biológicos, fisiológicos, comportamentais, bioquímicos e moleculares, são realizados com o objetivo de melhor caracterizar e conhecer as espécies e populações de triatomíneos, bem como as cepas de *T. cruzi* que veiculam, com vistas ao aprimoramento dos métodos de controle e vigilância da doença de Chagas.

## **1.2. Aspectos biológicos e eco-epidemiológicos relacionados ao *Triatoma vitticeps***

O *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) é encontrado no Brasil nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Lent & Wygodzinsky 1979, Silveira et al. 1984) (Figura 1), sendo o exemplar tipo proveniente do Rio de Janeiro. Considerado vetor de importância secundária na transmissão da doença de Chagas, o *T. vitticeps* vem sendo capturado com frequência nas habitações humanas. A área endêmica no Estado do Espírito Santo abrange 36 municípios, sendo nestes locais o triatomíneo predominante (Dias et al. 1989). Casos raros e esparsos da doença autóctones dessa região estão descritos desde 1975 por Barros et al. No Rio de Janeiro os primeiros trabalhos com *T. vitticeps* datam de 1979, em insetos procedentes da localidade de Cordeirinho, município de Maricá, e posteriormente foi notificada em outras 12 localidades (Ferreira et al. 1986).

Silveira et al. (1984) reuniram informações ao longo do período de 1975 a 1983 relativas a capturas domiciliares e peridomiciliares, anteriores e posteriores ao tratamento com inseticidas, obtidas na rotina de trabalho da antiga Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM). Naquela ocasião foram investigados 1942 municípios pertencentes a 19 Estados brasileiros. Destes, 36 municípios do Espírito Santo, dos quais 31 (86,1%) foram positivos para o *T. vitticeps*, 442 de Minas Gerais sendo 96 (21,7%) positivos para esta espécie e somente um (0,4%) dos 239 municípios investigados da Bahia. Embora o Estado do Rio de Janeiro tenha sido pesquisado (dois municípios) e a distribuição do *T. vitticeps* seja conhecida nesta região, nenhum exemplar deste vetor foi capturado ou notificado no período avaliado pelos autores. Recentemente, dados de distribuição da fauna triatomínica, segundo o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCh), no Estado de Minas Gerais, para o período de 2002 a 2006 (Siloto et al. 2007) mostraram que o *T. vitticeps* ocupa a terceira posição entre as espécies mais capturadas, perdendo para *Triatoma sordida* (Stål, 1859) e *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), sendo 1.701, 129.876 e 11.483 o número de exemplares capturados respectivamente.



(Foto de Rita de Cássia Moreira de Souza)

**Figura 1** – Exemplar adulto de *Triatoma vitticeps* (a) e mapa da distribuição geográfica da espécie (b; Carcavallo et al. 1999).

O *T. vitticeps* é considerado uma espécie silvestre, sendo baixa a prevalência da infecção humana nas áreas onde ocorre (Santos et al. 1969 a,c; Pinto et al. 1969, 1986; Barros et al. 1975; Peçanha et al. 1983; Silveira et al. 1983; Dias et al. 1989) apesar das altas taxas de infecção pelo *T. cruzi*

observada nos insetos adultos (Santos et al. 1969b, Silveira et al. 1983, Ferreira et al. 1986, Sessa & Carias 1986, Diotaiuti et al. 1987, Gonçalves et al. 1988, Dias et al. 1989).

A infecção natural do *T. vitticeps* por flagelados semelhantes ao *T. cruzi* foi demonstrada por Santos et al. (1969b) com 4% de infecção e Silveira et al. (1983) que obtiveram 25,2% de positivos. Os maiores índices de infecção foram constatados no estado do Espírito Santo por Sessa & Carias (1986), Dias et al. (1989) e Santos et al. (2005), que registraram: 64,7%, 60,8% e 100% respectivamente. Ainda em 1986, Ferreira et al. examinaram 51 adultos de 12 municípios do estado do Rio de Janeiro, constatando 35,2% de contaminação por flagelados tipo *cruzi*. Gonçalves et al. (1998) confirmaram os dados anteriores na localidade de Triunfo, distrito do município de Santa Maria Madalena, com um índice de infecção de 59,31%. Em Minas Gerais, levantamentos promovidos pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) apontaram 10,5% de infecção natural no ano 1990, 17,4% em 1993, 12,3% em 1994, 12,4% em 1998 e mais recentemente 12,9% em 1999. Estes altos níveis de infecção natural do *T. vitticeps* podem ser atribuídos à sua estreita relação com mamíferos silvestres, infectados pelo *T. cruzi*, indicando o potencial da espécie na manutenção do ciclo silvestre da doença de Chagas.

Vários autores atribuem a alta taxa de infecção dos *T. vitticeps* capturados no ambiente artificial a insetos adultos (Silveira et al. 1983, Sessa & Carias 1986, Ferreira et al. 1986, Dias et al. 1989), sendo os resultados para as ninfas quase sempre negativos. Gonçalves et al. (1998), além da alta infecção dos insetos adultos (59,31%), registraram pela primeira vez, em uma localidade do Rio de Janeiro, uma ninfa de quinto estágio capturada no intradomicílio e contaminada pelo *T. cruzi*. Entretanto, devido às condições epidemiológicas locais, os autores sugerem que esta infecção deve ter sido adquirida fora do domicílio.

Observações realizadas no Espírito Santo por Dias et al. (1989) mostraram uma tendência de invasão domiciliar por exemplares adultos de *T. vitticeps*, apesar da baixa capacidade destes insetos formarem colônias intradomiciliares. Os exemplares de *T. vitticeps* capturados nos municípios de Maricá, Santa Maria Madalena e São João da Barra, foram encontrados em casas que mantinham as luzes acesas no período da noite e todas se localizavam nas proximidades de matas ricas em bromeliáceas, piteiras e palmeiras. No município de Maricá, uma das casas achava-se próxima a um manguesal (Ferreira et al. 1986). Dos 465

exemplares estudados por Gonçalves et al. (1998), somente 15 (3%) eram ninfas e os autores não consideram como indício de colonização porque nem todas as fases de desenvolvimento (incluindo ovos) foram encontradas em uma mesma casa (apesar deste não ser o conceito de colonização utilizado pelos programas de controle, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, OMS 1991).

Em termos gerais a espécie tem sido capturada predominantemente no intradomicílio, o que corresponde ao encontro de adultos numa proporção de 6:1 em relação ao peridomicílio (Dias et al. 1989). Dos 465 espécimes estudados por Gonçalves et al. (1998), 455 (98%) foram capturados no intradomicílio, nove (2%) através de armadilhas luminosas montadas próximas às casas e apenas um exemplar (0,2%) foi capturado no peridomicílio, corroborando com a hipótese levantada pelo autor anterior. No entanto, de acordo com relatórios técnicos da FUNASA relativos ao período de 1990 a 1999, o encontro de colônias peridomiciliares tem sido freqüente (FUNASA 1990-1999). Entretanto, não se sabe quais são as características desta colonização em relação aos ecótopos preferenciais, determinantes microclimáticos e distribuição espacial, que possam colaborar na compreensão da dinâmica das populações presentes no intradomicílio, peridomicílio e ambiente silvestre.

Segundo Gonçalves et al. (1988) são necessários em média  $270 \pm 45$  dias para o *T. vitticeps* completar o ciclo biológico de ovo a adulto, sendo que o menor tempo registrado foi de 180 dias. Naquele experimento, os insetos foram mantidos sob condições controladas de temperatura (25°C a 28°C) e umidade relativa do ar ( $80 \pm 2\%$ ). À exceção do primeiro estágio, cuja alimentação foi oferecida diariamente, os demais estágios foram alimentados semanalmente em ratos brancos. Sob estas condições, os autores concluíram que há uma geração por ano.

De acordo com Ferreira et al. (1986), as maiores taxas de detecção domiciliar de *T. vitticeps* ocorrem no período entre novembro e fevereiro, que corresponde aos meses mais quentes e úmidos do ano. Dias et al. (1989) confirmam estes dados, prolongando este período para os meses entre setembro e abril. Outro aspecto relacionado ao encontro destes insetos no intradomicílio é a maior captura de fêmeas, o que pode estar relacionado à maior necessidade de sangue para a oviposição, ou ainda, a características naturais de dispersão da espécie (Dias et al. 1989, Gonçalves et al. 1991, 1998).

### 1.3. Aspectos comportamentais

#### 1.3.1. Alimentação e dejeção

Os triatomíneos são insetos hematófagos em todos os estádios evolutivos, obtendo sua alimentação sanguínea diretamente dos vasos (vênulas e arteríolas) do seu hospedeiro vertebrado. Estes insetos são denominados ectoparasitas temporários, uma vez que o único contato com o hospedeiro se dá no momento do repasto. Para que ocorra a transmissão e contaminação pelo *T. cruzi* é necessário que o inseto elimine as fezes contaminadas sobre a pele do hospedeiro (Dias, 1956). Para isso, fatores como o nível de interação vetor/hospedeiro e o tempo para eliminação das dejeções, devem ser levados em consideração para a caracterização de um bom vetor de forma que as fezes possam ser eliminadas sobre o hospedeiro, durante ou imediatamente após o repasto. Por outro lado, a velocidade com que um triatomíneo inicia e completa seu repasto - em outras palavras, um menor número de interrupções - aumentam as chances de sobrevivência, uma vez que diminui o risco de agressões do hospedeiro além de garantir a quantidade de sangue necessária para o processo de muda (Schofield, 1994).

A biologia e comportamento do *T. vitticeps* ainda são pouco conhecidos. O primeiro trabalho foi realizado por Dias (1956) em estudo comparativo com outras cinco espécies, observando os hábitos de dejeção e sucção de 11 ninfas utilizando como fonte alimentar pombo ou galinha. Os resultados obtidos em porcentagem de indivíduos que defecaram durante ou imediatamente após o repasto foram: 50% dos *Rhodnius prolixus* Stål, 1859, 30% dos *T. infestans*, 30% dos *Rhodnius neglectus* Lent, 1954, 22,7% dos *P. megistus*, 12,5% dos *T. sordida* e nenhum *T. vitticeps* defecou neste momento. Além disso, o *T. vitticeps* foi a espécie que necessitou de um maior tempo para sucção: 26,8 minutos em média contra 14,2 minutos para *R. prolixus*, que utilizou o menor tempo quando comparado as demais.

Em 1989, Gonçalves et al. comparam a resistência ao jejum do *T. vitticeps* com outras espécies, verificando que esta foi mais resistente que *R. neglectus*, *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 e *T. sordida* em todos os estádios, a uma temperatura de 30°C. Comparado com o *T. infestans*, observa-se uma menor resistência somente na fase adulta e com *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) mostra-se menos resistente somente no primeiro estádio. Além disso, os autores

concluem que a resistência da espécie em questão está diretamente relacionada ao estágio evolutivo, sendo que os machos foram mais resistentes que as fêmeas e ambos menos resistentes que as ninfas de terceiro estágio. Nesta mesma linha de pesquisa, Moreira et al. (2002), faz uma comparação entre *T. vitticeps* alimentados uma única vez após muda e um outro grupo que permanece em jejum até a morte. Neste sentido, os autores observaram que há um aumento significativo na longevidade dos insetos que receberam uma alimentação, alcançando um tempo de sobrevivência de 2,95 e 3,3 vezes maior em ninfas de terceiro e quarto estágio respectivamente. Pinto et al. (1992), em estudo de comportamento alimentar, testaram através de alimentador artificial a preferência por temperatura, constatando que 68% e 32% dos *T. vitticeps* alimentaram-se a 36°C e 26°C, respectivamente.

Durante o processo de alimentação, os triatomíneos introduzem suas peças bucais na pele do hospedeiro desencadeando alguns fenômenos como reações inflamatórias e hemostasia. Estas reações podem se tornar exacerbadas com o desenvolvimento de uma resposta imune contra os antígenos da saliva (Ribeiro, 1987), aumentando o comportamento de defesa do hospedeiro e diminuindo o sucesso na obtenção do repasto (Lehane, 1991). Todavia a saliva dos triatomíneos contém substâncias de ação farmacológica que auxiliam na alimentação tais como: anticoagulantes (Hellmann & Hawkins 1965, Ribeiro et al. 1995, Pereira et al. 1996a), anestésicos (Pereira et al. 1996b), vasodilatadores (Ribeiro et al. 1990) e inibidores de agregação plaquetária induzida por ADP (Smith et al. 1980, Ribeiro & Garcia 1980), colágeno (Ribeiro & Garcia 1981, Noeske-Jungblut et al. 1994) ou ácido aracdônico (Ribeiro & Sarkis, 1982).

Características do inseto como o tamanho da bomba cibarial, e fatores relacionados à hemostasia do hospedeiro (tempo de sondagem, frequência de contrações da bomba cibarial e interrupções durante a fase de ingurgitamento) determinam a duração do contato ao longo do processo de alimentação sanguínea. Em 1970, Smith & Friend padronizaram uma técnica para estudar o comportamento alimentar dos triatomíneos, com base em mudanças de resistência elétrica entre os insetos e sua fonte de alimentação. Para verificar se existem diferenças nos tempos exatos de sondagem e de ingurgitamento entre ninfas de três diferentes espécies de triatomíneos, Guarneri et al. (2000) aprimoraram essa técnica para registrar sinais gerados pela musculatura da bomba cibarial. Modificações posteriores da técnica permitiram registrar o comportamento alimentar dos diferentes estágios de desenvolvimento apoiando

o inseto sobre uma trama de metal ou utilizando eletrodos fixados no tórax do inseto (Guarneri et al. 2003).

A ocorrência de repastos múltiplos em *T. vitticeps*, tem sido observados em insetos coletados no campo. Este fato pode significar alguma dificuldade na obtenção de um repasto pleno em uma única fonte. Para o *T. infestans*, já foi demonstrado que a saliva possui um efeito inibitório sobre o Potencial de Ação Composto (PAC) em nervo ciático de rato e sobre canais de sódio de células GH3, mostrando-se de alto valor adaptativo (Dan et al. 1999). Neste contexto, informações referentes à interferência na percepção do hospedeiro à picada do *T. vitticeps* seriam fundamentais para o entendimento de aspectos relacionados ao comportamento alimentar dessa espécie.

### 1.3.2. Fatores ambientais

A umidade relativa do ar (UR) é um fator ambiental que pode afetar diferentes aspectos durante a vida de um inseto, o que tem sido comprovado também para triatomíneos. Roca & Lazzari (1994) investigaram a higropreferência de ninfas e adultos de *T. infestans* em gradientes de UR, bem como a influência da umidade na eclosão dos ovos e durante a ecdise. Tanto as ninfas quanto os adultos permaneceram nas áreas com UR próximas a 0%, não mudando seu comportamento com o horário do dia ou jejum. Os insetos também preferiram umidades baixas durante o período de ecdise e oviposição. Quando submetidos a diferentes UR, não foram observadas diferenças na eclosão dos ovos. Guarneri et al. (2002) também realizaram um estudo de higropreferência para o *T. brasiliensis*, espécie do semi-árido brasileiro. Tanto os ovos quanto o desenvolvimento das ninfas desta espécie foram afetados pela UR mais alta (99,9%). Entretanto, apenas a eclosão dos ovos foi diminuída pela UR menor (9,3%). Em *P. megistus*, Pires (2003) verificou que a baixa umidade afeta drasticamente a eclosão dos ovos, aumenta a mortalidade das ninfas pós-nascimento e interfere na capacidade de alimentação e na realização da muda de estágios iniciais da espécie. Entretanto, quando colocadas em um gradiente de umidade relativa, as ninfas de *P. megistus* preferiram umidades próximas a 0% quando recém alimentadas e durante a ecdise, mudando-se para áreas com umidades mais altas quando o tempo de jejum foi aumentado.

Considerando as sucessivas transformações ambientais causadas pelo

homem, várias espécies de importância secundária e até mesmo terciária na transmissão da doença humana estão sendo encontradas no interior das habitações, aumentando o risco de transmissão e adquirindo importância epidemiológica.

A influência dos fatores ambientais sobre a distribuição e abundância de diferentes espécies de insetos é amplamente reconhecida, podendo as variáveis climáticas (temperatura e umidade, principalmente) influir sobre suas funções vitais (Gorla et al. 1997). De acordo com dados da "World Health Organization" (WHO, 1990) a distribuição geográfica da maioria dos vetores de doenças é limitada pelas condições climáticas. Sendo assim, mudanças na média da temperatura e precipitação terão impacto na sua incidência e distribuição, permitindo a ocupação de novas áreas pelos vetores ou até mesmo o deslocamento das populações de uma área para outra, podendo alterar sua distribuição inicial.

Informações utilizando variáveis biofísicas registradas por sensores remotos localizados a bordo de satélites, têm sido empregadas como uma nova ferramenta que permite analisar de forma "preditiva" a distribuição espacial das espécies, fornecendo subsídios para a supervisão e o controle de vetores. Através desta técnica e posterior análise discriminante, foi possível identificar corretamente 90% dos locais onde o *T. infestans* está presente e ausente (Gorla, 2002). Este modelo selecionou seis variáveis de maior peso para a análise: quatro associadas com a temperatura do ar, uma com a radiação infravermelha e outra com o índice de vegetação, mostrando a importante associação entre as variáveis estudadas e a distribuição desta espécie. Recentemente, Carbajal de La Fuente et al. (2008) propuseram um modelo de predição da distribuição geográfica de *Triatoma wygodzinskyi* Lent, 1951 e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola 1964. As análises foram baseadas em variáveis biofísicas obtidas de imagens de sensores, localizados à borda dos satélites AVHRR (Advanced Very High Resolution Radiometer) e MODIS (Moderate-resolution Imaging Spectroradiometer). A hipótese levantada é que a distribuição das duas espécies é definida por características ambientais diferentes, relacionadas à temperatura e pressão de vapor para o modelo *T. wygodzinskyi*, e índice de vegetação e temperatura de superfície da terra no modelo *T. pseudomaculata*. A partir dos resultados obtidos, os autores sugerem que as informações ambientais promovidas por sensores remotos podem ser utilizadas com sucesso em estudos sobre a distribuição geográfica de vetores da doença de Chagas.

### 1.3.3. Estudo da fonte alimentar

A identificação da fonte alimentar de insetos hematófagos tem sido frequentemente utilizada no estudo epidemiológico de doenças infecciosas objetivando descobrir o potencial vetorial que os insetos apresentam para inúmeras doenças, entre elas a doença de Chagas. Em 1960, Siqueira mostrou ser possível obter através da reação de precipitina, a fonte alimentar de triatomíneos mantidos sob condições de laboratório, mesmo quando a ingestão do sangue havia ocorrido a mais de 120 dias.

Dias et al. (1989) e Gonçalves et al. (2000) demonstraram que o *T. vitticeps* apresenta um grande ecletismo alimentar testando vários tipos de antisoros através da reação de precipitina. Dias et al. (1989) obtiveram um aspecto de grande importância epidemiológica: a participação significativa do homem como fonte alimentar dos exemplares de *T. vitticeps* provenientes do Espírito Santo. Dos 222 espécimes examinados, 198 (89,2%) haviam ingerido sangue humano. Destes, foram verificados 50 casos de associação da fonte humana com uma outra fonte, 33 com duas fontes, 43 com três fontes, 33 com quatro e 26 com cinco outras fontes alimentares. Em 13 insetos, o sangue humano era fonte única de alimentação. As ninfas, além de mostrarem uma menor variedade alimentar em relação aos adultos, sugaram menos em roedores e marsupiais que foram as terceira e quarta fontes mais freqüentes nos insetos adultos. Este fato também tem grande importância epidemiológica podendo resultar em fontes de infecção pelo *T. cruzi* (Dias et al. 1989). Resultados obtidos por Lorosa et al. (2003) reforçam o ecletismo alimentar desta espécie. Todos os 46 triatomíneos testados, capturados no intradomicílio, foram reativos totalizando 70 repastos identificados, dos quais 22 (31,4%) eram de humanos, seguidos dos roedores (24,3%), aves (20%), cães (15,7%) e marsupiais (8,6%).

### 1.4. Estudos de variabilidade genética

Estudos genéticos têm sido realizados com diferentes espécies de triatomíneos empregando técnicas morfométricas, bioquímicas, citogenéticas e moleculares. Segundo Borges et al. (1999) estes estudos, e a conseqüente avaliação de variabilidade genética, propõem principalmente a determinação de variações fenotípicas e biológicas que possam estar relacionadas com mudanças

comportamentais de uma espécie, frente aos métodos de controle. Desta forma, a biosistemática pode auxiliar o PCDCh através do encontro de populações com maior potencial biológico e vetorial.

#### 1.4.1. Perfil eletroforético de isoenzimas

As isoenzimas são diferentes formas moleculares de uma mesma enzima que, embora possuam estruturas moleculares diferentes, continuam exercendo as mesmas funções dentro da célula. O perfil eletroforético de isoenzimas é uma técnica muito utilizada em estudos taxonômicos e populacionais. Epidemiologicamente, o estudo de isoenzimas se torna importante tendo em vista verificar a existência de diferenças que poderiam atuar significativamente no comportamento do vetor.

Assim, as isoenzimas têm sido utilizadas em estudos de populações de *T. infestans* (Garcia et al. 1995, Dujardin et al. 1998b), *T. brasiliensis* (Borges et al. 2000), *T. sordida* (Noireau et al. 1999b), *R. neglectus* (Soares et al. 1999), *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg 1965 (Soares et al. 2001). As isoenzimas também são utilizadas na diferenciação específica, principalmente quando as espécies apresentam difícil distinção morfológica ou pertencem a complexos de espécies (Harry et al. 1992, Lopez & Moreno 1995, Solano et al. 1996). Dórea et al. (1982) utilizaram as isoenzimas com o objetivo de estudar a heterogeneidade intra-específica em *P. megistus*, sem encontrar diferença entre as populações. A partir dos resultados comparando populações desta mesma espécie, Barbosa et al. (2003) sugeriram a inclusão do Estado de Minas Gerais na área de origem do *P. megistus*, devido ao maior polimorfismo da enzima fosfoglicomutase (PGM) encontrado nessa população. Ampliando o número de populações de *P. megistus* estudadas, Barbosa (2004) encontrou quatro perfis isoenzimáticos diferentes para esta enzima, sem, entretanto, estabelecer relações com a região geográfica ou ecótopo onde os insetos foram capturados.

#### 1.4.2. Morfometria

Sabe-se, atualmente, que características morfológicas são reguladas por vários genes (carácter poligênico), cada um deles produzindo um pequeno e

praticamente imperceptível efeito fenotípico. Entretanto, a soma de cada um destes efeitos pode gerar mudanças capazes de serem detectadas por medição dos caracteres (Dujardin et al. 1999).

A morfometria constitui uma importante ferramenta na taxonomia de triatomíneos e estudos comparativos inter e intra-específicos, podendo diferenciar populações provenientes de diversas regiões geográficas (Casini et al. 1995, Pires et al. 1995, Dujardin et al. 1997, Barbosa 1998), além de separar insetos de uma mesma região que vivem em ambientes diferentes (Dujardin et al. 1998b). Através dessa técnica Dujardin et al. (1998b) observaram que espécimes domiciliares tendem a ser menores que os silvestres revelando um efeito da densidade populacional sobre o tamanho dos insetos, além de diminuir a diferença de tamanho entre machos e fêmeas.

Dujardin et al. (1995) estudando duas populações (uma silvestre e uma doméstica) de *T. infestans* da Bolívia demonstraram que estas eram distintas e diferenciavam-se através da morfometria da cabeça embora os resultados isoenzimáticos fossem indiferentes. Estudos envolvendo o mecanismo de reinfestação também foram realizados com o *T. infestans*. Através da morfometria foi possível identificar qual das populações analisadas estava participando do processo de reinfestação das casas após o controle químico (Dujardin, 1996). Baseado em estudos morfológicos e morfométricos, Oliveira et al. (2007) redescreveram o gênero *Cavernicola* e a tribo Cavernicolini. Neste estudo, a morfometria tradicional permitiu confirmar a separação das espécies *Cavernicola pilosa* Barber, 1937 e *Cavernicola lenti* Barrett & Arias, 1985, e a permanência destas em um mesmo gênero.

Entretanto, sabe-se que ocorrem alterações entre indivíduos de uma mesma população, que não são expressas fenotipicamente e, conseqüentemente, não são detectáveis por meio da morfometria. Os avanços na biologia molecular e o seu emprego em estudos de genética populacional podem contribuir para o melhor entendimento da variabilidade destes insetos.

#### 1.4.3. Polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD)

O desenvolvimento da técnica PCR, "Polymerase Chain Reaction" - Reação em Cadeia da Polimerase (Saiki et al. 1985, Mullis & Faloona 1987), representou um avanço significativo na biologia molecular, pois tornou possível a amplificação

de fragmentos de DNA *in vitro* por intermédio de simples reação enzimática.

Em 1990, Welsh & McClelland e Willians et al. desenvolveram independentemente, tendo como princípio a PCR, técnicas semelhantes que permitiram a verificação dos níveis de variabilidade genética em diversos sítios do genoma, sem conhecimento prévio de seqüências específicas do DNA. Esta técnica é denominada RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA" - Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente) e os iniciadores empregados possuem seqüências aleatórias. A ligação dos iniciadores a múltiplas regiões do genoma permite a amplificação de segmentos anônimos, que não tem uma correlação obrigatória com regiões transcritas ou não transcritas, repetitivas ou não, variáveis ou conservada (Willians et al. 1990, Ferreira & Gratapaglia 1998).

Grosberg et al. (1996) apontam algumas vantagens oferecidas pela RAPD, dentre elas: rapidez de geração de um grande número de marcadores aparentemente polimórficos e neutros distribuídos ao longo do genoma, simplicidade do protocolo, baixo custo e a pequena quantidade de DNA necessária. A desvantagem consiste principalmente na difícil manutenção da reprodutibilidade, pois requer, para isto, condições de reação rigorosamente padronizadas.

A eficiência da técnica é atestada por diversos estudos que a utilizaram. Dentre as aplicações dos marcadores de RAPD, destacam-se os estudos sobre estrutura genética de populações, análises de paternidade e identificação de espécies e linhagens (Parker et al. 1998). Esta técnica foi utilizada com sucesso em estudos com bactérias (Welsh & McClelland 1990), plantas (Welsh et al. 1991a), trematódios (Dias Neto, 1993), moluscos (Carvalho et al. 2001), protozoários (Tibayrenc et al. 1993; Steindel et al. 1993), peixes (Mamuris et al. 1999), mamíferos (Welsh et al. 1991b, Cooper 2000, Bowlanda et al. 2001) e abelhas (Almeida, 2002).

Também no estudo de triatomíneos, a técnica tem demonstrado sua importância. Garcia et al. (1998) compararam diferentes gêneros, espécies e algumas populações deste grupo, conseguindo a diferenciação específica de tais insetos, inclusive de algumas consideradas morfologicamente similares como *Rhodnius ecuadoriensis* Lent & Leon 1958, *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 e *Rhodnius nasutus* Stål, 1859, confirmando a afinidade entre as mesmas. Dujardin et al. (1998a), compararam populações de *R. prolixus* da Colômbia e Honduras, com dados de RAPD e morfometria, sugerindo que essa espécie foi introduzida passivamente no ambiente domiciliar da América Central, sem

qualquer ligação com o ambiente silvestre, o que permite sua eliminação desta região. Jaramillo et al. (2001) verificaram que *Rhodnius colombiensis* Mejia, Galvão & Juberg 1999 silvestres e *R. prolixus* intradomiciliares são isolados reprodutivamente, e que a primeira espécie apresenta maior variação genética em relação à outra. Populações de *T. brasiliensis* foram agrupadas de acordo com o local de captura no ambiente silvestre, peridomiciliar ou domiciliar, demonstrando, ainda, que o processo de domiciliação dessa espécie é decorrente de múltiplos processos de invasão das casas por exemplares silvestres (Borges et al. 2000, 2005). Mais recentemente, Barbosa et al. (2006) estudando populações de *P. megistus* mostrou, através da RAPD, clara separação biogeográfica das populações, coincidente com os diferentes biomas de onde procediam os insetos estudados.

A utilização conjunta dos marcadores moleculares com outras técnicas, como a morfometria e a eletroforese de isoenzimas, permite melhor aproximação dos resultados à realidade (Dujardin et al. 1998b, Soares et al. 2001).

### **1.5. Aspectos relacionados ao *Trypanosoma cruzi***

O *T. cruzi* é considerado um dos parasitos de maior sucesso adaptativo já que aproximadamente 100 espécies de mamíferos, de diferentes ordens, atuam como reservatórios (Brenner 1973, Devera et al. 2003, Garcia et al. 2007). A doença de Chagas é transmitida por insetos pertencentes à família Reduviidae, subfamília Triatominae. Estes insetos infectam animais selvagens durante o repasto sanguíneo, mantendo dessa forma o ciclo silvestre da doença (Kirchhoff et al. 2004). Na luz do intestino médio do inseto vetor, o *T. cruzi* transforma-se em formas epimastigotas, multiplica-se e diferencia-se em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o homem. A transmissão do *T. cruzi* ao homem ocorre através da deposição de fezes e urina do triatomíneo infectado sobre a pele danificada e pelas mucosas do hospedeiro no momento do repasto sanguíneo. Os tripomastigotas metacíclicos invadem diversos tipos de células do hospedeiro, transformam-se em amastigotas, se multiplicam e após um período aproximado de quatro dias, se diferenciam em tripomastigotas, que rompem as células infectadas e são liberados no meio extracelular. Esses tripomastigotas podem invadir células adjacentes ou cair na circulação sanguínea, onde serão ingeridos pelo inseto vetor durante a alimentação, mantendo o ciclo doméstico

da doença, ou irão iniciar novos ciclos multiplicativos em outros tecidos (Tanowitz et al. 1992)

Estudos de genética de populações demonstraram que o *T. cruzi* apresenta uma típica estrutura clonal (Tibayrenc et al. 1986), amplamente distribuída na natureza, conferindo-lhe um caráter de extrema heterogeneidade. Esta hipótese concorda com a variabilidade fenotípica e biológica apresentada pelo parasito (Brenner 1992, Pinto et al. 1998). Alguns estudos demonstram que certas populações apresentam diferentes habilidades para sobreviver, multiplicar e diferenciar no vetor, o que deverá ter importância na transmissão do parasito (Lana et al. 1998).

A análise de isoenzimas por "Multilocus Enzyme Electrophoresis" (MLEE) tem sido usada por diversos autores para identificar populações de parasitos. A caracterização de populações naturais do *T. cruzi*, inicialmente realizada com um pequeno número de marcadores de isoenzimas, sugeriu uma classificação em três grupos distintos que foram chamados zimodemas Z1, Z2 e Z3 (Miles et al. 1978, 1980). Estudos realizados por Romanha et al. (1979) e Romanha (1982) verificaram a presença de 4 zimodemas distintos, denominados ZA, ZB, ZC e ZD. A comparação dos zimodemas descritos por Romanha com aqueles descritos por Miles, mostrou grande similaridade entre os zimodemas ZA e Z2, enquanto que os demais zimodemas foram distintos entre si. Desta forma, admite-se que no Brasil o *T. cruzi* esteja distribuído em pelo menos 6 grupos isoenzimáticos principais: Z1, Z2 ou ZA, Z3, ZB, ZC e ZD.

Posteriormente, esses estudos foram estendidos para incluir 15 loci gênicos codificantes para enzimas de 121 isolados do *T. cruzi*, compreendendo ambos os ciclos doméstico e silvestre e com uma grande distribuição geográfica (dos EUA ao sudeste do Brasil e Chile). Estas análises aumentaram para 43 o número de cepas naturais definidas por isoenzimas, ou "clonets" (Tibayrenc et al. 1986).

Com os avanços da biologia molecular, novas técnicas foram desenvolvidas como o polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) de kDNA (Morel et al. 1980, Tibayrenc & Ayala 1987), a avaliação do cariótipo molecular (Henriksson et al. 1995), DNA "fingerprinting" (Macedo et al. 1992), "Random Amplified Polimorphic DNA" (RAPD) (Tibayrenc et al. 1993, Steindel et al. 1993) e microssatélites (Oliveira, 1998). Essas técnicas mostraram a alta heterogeneidade genética do parasito.

Souto et al. (1996) demonstraram que ampliações de seqüências distintas na porção terminal 3' do gene do RNA ribossomal 24S<sub>r</sub> (rDNA) e seqüência do

mini-exon indicam um polimorfismo em ambos os genes repetidos em tandem: 125 ou 110pb para rDNA e 300 a 350pb para o mini-exon. Os autores observaram uma associação dos produtos de 125pb do rDNA com o de 300pb do mini-exon (definido como grupo 1). Os produtos de 110pb do rDNA com o de 350pb do mini-exon (definido como grupo 2) e a presença de ambos os produtos de amplificação do rDNA com o mini-exon do grupo 1 (grupo 1/2). Esses estudos mostram uma clara divisão do *T. cruzi* em duas grandes linhagens apresentando uma alta divergência filogenética.

Diversos isolados classificados por MLEE como Z1 e Z2 foram comparados com os grupos 1 e 2 do *T. cruzi* e mostraram que os isolados classificados como Zimodema 1 estão na linhagem 2, e os isolados do Zimodema 2 estão agrupados na linhagem 1 (Souto et al. 1996). Outras análises sugerem que as cepas do *T. cruzi* podem ser divididas em dois grupos principais. O fracionamento em bandas cromossômicas por PFGE ("Pulsed Field Gel Electrophoresis") e hibridização com diversas sondas indicaram uma certa correlação entre padrões de cariótipo e os zimodemas clássicos Z1 e Z2 (Henriksson et al. 1995). Análises de isoenzimas e RAPD em cepas do *T. cruzi* (Tibayrenc, 1995) sugerem que *T. cruzi* pode ser subdividido em duas linhagens filogenéticas principais, cada uma contendo considerável heterogeneidade.

A ausência de uma nomenclatura comum dificultava uma correlação com as complexas manifestações clínicas e epidemiológicas da doença. Assim, em abril de 1999, durante o Simpósio Internacional Comemorativo dos 90 anos da Descoberta da Doença de Chagas, no Rio de Janeiro, foi adotada a subdivisão da espécie *T. cruzi* em duas linhagens principais, tendo sido oficializada uma nomenclatura inicial *T. cruzi I* (TcI) e *T. cruzi II* (TcII). TcI é extremamente disperso dentro do ciclo silvestre e pode representar a forma original do *T. cruzi*. TcII é encontrado associado com pacientes e com *T. infestans*. Ambos, TcI e TcII, estão associados com lesões cardíacas em infecções humanas, mas foi visto que apenas TcII está associado também com lesões do trato digestivo (Anonymous, 1999).

Atualmente sabe-se que dentro do genótipo TcII, cinco subgrupos já foram identificados e denominados TcIIa-e (Barnabé et al. 2000, Brisse et al. 2000, 2001, Bosseno et al. 2002, Pacheco et al. 2005, Herrera et al. 2007). No grupo TcI nenhuma subdivisão havia sido proposta, mas recentemente, Herrera et al. (2007) e O'Connor et al. (2007) observaram quatro haplótipos, sugerindo também uma variação genética dentro desse grupo.

As técnicas usadas para classificação do *T. cruzi* em geral são trabalhosas e/ou necessitam de uma quantidade razoável de DNA. Em 2006, Liarte desenvolveu um sistema de PCR multiplex que envolve o uso simultâneo de iniciadores específicos em uma única reação, possibilitando o diagnóstico e a classificação paralela de cepas do parasito dos grupos I e II. Essa metodologia tem sido amplamente empregada em estudos para identificação específica de moluscos (Vidigal et al. 2002) e diagnóstico de infecção por *Schistosoma mansoni* (Jannotti-Passos et al. 1997). Mais recentemente, essa técnica foi utilizada para identificação simultânea de três espécies do gênero *Biomphalaria* e a infecção destas por *S. mansoni*, empregando seis iniciadores simultaneamente (Jannotti-Passos et al. 2006). De acordo com Liarte (2006), essa metodologia tem como vantagens: utilizar pequena quantidade de DNA (a partir de 10fg, aproximadamente 1/30 do DNA total do parasito), alta sensibilidade e especificidade. Além disso, têm a facilidade de extrair DNA do parasito diretamente do papel filtro, eliminando todo o processo de isolamento de cepas.

A marcação molecular das cepas permite calcular o intercâmbio entre os ciclos silvestre e doméstico da doença de Chagas. Para as cepas originárias do *T. vitticeps*, esta caracterização poderá revelar padrões moleculares que possam estar relacionados às baixas taxas de prevalência da infecção humana nas áreas de ocorrência deste triatomíneo. Interessam sobretudo as avaliações da importância vetorial do *T. vitticeps* na área estudada e a melhoria do conhecimento com vistas à vigilância epidemiológica.

## II - OBJETIVOS

---

## 2.1. Objetivo geral

✓ Estudar as características biológicas, eco-epidemiológicas e a dinâmica de populações de *Triatoma vitticeps* e *Trypanosoma cruzi* em Itanhomi, Minas Gerais.

## 2.2. Objetivos específicos

✓ Caracterizar a infestação das unidades domiciliares pelo *T. vitticeps*, através da determinação dos ecótopos, e relação com o ambiente natural;

✓ Analisar o potencial vetorial do *T. vitticeps* com relação à transmissão da doença de Chagas humana;

✓ Determinar as variáveis ambientais associadas à distribuição geográfica do *T. vitticeps* de acordo com dados obtidos por satélites;

✓ Determinar a ocorrência de intercâmbio entre os ciclos silvestre, peridoméstico e doméstico do *T. vitticeps* pela caracterização dos triatomíneos, através das técnicas:

- morfometria da cabeça;
- estudo de isoenzimas;
- DNA (RAPD);

✓ Estudar o efeito da umidade relativa sobre a eclosão dos ovos e a higropreferência do *T. vitticeps* sob efeito do estado nutricional;

✓ Estudar o comportamento alimentar do *T. vitticeps* através da dinâmica de ingestão sanguínea, fontes alimentares (reação de precipitina) e também verificar se a saliva deste vetor interfere na percepção do hospedeiro à picada, agindo sobre a geração do impulso nervoso;

✓ Determinar a dinâmica de dejeção de ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps* em comparação com *T. brasiliensis* e *T. infestans*;

✓ Determinar o índice de infecção pelo *T. cruzi* nos *T. vitticeps* capturados no município de Itanhomi – Minas Gerais;

✓ Diagnosticar e caracterizar amostras de *T. cruzi* circulantes nos ambientes domiciliar, peridomiciliar e silvestre, no vetor *T. vitticeps* e roedores, do município de Itanhomi, Minas Gerais, pela multiplex-PCR.

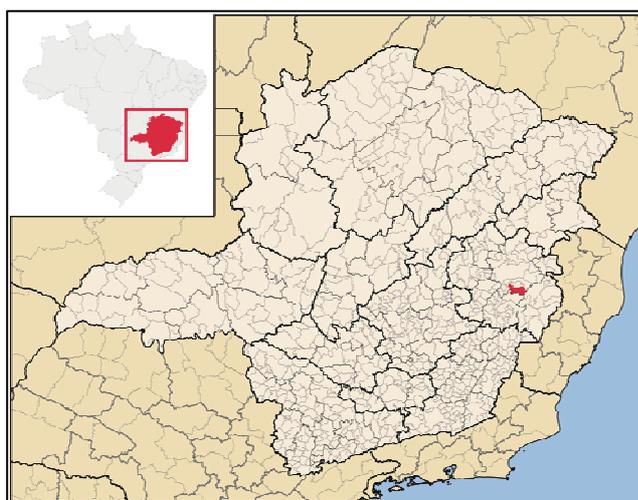
### III - MATERIAIS E MÉTODOS

---

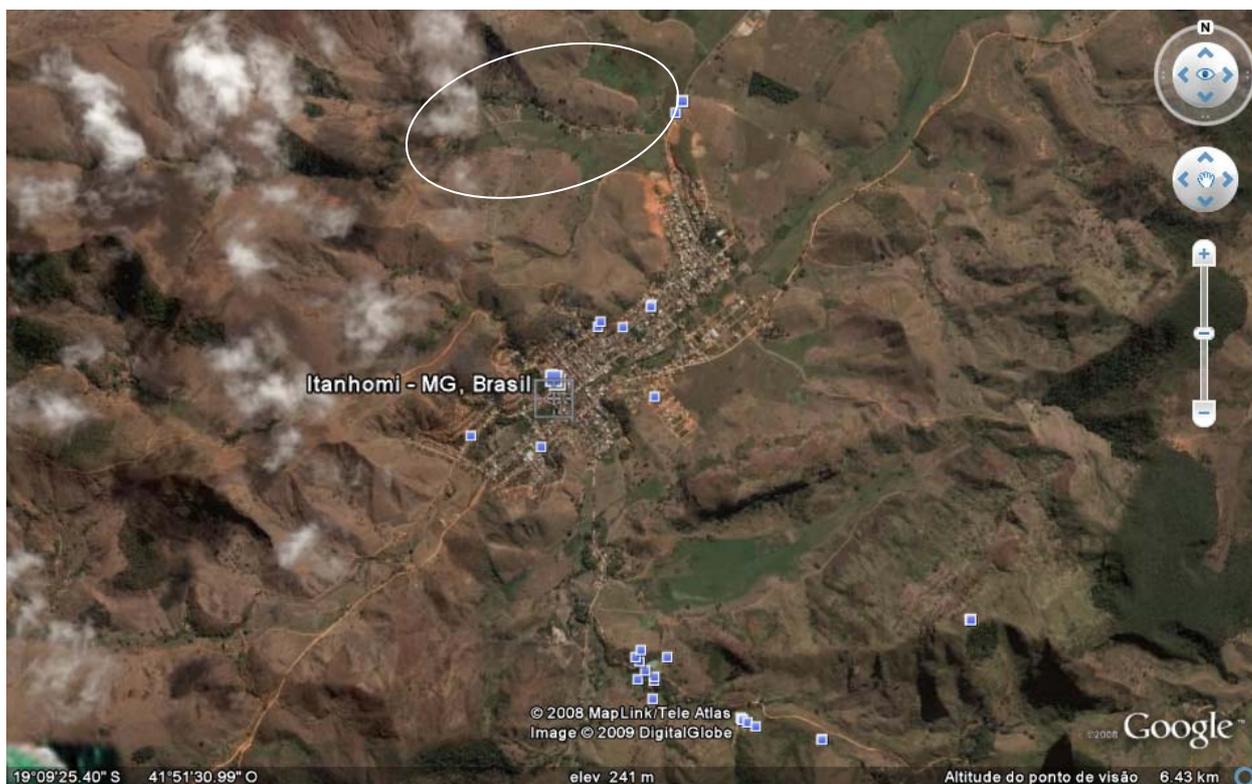
### 3.1. Área trabalhada

O município de Itanhomi ( $19^{\circ}11'15''\text{S}$ ;  $41^{\circ}48'45''\text{W}$ ) localiza-se a 387 km de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (Figura 2), na região do Vale do Rio Doce em uma área originalmente ocupada por Mata Atlântica, de clima úmido e terreno montanhoso. Este município foi escolhido para o presente estudo por ter o *T. vitticeps* como a principal espécie capturada (FUNASA, 1990-1999). A área urbana e rural desse município compreende 93 localidades, sendo que 11 áreas rurais (Adão Daniel, Cabeceira do Guido, Francisco Inácio, Jesus Julião, José Horta, José Noberto, João Caboclo, Júlio Carlos, Liés Alves, Orides I e Valico) (Figura 3) foram submetidas a uma pesquisa de infestação, de acordo com a metodologia empregada pelo PCDCH no ano de 2002, à procura de triatomíneos nas unidades domiciliares. No ano seguinte, uma pesquisa foi realizada à procura de triatomíneos silvestres, como se verá a seguir.

Na primeira ocasião, foram preenchidos formulários tomando nota das características da unidade domiciliar, como o tamanho da área, presença ou ausência de animais domésticos, tipos de anexos e distância do mesmo em relação à casa e ao ambiente silvestre (Anexo 1 e 2). Devido ao grande número de insetos notificados em uma casa da localidade Cabeceira do Guido, este local foi determinado para a pesquisa de triatomíneos silvestres que apresenta como característica geral, uma vegetação residual de Mata Atlântica muito próxima à casa (aproximadamente 100 m).



**Figura 2** Mapa de Minas Gerais (escala 1:250.000) com o município de Itanhomi representado em vermelho ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).



**Figura 3** – Imagem de satélite do município de Itanhomi (software Google Earth versão 4.3), com localização aproximada (elipse) das 11 localidades rurais submetidas à pesquisa de infestação triatomínica das unidades domiciliares no ano de 2002. Os quadrados azuis não correspondem às localidades e representam alguns pontos marcados pelo software.

### 3.2. Os insetos

Três amostras de *T. vitticeps* provenientes do município de Itanhomi foram estudadas: intradomicílio, peridomicílio e ambiente silvestre. No intra (Figuras 4 A e B) e peridomicílios (Figuras 5 C e D), os insetos foram capturados manualmente (sem uso de desalojante) pela equipe do PCDCh, através de busca ativa nas residências e seus respectivos anexos. Para a captura no ambiente silvestre (Figuras 6 E e F), foram pesquisados cuidadosamente os troncos e ocos de árvores vivas ou mortas, tufos de vegetação e pedras nas proximidades de uma casa com freqüente ocorrência deste triatomíneo. Também foram montadas duas armadilhas luminosas por três noites consecutivas (das 18 às 21 horas). As armadilhas constituíam-se de um pano branco (2,5 m de comprimento por 1,5 m de altura) estendido verticalmente a 80 cm do chão, e lâmpada fluorescente branca de 250W posicionada centralmente. Outro recurso utilizado para a captura de triatomíneos silvestres foi a distribuição de 180 armadilhas de Noireau (Noireau et al. 1999a), em uma área de aproximadamente 2km<sup>2</sup> em

torno da mesma casa onde foram colocadas as armadilhas luminosas. Estas armadilhas constituíam-se de um pote plástico branco leitoso com 8,5cm de altura e 7cm de diâmetro. Uma abertura de 5cm de diâmetro foi feita na tampa, e uma tela de malha fina foi adaptada para fornecer oxigênio para os camundongos e liberar odores para atrair os insetos. Fitas dupla-face de 2cm de largura foram colocadas na base do pote e entre a tampa e o pote. Sua função era fornecer um substrato que permitisse a adesão dos insetos, evitando a fuga. As armadilhas foram distribuídas a partir das 17 horas e retiradas às nove horas do dia seguinte. Camundongos suíços, fornecidos pelo biotério do CPqRR, com peso de aproximadamente 25g foram utilizados como iscas vivas (um em cada pote).

Os insetos capturados foram trazidos e mantidos no LATEC/CPqRR em frascos separados de acordo com o local de captura sob condições semi-controladas de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa ( $60 \pm 10\%$ ). O fundo de cada frasco foi coberto com folhas de papel filtro para a retenção da umidade produzida pelas fezes e urina dos insetos e uma sanfona vertical de cartolina, da mesma altura do frasco, é colocada com a finalidade de aumentar a superfície de contato e possibilitar a alimentação quinzenal em galinhas ou camundongos.

Todas as fêmeas chegaram ao laboratório férteis e ovíparas. As colônias ainda são mantidas por local de captura sem determinar a geração, e delas foram retirados os insetos para os experimentos. Somente para os estudos de biosistemática (isoenzimas, RAPD e morfometria da cabeça), foram utilizados insetos adultos da primeira geração (F1). Para os estudos de higropreferência, foram utilizados insetos de uma colônia mista de várias procedências do LATEC.



**Figura 4** – A) Interior de um domicílio com destaque para as frestas no assoalho em continuidade com o porão; B) Fêmea de *T. vitticeps* capturada no intradomicílio (Fotos Rita C M Souza).



**Figura 5** – C) Vista do peridomicílio e acesso de animais domésticos ao porão, ressaltando um ninho em galinheiro aberto (seta); D) ninfa de *T. vitticeps* capturada no porão de uma das casas trabalhadas, em Itanhomi, MG (Fotos Rita C M Souza).



**Figura 6** – Visão da casa em relação ao ambiente silvestre (E e F).

### 3.3. Comportamento alimentar

#### 3.3.1. Teste de precipitina

Esta etapa do projeto teve início em 2002, quando os primeiros insetos chegaram ao LATEC. Além dos *T. vitticeps* capturados em duas pesquisas de campo, também foram utilizados aqueles coletados pelos próprios moradores dentro dos domicílios e posteriormente notificados e encaminhados ao laboratório. Quando o conteúdo estomacal dos insetos estava fresco, ou seja, insetos vivos, o material era colocado diretamente sobre papel filtro pela técnica de compressão abdominal. Quando os insetos estavam mortos, com o conteúdo estomacal seco, este era dissecado e o material extraído eluído em 1ml de salina antes da absorção pelo papel filtro. Depois de secos, os papéis eram envolvidos em papel alumínio e armazenados individualmente a -20°C.

O material processado foi enviado para o Departamento de Entomologia (FIOCRUZ), aos cuidados do Dr. Elias Lorosa, para identificação da fonte alimentar através da técnica da reação de precipitina. A bateria de anti-soros adotados e os respectivos títulos utilizados foram: humano (1:15.000), roedor (1:15.000), ave (1:10.000), gambá (1:12.000), lagarto (1:8.000), cão (1:15.000) e gado (1:13.000). No último malote solicitamos a inclusão de soro de tatu (1:10.000).

#### 3.3.2. Ação da saliva do *T. vitticeps* sobre o nervo ciático de rato

Para verificar se a saliva de *T. vitticeps* atua promovendo perda de sensibilidade local e conseqüentemente, facilitando o repasto sanguíneo, realizamos este estudo em colaboração com o Dr. Marcos Horácio Pereira do Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

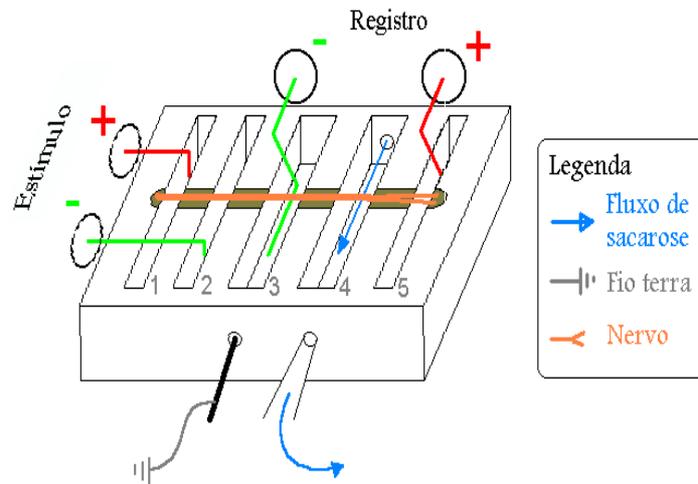
A saliva foi obtida individualmente por estimulação mecânica de insetos adultos (machos e fêmeas) e ninfas de quinto estágio, 15 dias após alimentação. A saliva liberada era coletada em tubo capilar de vidro e colocada em um microtubo formando um "pool" de saliva. A extração era realizada no dia anterior ao experimento e mantida a -20°C até o uso.

O nervo ciático direito e esquerdo de *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar,

machos, pesando entre 200 e 300g e sacrificados por deslocamento cervical, foram cuidadosamente removidos e dissecados. Estes foram mantidos em solução de Locke (composição: NaCl 154,0 mM, KCl 5,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM, HEPES 5,0 mM e Glicose 5,0 mM e pH 7,45 ajustado com NaOH) até a remoção da bainha conjuntiva. A dissecação da bainha conjuntiva do nervo foi realizada em microscópio estereoscópico (SZ-40, Olympus, Japão) e, após sua remoção o tronco nervoso foi cuidadosamente colocado sobre os cinco compartimentos da câmara de registros fisiológicos (Figura 7A). Uma fina camada de vaselina foi aplicada sobre as divisões entre os compartimentos da câmara a fim de assegurar o posicionamento do nervo, além de promover isolamento elétrico entre os compartimentos.

Os eletrodos dos compartimentos 1 e 2 (Figura 7A) servem para aplicar a estimulação elétrica no nervo, a uma frequência inferior a 0,1 Hz. Os eletrodos dos compartimentos 3 e 5 captam a resposta do nervo ao estímulo aplicado. Pelo compartimento 4 flui continuamente uma solução de sacarose isotônica (283 mM). A saliva bruta dos insetos, diluída em solução de Locke, foi adicionada ao terceiro compartimento (compartimento teste), que possui um volume reduzido (40 µL), e é isolado eletricamente do quinto compartimento (de registro) através do fluxo constante da solução de sacarose (~ 3 a 4 mL/min). Os demais compartimentos foram preenchidos com solução de Locke e possuem um volume de 200 µl cada.

A interferência da saliva sobre o impulso nervoso foi investigada através do registro do PAC (Potencial de Ação Composto) pelo método "single sucrose gap" Cruz et al. (1994).



**Figura 7A.** Esquema da câmara de registros eletrofisiológicos, projetada pelo Dr. Jader dos Santos Cruz (Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG).

### 3.3.3 Montagem do sistema “single sucrose gap”

Os experimentos utilizando o método “single sucrose gap” foram realizados de acordo com o método descrito por Cruz et al. (1994). A câmara de registros eletrofisiológicos foi ligada ao sistema de estimulação (Figura 7B) para a obtenção dos registros do PAC do nervo ciático isolado de rato. O PAC ou um potencial de ação simples (PAS) correspondem à resposta elétrica da(s) fibra(s) aos estímulos elétricos (pulsos) que são aplicados e que se propagam ao longo dessas fibras (Kutchai, 2000).

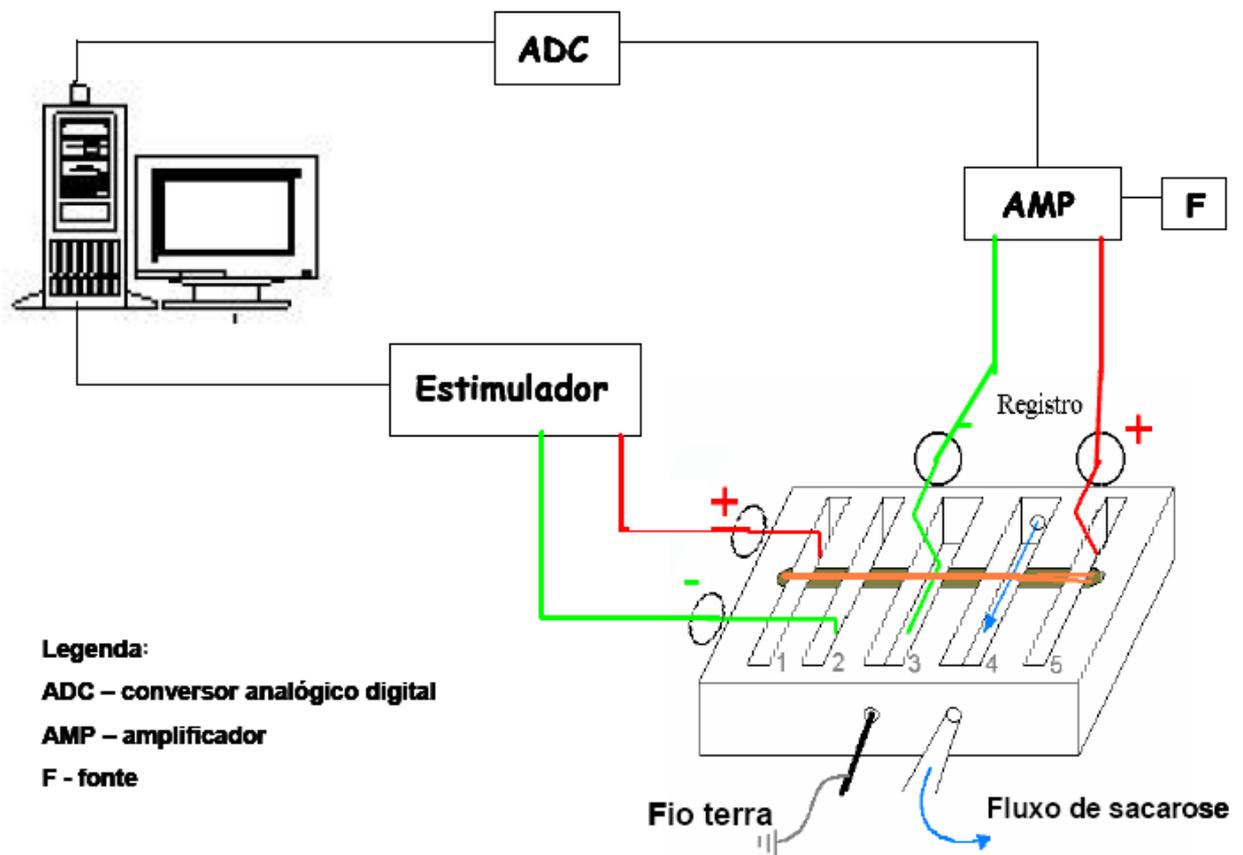


Figura 7B. Sistema de estimulação e de registro do método de "single sucrose-gap".

Os dois primeiros compartimentos da câmara foram utilizados para estimulação do nervo, com pulsos de voltagem isolados (geralmente entre 2 a 3 voltz) com duração de 60  $\mu$ s, gerados por um estimulador de pulsos. Os pulsos estimulam o nervo através de eletrodos de níquel-cromo nos compartimentos 1 e 2. A resposta elétrica do nervo (PAC) é captada pelos dois eletrodos de registro adaptados nos compartimentos 3 e 5. Esses eletrodos foram acoplados a um amplificador diferencial de ganho fixo, alimentado por uma fonte de  $\pm 12$  V. Assim, o PAC captado foi amplificado e registrado em um osciloscópio digital de 36 bits (ADC-100, PICO Technologies) acoplado a um computador. Os registros adquiridos foram gravados em CD para posterior análise. O principal parâmetro eletrofisiológico utilizado para análise foi a amplitude dada em mV e definida como a diferença de potencial entre a linha de base e a altura máxima da curva do PAC.

Para que os PACs pudessem ser registrados adequadamente foi necessário o isolamento elétrico, proporcionado pela passagem constante de um fluxo de sacarose pelo compartimento de isolamento, que fica entre os poços de captação do sinal.

Foi requerido um período de aproximadamente 50 minutos para que a preparação entrasse em equilíbrio e se mantivesse estável. Após esse período de estabilização, foram registrados os potenciais de ação controle (PACc), que se mantinham estáveis por mais de quatro horas.

### 3.3.4. Dinâmica de ingestão sanguínea

Foram selecionadas para este estudo ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps* com jejum aproximado de 12 dias após muda. Como fontes alimentares utilizamos pombos e camundongos *hairless* (HRS/J). Estes últimos foram obtidos no biotério do Departamento de Parasitologia-ICB/UFMG e anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de Ketamina 150 mg/KG (Cristalia /Brasil) e xilazina 10 mg/kg (Bayer/Brasil). Antes do início dos experimentos teve-se o cuidado de minimizar odores, luz, barulho, vibração e a manipulação excessiva dos insetos.

O processo alimentar foi analisado através de um sistema de monitoramento da atividade elétrica da bomba cibarial dos insetos, desenvolvido a partir da técnica de Smith (1979) e modificada por Guarneri et al. (2003). Este sistema consiste de um eletrodo de níquel-cromo conectado à fonte alimentar (pombo ou camundongo *hairless*) e outro conectado a uma malha de metal, que recobre internamente um pequeno frasco cilíndrico, no qual o inseto é mantido durante os experimentos. A extremidade do eletrodo que fica em contato com a pele do hospedeiro e a tela que serve de substrato para as patas do inseto foram recobertas com uma fina camada de gel eletrolítico (Regisgraf-Gel®) para facilitar a transmissão dos sinais elétricos produzidos pelos músculos da bomba cibarial. O sinal produzido pela atividade da bomba cibarial é amplificado 200 vezes e digitalizado por uma placa de aquisição de dados (ADC100®-Pico Technology Limited) conectada a um computador. Este sistema foi adaptado para receber as informações em computador compatível com IBM-AT, capaz de armazenar 60 minutos de aquisição de dados com simultânea visualização dos sinais produzidos.

Por meio desta metodologia foi possível registrar a alimentação das ninfas até o momento em que removiam suas peças bucais da pele do hospedeiro, sem que tentassem a sondagem novamente em 1 minuto. Os insetos foram pesados

antes e imediatamente após a alimentação para a determinação do ganho de peso (GP, mg).

A fase de ingurgitamento foi definida como o período de tempo iniciado após pelo menos 10 sinais consecutivos típicos atribuídos às contrações da bomba cibarial. O tempo total de contato (TTC, min) foi definido como o tempo em que as peças bucais permaneciam em contato com a pele do hospedeiro.

Durante o ingurgitamento, a bomba cibarial pode parar o seu funcionamento e depois retomá-lo, sem que o inseto retire suas peças bucais da pele, caracterizando, assim, uma interrupção.

A taxa de ingestão total (TIT, mg/min) foi calculada pela divisão do GP pelo TTC. A frequência de contrações da bomba cibarial (F; contrações/s) representa o número total de contrações dividido pelo tempo no qual a bomba está efetivamente em funcionamento (TCE), descontando-se o tempo relativo às sondagens e interrupções (Guarneri et al. 2000, Sant'Anna et al. 2001). Além desses parâmetros, no presente trabalho foi quantificado o número de interrupções maiores que três segundos.

Para a construção do gráfico de espectro dos sinais elétricos produzidos pela bomba cibarial, em função do tempo de alimentação, foi desenvolvido um *software* pelo professor Alberto de Figueiredo Gontijo (Coltec-UFMG) que funciona no ambiente Matlab versão 6.5.0.

Os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a distribuição normal de cada variável e então comparadas pelo teste t de Student. O nível de significância aceito foi de  $p < 0,05$ .

### 3.3.5. Dinâmica de alimentação e dejeção

Este estudo foi realizado com 25 ninfas de segundo estágio de *T. brasiliensis*, *T. infestans* e *T. vitticeps*, provenientes de colônias que são mantidas no insetário do LATEC/CPqRR, em condições semi-controladas de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa ( $60 \pm 10\%$ ).

Dez dias de jejum pós-muda, as ninfas foram colocadas para alimentar em camundongos anestesiados, dentro de uma placa de vidro transparente possibilitando a observação das mesmas. Em cada camundongo, era permitido que no máximo duas ninfas (de espécies diferentes) se alimentassem simultaneamente. A fim de evitar qualquer tipo de reação do hospedeiro em

resposta à saliva do vetor, e que eventualmente poderia ter influência sobre o processo de alimentação, cada camundongo era utilizado somente uma vez. Nenhum tipo de movimento na placa era permitido após o início dos experimentos, que foram realizados pelo mesmo observador.

Os insetos foram alimentados "ad libitum". Depois que deixavam a fonte alimentar, permaneciam sendo observados durante uma hora para contabilidade do número de dejeções realizadas por cada ninfa. Um cronômetro digital foi usado para medir o tempo exato das dejeções. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

*Tempo de contato efetivo*: tempo que os insetos permaneciam com a probóscide em contato com hospedeiro.

*Ganho de peso*: diferença entre o peso inicial e final.

*Taxa de ingestão total*: ganho de peso/tempo de contato efetivo.

*Índice de dejeção (ID)* estabelecido por Zeledón et al. (1977), onde:

$$ID = \frac{A \times B}{100}$$

A: porcentagem de insetos que defecaram durante os 10 primeiros minutos após alimentação.

B: número médio de dejeções emitidas pelos insetos durante os 10 primeiros minutos após alimentação.

Para eliminar a diferença de tamanho entre as ninfas das três espécies, utilizamos o índice de ingestão relativa (IIR) proposto por Crocco & Catalá (1996), onde:

$$IIR = \frac{\text{média do ganho de peso (mg)}}{\text{média do peso inicial (mg)}}$$

Todas as ninfas foram pesadas antes e imediatamente após o final dos experimentos em balança analítica (Sartorius - BP210S). Papéis filtro foram usados para absorver as fezes. Estes também eram pesados, na mesma balança, para cálculo final do ganho de peso.

Para analisar os dados ao longo dos 60 minutos de observação pós-repasto, o tempo foi dividido em intervalos de 10 minutos. Os testes de Tukey, Wilcoxon, Kruskal-Wallis e Qui-quadrado foram empregados, e as diferenças consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

### 3.4. Estudos de higropreferência

#### 3.4.1. Os insetos

Os exemplares de *T. vitticeps* usados para os experimentos de higropreferência originaram de uma colônia de procedência variada, mantida há várias gerações no insetário do LATEC. Estes insetos foram mantidos sob condições semi-controladas de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa ( $60 \pm 10\%$ ), e alimentados semanalmente em galinhas até a realização dos experimentos.

#### 3.4.2. Controle da umidade relativa

Segundo Winston & Bates (1960), Roca & Lazzari (1994) e Dambach & Goehlen (1999), ácidos ou soluções de sais inorgânicos são adequados para o controle da umidade relativa (UR), uma vez que a pressão de vapor permanece constante por longos períodos. Desta forma, diferentes soluções salinas saturadas e água destilada foram utilizadas para estabelecer a UR, às quais ovos e insetos foram expostos, sendo:  $\text{H}_2\text{O}$  destilada,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{KOH}$ . Ao término dos experimentos, a UR era medida usando um termohigrômetro (Testo 625, LenzKirch, Alemanha) com precisão de  $\pm 3\%$  UR.

#### 3.4.3. Efeito da UR na eclosão dos ovos

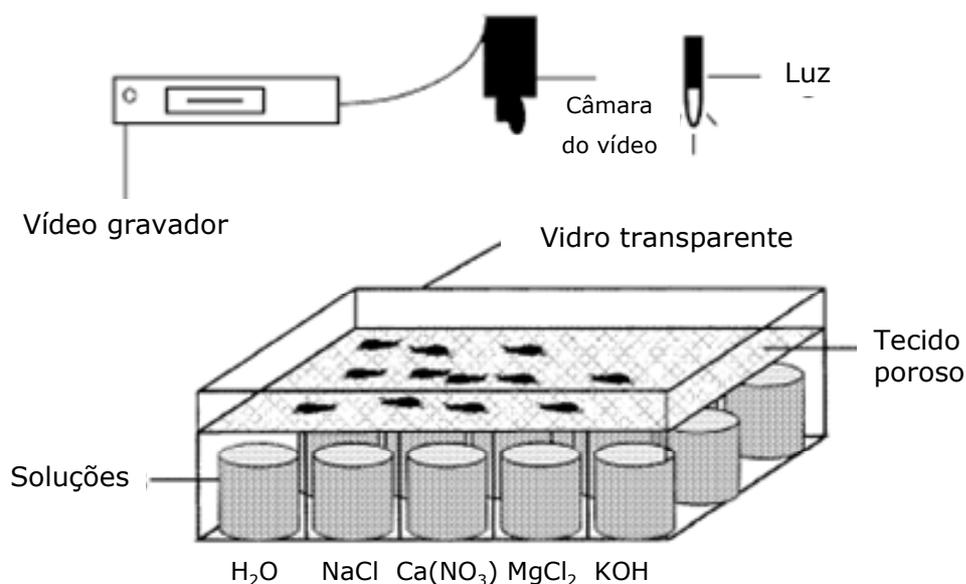
Ovos de *T. vitticeps* foram coletados num período de três dias e distribuídos aleatoriamente em cinco grupos que correspondiam aos diferentes níveis de umidade. Cada grupo foi colocado dentro de uma placa de Petri pequena, e esta dentro de outra placa de Petri (maior que a anterior), contendo as substâncias mencionadas anteriormente, de modo a proporcionar cinco umidades diferentes: 100%, 70%, 52%, 41% e 21%, respectivamente. Para impedir o contato das ninfas com o meio, uma malha de tecido fino foi colocada sobre a placa de Petri pequena. As placas foram fechadas de modo a não permitir a entrada ou saída do ar, e mantidas em uma estufa a  $27^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo controlado (12:12h). Durante a fase de luz, a estufa era iluminada por uma lâmpada

fluorescente de 7V. As ninfas eclodidas eram mantidas sob as mesmas condições por um período de dez dias. Dois ensaios foram conduzidos utilizando, respectivamente, 32 e 33 ovos por UR (N=325).

#### 3.4.4. Efeito do estado nutricional sobre a higropreferência das ninfas

Dois ensaios de 40 ninfas de 4<sup>o</sup> estágio foram alimentados em galinhas, 15 dias após a muda. No dia seguinte, foram transferidas para o centro de uma arena de vidro (24 x 13 x 5cm), cuja parte inferior era subdividida em cinco compartimentos e estava coberta por uma tela que servia de substrato para os insetos. Em cada compartimento foram colocados três frascos tipo Becker. Cada um continha 25ml de uma das soluções citadas anteriormente, proporcionando um gradiente de umidade ao longo da arena (91, 74, 52, 40, 20% - Figura 8).

O experimento foi realizado dentro de uma estufa, sob condições controladas de luz (fotoperíodo de 12:12h) e umidade (27° ± 2°C). Uma câmara filmadora instalada sob a arena permitia registros diários, inclusive no período de ausência de luz, sendo registrado um minuto a cada três horas. Analisamos o registro de cinco dias consecutivos, em quatro condições: recentemente alimentados, durante a muda (entre o 20 e 25 dias após o repasto), 15 dias após a muda e 30 dias após a muda.



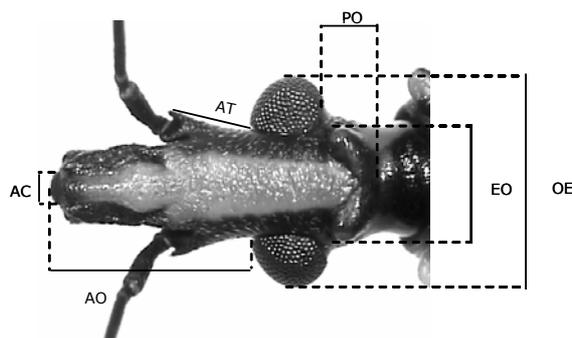
**Figura 8** – Desenho esquemático da arena experimental utilizada nos estudos de higropreferência do *T. vitticeps* (adaptado de Guarneri et al. 2002)

### 3.4.5. Análise estatística

Utilizamos o software MINITAB versão 14.1. Para os dados de eclosão foi realizado o teste de proporção com limite discriminante de  $P < 0,05$ . Para as análises do comportamento de higropreferência das ninfas, foi realizado o teste de Anderson-Darling e os dados não assumiram uma distribuição normal. Logo, em todas as análises foram empregados os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### 3.5. Morfometria

Para o estudo morfométrico foram utilizados 15 machos e 15 fêmeas de cada população. As medidas morfométricas da cabeça realizadas de acordo com Dujardin et al. (1998b), estão apresentadas na Figura 9.



**Figura 9** - Aspecto dorsal da cabeça de um adulto de *T. vitticeps*, mostrando as medidas morfométricas. AC, tamanho do antecíleo; At, tamanho do tubérculo antenífero; AO, distância ante-ocular; EO, distância extra-ocular; OE, distância extra-ocular e PO, distância pós ocular (sem pescoço).

Todas estas medidas foram realizadas utilizando o sistema computadorizado de análise de imagens KONTRON KS300 do LATEC/CPqRR. Os valores obtidos foram transformados em logaritmos naturais e submetidos a análises uni e multivariada. A análise univariada foi realizada pelo cálculo do perfil de Guillaumin (1972), que consiste na diferença para cada variável entre a média do grupo e a média total, dividida pelo seu desvio padrão, mostrando as relações de tamanho entre as variáveis medidas. Os valores foram submetidos à análise de variância pelo teste de Tukey através do programa Minitab release 13.20. Também foi realizada uma análise dos componentes principais comuns (ACPC). Este é um método de análise multivariada que examina as diferentes matrizes de

variância-covariância, fazendo uma combinação de todas as variáveis medidas, dando origem a novas variáveis ou fatores, onde o primeiro componente principal comum é aquele relacionado ao tamanho. A análise discriminante também foi feita, baseada nos componentes principais, exceto o primeiro, para obter os componentes de forma. Seus valores de significância são dados de acordo com Wilks (1932). Mapas fatoriais foram construídos para ilustrar as diferenças de tamanho e forma entre os sexos e populações. Os cálculos foram feitos utilizando os *softwares* JMP e NTSYS-pc (Rohlf, 1998).

### 3.6. Perfil eletroforético das isoenzimas

Os músculos alares de 12 insetos (6 machos e 6 fêmeas) de cada população foram extraídos através de um corte na região pronotal. O material extraído foi macerado em 100 $\mu$ l de estabilizador enzimático (ditiotreitól 2mM, ácido aminocapróico 2 mM e EDTA 2 mM) (Dujardin & Tibayrenc, 1985), centrifugado a 14800 rpm durante uma hora a 2°C, retirado o sobrenadante e criopreservado em nitrogênio líquido em forma de "pérolas". Este material, posteriormente, foi utilizado para a realização das eletroforeses.

Dez enzimas foram estudadas: malato desidrogenase (MDH E. C. 1.1.1.37), enzima málica (ME E. C. 1.1.1.40), glicose fosfato isomerase (GPI E. C. 5.3.1.9.), glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD E. C. 1.1.1.49), 6 fosfogliconato desidrogenase (6PGD E. C. 1.1.1.44), isocitrato desidrogenase (ICD E. C. 1.1.1.42),  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase ( $\alpha$ -GPD E. C. 1.1.1.8), peptidase 2 (PEP-2 E. C. 3.4.13), fosfoglicomutase (PGM E. C. 2.7.5.1), e alanina aminotransferase (ALAT E. C. 2.6.1.2). As corridas eletroforéticas foram processadas em gel de amido a 4°C segundo Romanha (1982) e Dujardin & Tibayrenc (1985), sendo os tampões de reação, soluções de revelação, voltagens e tempo de corrida específicos para cada enzima (Abderrazak et al. 1993) (Anexo 3).

### 3.7. Polimorfismos de DNA Amplificados Aleatoriamente (RAPD)

#### 3.7.1. Extração do DNA genômico

Para a realização dos estudos moleculares, de cada inseto adulto (10 machos e 10 fêmeas) foram retiradas as patas e estocadas em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para a extração de DNA, foi utilizada uma pata de cada inseto e kit comercial da Promega (Wizard Genomic DNA Purification System) seguindo protocolo de extração modificado por Borges et al. (2000). A estimativa da concentração e grau de pureza do DNA extraído foi feita pela leitura espectrofotométrica (GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech) a 260 e 280nm a partir de  $60\mu\text{l}$  da solução de DNA, sendo este descartado posteriormente.

#### 3.7.2. Iniciadores e ciclos de amplificação

Foram testados quatro iniciadores: 3302 (5' CTGATGCTAC 3'), 3303 (5' TCACGATGCA 3'), 3304 (5' GCACTGTCA 3') e 3307 (5' AGTGCTACGT 3'), sintetizados através do laboratório químico GIBCO BRL, sendo todos selecionados uma vez que mostraram perfis reprodutíveis e uma grande variabilidade de bandas.

A reação de RAPD foi realizada com os seguintes ciclos de amplificação (MJR Research PTC 100 thermocycler):

- 1). Desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos;
- 2). Três ciclos de anelamento a  $30^{\circ}\text{C}$  por dois minutos;
- 3). Três ciclos extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por um minuto;
- 4). Três ciclos desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos;
- 5). 34 ciclos de anelamento a  $40^{\circ}\text{C}$  por dois minutos;
- 6). 34 ciclos extensão a  $72^{\circ}\text{C}$  por um minuto;
- 7). 34 ciclos desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos;
- 8). Anelamento final  $40^{\circ}\text{C}$  por um minuto;
- 9). Extensão final  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos.

### 3.7.3. Procedimentos

As soluções estoques da reação de amplificação foram preparadas a partir do Kit "Taq DNA polymerase in Storage Buffer B" (Promega, Madison, WI) e dos 4dNTP (Promega, Madison, WI), aliquotadas em capela de fluxo laminar e congeladas a -20°C. As alíquotas foram descongeladas sob gelo minutos antes do preparo da reação. Após o descongelamento dos reagentes foi preparado o "mix" das reações, em capela de fluxo laminar. Foram distribuídos 8µL de "mix"- (1µL de tampão B: 20mM Tris-HCl (pH 8,0 a 25°C), 100mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1mM DDT, 50% glycerol, 0,5% Tween® 20 e 0,5% Nonidet®-P40); 0,6µL de dNTP; 1,0µL de MgCl<sub>2</sub>; 1,0µL de iniciador (1,25pmol); 0,2µL de Taq DNA Polimerase em Tampão B (Promega) e 4,2µL de água extra pura (Nuclease-free Water, Promega) - em cada microtubo, e a estes acrescentados 2µL de DNA.

A adoção de controles negativos contendo todos os componentes da reação, com exceção do DNA, foram utilizados a fim de monitorar as reações em todos os géis.

### 3.7.4. Visualização dos produtos amplificados por RAPD-PCR

Os produtos de amplificação foram visualizados em mini-géis (Bio Rad) de poliacrilamida a 8%, corados por nitrato de prata a 2%. Para as análises interpopulacionais, foram selecionados aleatoriamente sete indivíduos de cada população para compor o gel de 45 canaletas, sendo o DNA de um exemplar de *R. neglectus* incluído como grupo externo em todos os experimentos.

Em cada canaleta do gel foram aplicados 3µL (mini-gel) e 6µL (45 canaletas) da reação amplificada acrescida de igual volume de tampão de amostra.

O tampão de corrida foi o TBE (1X) e o tempo de corrida foi de aproximadamente cinco minutos a 50 volts (15mA/gel) e uma hora e trinta minutos a 120 volts (iniciadores 3302, 3303 e 3304). Para o iniciador 3307 este tempo foi de aproximadamente 2 horas. Como padrão de tamanho de bandas, foi utilizado o φX174RF DNA/*Hae III* fragments (Gibco).

Terminada a eletroforese e o processo de coloração, o gel foi documentado através de uma câmera digital (Sony, MVC-FD92).

### 3.7.5. Análises estatísticas dos marcadores de RAPD

As análises dos dados de RAPD foram realizadas sob os seguintes critérios: (1) os alelos RAPD segregam em proporções Mendelianas, (2) as bandas de mesmo tamanho são homólogas, (3) os diferentes loci segregam independentemente, e (4) as populações analisadas se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Apostol et al. 1996). Assim, o perfil obtido pela RAPD-PCR foi utilizado para a construção de matrizes binárias com base na presença ou ausência de bandas.

Essas matrizes foram utilizadas para calcular as frequências alélicas (Apostol et al. 1996), permitindo o cálculo dos seguintes parâmetros de diversidade genética: número efetivo de alelos ( $n_e$ ), número de locus polimórficos ( $S$ ), proporção de locus polimórficos ( $k$ ), e heterozigosidade média ( $H$ ). Todos estes parâmetros foram calculados através do programa PopGene, versão 1.32.

A diferenciação genética entre as populações, foi avaliada através do índice de endocruzamento  $G_{st}$ , que é considerado como uma extensão do  $F_{st}$  de Wright para os casos de alelos múltiplos, uma vez que se trata de uma média ponderada de todos os alelos existentes (Takahata & Nei 1984). A distância genética ( $D$ ) também foi usada para avaliar a diferenciação genética entre as populações (Nei, 1978). Todos estes parâmetros também foram calculados com base no programa PopGene, versão 1.32.

Com os valores das distâncias genéticas, foi possível construir um dendograma UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic average) através do programa Mega v. 2.1 (Kumar et al. 2004) para visualizar as relações entre as amostras estudadas. As matrizes binárias também foram utilizadas para obtenção do coeficiente de similaridade de Dice (1945) e construção de um dendograma UPGMA pelo programa NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1998).

### 3.8. Obtenção dos dados de ocorrência do *T. vitticeps* em ambiente doméstico e peridoméstico

Para determinação do potencial de colonização do ambiente artificial pelo vetor, foram examinados os dados de capturas domiciliares e peridomiciliares do PCDCh em Minas Gerais pela FUNASA. As informações coletadas referem-se aos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995, de todos os municípios agrupados por regiões

de saúde, correspondentes à época aos oito distritos sanitários da FUNASA: Caratinga, Diamantina, Januária, Montes Claros, Pirapora, Teófilo Otoni, Uberaba e Varginha. Somente quando o município era positivo para *T. vitticeps* as informações eram registradas, sendo também contabilizadas a principal espécie vetora (*T. infestans*), as espécies autóctones mais freqüentes (*T. sordida* e *P. megistus*) e as demais espécies incluídas na categoria "outras" (*R. neglectus*, *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto 1923, *Triatoma maculata* Erichson 1848, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus geniculatus* Latraille 1811, *Panstrongylus diasi* Pinto & Lent 1946), a fim de comparar a taxa de captura entre elas.

Dados de infecção e captura de adultos e ninfas de *T. vitticeps* no intra e peridomicílios também foram analisados.

### 3.9. Análise de distribuição espacial

#### 3.9.1. Dados ambientais

Utilizamos a base de dados bioclimáticos (<http://www.worldclim.org/bioclim.htm>) disponíveis no site Worldclim versão 1.4 (<http://www.worldclim.org>), cuja metodologia foi descrita por Hijmans et al. (2005). Estes autores desenvolveram um sistema de análises a partir da interpolação de dados obtidos de uma grande variedade de fontes de informação, correspondentes a produtos mensais que compreende o período de 1950 a 2000, e resolução espacial de 1x1 km.

Foram extraídos os valores referentes às variáveis ambientais de temperatura (11 variáveis), precipitação (8 variáveis) e altitude, localizados sobre os três distritos onde o *T. vitticeps* foi capturado (301 pixels) e sobre áreas compatíveis de ausência (100 pixels) desse vetor, escolhidas aleatoriamente. As variáveis analisadas foram:

BIO1: temperatura média anual

BIO2: variação média diária

BIO3: isothermalidade (variação diária/variação anual da temperatura)

BIO4: temperatura sazonal

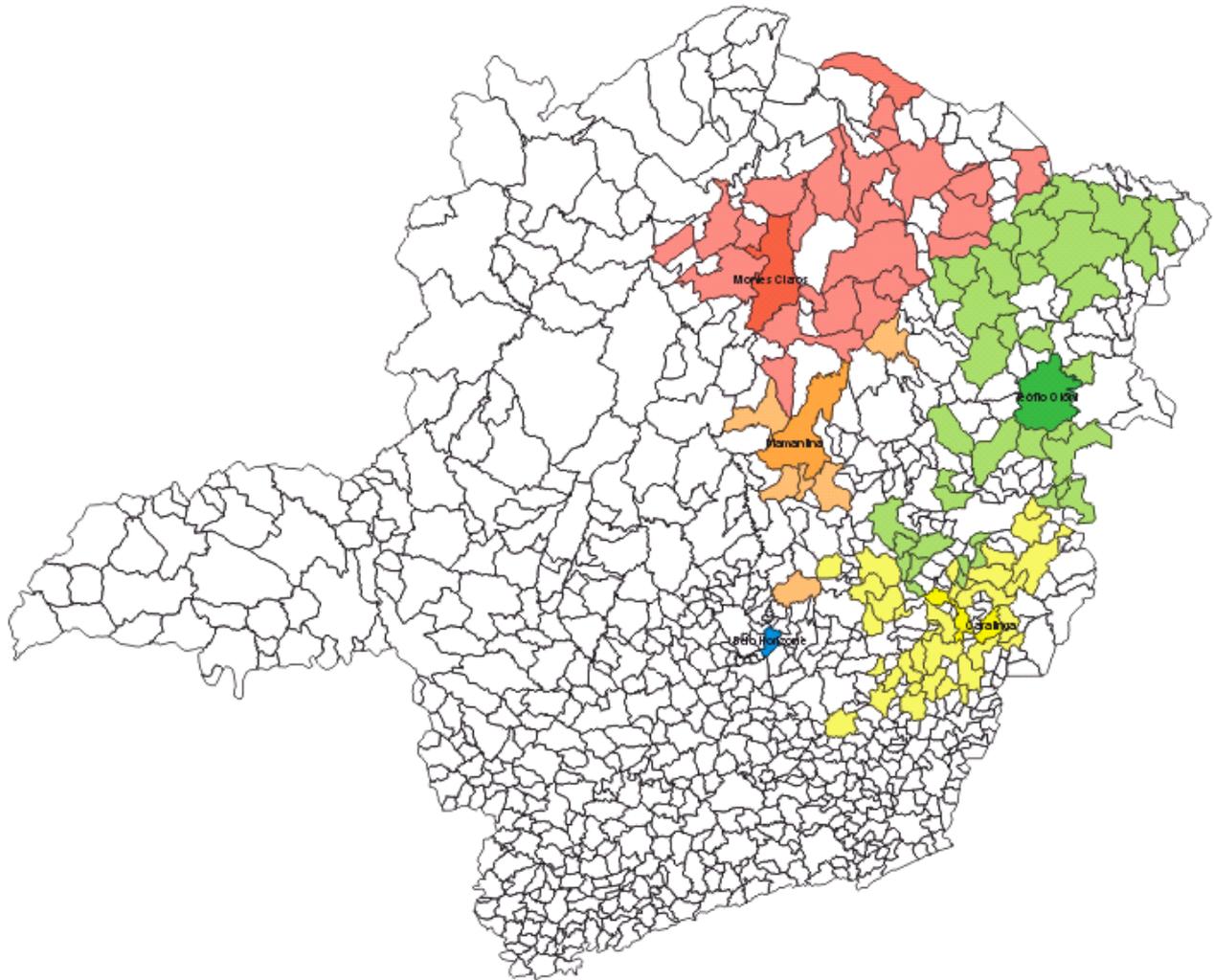
BIO5: temperatura máxima do mês mais quente

BIO6: temperatura mínima do mês mais frio

BIO7: variação anual de temperatura  
BIO8: temperatura média do trimestre mais úmido  
BIO9: temperatura média do trimestre mais seco  
BIO10: temperatura média do trimestre mais quente  
BIO11: temperatura média do trimestre mais frio  
BIO12: precipitação anual  
BIO13: precipitação do mês mais úmido  
BIO14: precipitação do mês mais seco  
BIO15: coeficiente de variação da precipitação sazonal  
BIO16: precipitação do trimestre mais úmido  
BIO17: precipitação do trimestre mais seco  
BIO18: precipitação do trimestre mais quente  
BIO19: precipitação do trimestre mais frio  
ALT: Altitude

### 3.9.2. Dados entomológicos

Foi considerada área de presença, o conjunto de municípios com captura positiva para *T. vitticeps* obtidos pela FUNASA. O arquivo vetorial do estado de Minas Gerais com seus municípios foi obtido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)), onde foi incorporado na base de dados georeferenciados, junto com as variáveis ambientais (Figura 10). Os municípios nos quais houve registro de captura de *T. vitticeps*, estavam localizados em três distritos sanitários: Caratinga, Teófilo Otoni e Montes Claros/Diamantina. Os dois últimos distritos regionais foram agrupado porque, em ambos, o índice de captura foi muito baixo. Para compor a matriz de ausência (locais onde não houve registro de *T. vitticeps*), foram selecionados aleatoriamente alguns municípios ao oeste Minas Gerais. A partir dos valores das variáveis ambientais para locais de presença e ausência, realizamos uma análise discriminante por passos, a fim de identificar o conjunto de variáveis descritas acima que melhor descreviam as características ambientais similares aos sítios de presença e ausência dessa espécie. Esta análise foi processada pelo programa Statistica.



**Figura 10.** Mapa de Minas Gerais assinalando os municípios onde o *T. vitticeps* foi capturado nos trabalhos de rotina do PCDCh/FUNASA, nos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995. Em vermelho, laranja, verde e amarelo, municípios dos distritos de Montes Claros, Diamantina, Teófilo Otoni e Caratinga, respectivamente.

### 3.10. Amostras de *Trypanosoma cruzi*

#### 3.10.1 Nos hospedeiros invertebrados

Trinta e seis triatomíneos capturados nos ambientes artificiais (intra e peridomicílio) e silvestre (captura em armadilha luminosa) foram submetidos à pesquisa de flagelados, individualmente, por meio de exame a fresco das fezes, obtidas por compressão abdominal ou dissecação. O exame do conteúdo intestinal foi realizado em microscópio óptico (CARL ZEISS- JENA), utilizando-se a ocular de 10x com objetiva de 16 ou 40x, examinando no mínimo 100 campos.

Os insetos adultos foram mantidos no insetário até que a postura de ovos atingisse um número suficiente para garantir a colônia. Posteriormente, os insetos positivos para tripanosomatídeos foram mortos e o conteúdo intestinal era retirado para isolamento das cepas. Esse isolamento era feito através de xenocultura (Bronfen et al. 1989). Os insetos foram desinfetados em solução de White (0,25g de HgCl<sub>2</sub>, 6,5g de NaCl, 1,25mL de HCL concentrado, 250mL de etanol a 95% e 750mL de H<sub>2</sub>O) durante 1 hora, dissecados em capela de fluxo laminar e o conteúdo intestinal colocado em meio LIT (Liver Infusion Tryptose; Camargo, 1964). Os parasitos isolados foram mantidos em passagens sucessivas em meio LIT a 28°C para multiplicação e obtenção de aproximadamente 10<sup>9</sup> parasitas/ml de cultura. As cepas foram criopreservadas em nitrogênio líquido, tendo como agente crioprotetor glicerol a 10%.

Para comprovar as diferenças entre as taxas de infecção dos insetos provenientes dos ambientes artificiais e silvestre, utilizou-se o teste de Qui-quadrado, com correção pelo método de *Yates*, e limite discriminante de  $p < 0,05$ . A correção foi necessária uma vez que há classes de dados com valores inferiores a 5.

### 3.10.2. Nos hospedeiros vertebrados

O município de Itanhomi é considerado como área endêmica para a peste bubônica. Desta forma, os agentes de saúde local realizam capturas de roedores como parte da rotina de trabalho. Em 2002, uma amostra de 266 papéis filtro impregnados com sangue de roedores capturados em 24 localidades (Barro Branco, José Tavico, Antonio Gonçalves, Joven Calixto, Vivaldo, Titino Lage, Júlio Carlos, Barra do Guido, Liés Alves, Antonio Marciano, Córrego do Guido, Adão Daniel, João Caboclo, João Porciano, Cabeceira do Guido, M Leite, Valico, Messias Nogueira, Luiz Antônio dos Reis, José Lopes, Valentino Vieira, Agenor Fernandes, José Dutra, Manuel Simão) nos foi cedida pela Secretaria Municipal de Saúde. O material permaneceu armazenado a -20°C até o processamento e realização de uma multiplex PCR (item 3.11.2) para determinar o índice de infecção destes roedores pelo *T. cruzi*, e conseqüentemente, estabelecer o papel epidemiológico destes roedores no ciclo de transmissão da doença de Chagas.

Em paralelo, com o objetivo de obter amostras de *T. cruzi* isoladas de hospedeiros vertebrados silvestres, dez armadilhas (“tipo maleta”) foram

distribuídas na localidade Cabeceira do Guido em diferentes pontos no ambiente silvestre, principalmente em buracos e fendas de rochas. As armadilhas eram colocadas no meio da tarde e retiradas na manhã do dia seguinte pelos agentes de saúde.

Os roedores capturados ao longo de cinco noites receberam um código de identificação, seguindo a numeração usada pelos agentes de saúde local (Programa de Controle da Peste), e foram anestesiados com Thiopental para realização do xenodiagnóstico. Doze potes com 10 ninfas de terceiro estágio de *T. vitticeps*, criadas em laboratório (não infectadas), foram utilizados para este experimento. Para garantir a alimentação de todas as ninfas, aumentando as chances de uma possível infecção, foram oferecidos quatro repastos distintos. Todas as ninfas foram examinadas por compressão abdominal e exame a fresco das fezes em microscópio óptico utilizando-se a ocular de 10x com objetiva de 16 ou 40x e percorrendo no mínimo 100 campos.

### **3.11. Diagnóstico e caracterização molecular do *Trypanosoma cruzi***

#### **3.11.1. Amostras**

Foram estudadas as amostras provenientes do isolamento das cepas (item 3.10.1.) e também do conteúdo do trato digestório de 65 insetos que chegaram mortos ao laboratório, e, portanto, com o conteúdo intestinal seco. Estes foram dissecados e o conteúdo intestinal diluído em 1mL de salina, antes da absorção pelo papel filtro. Depois de secos, os papéis eram envolvidos em papel alumínio e armazenados individualmente a -20°C onde permaneceram por quatro anos.

A extração do DNA foi realizada pelo método de lise das amostras em papel de filtro (Machado et al. 2000). Para tal, os papéis foram milimetricamente picados dentro de microtubos individuais. Em cada tubo foi acrescentado 100µl de água deionizada, a amostra aquecida a 70°C por 10 minutos e centrifugada por três minutos a 17.900g. O sobrenadante contendo o DNA foi estocado a 4°C e utilizado para PCR.

### 3.11.2. PCR Multiplex

A fim de diagnosticar e, sobretudo caracterizar o *T. cruzi* presente nas amostras de sangue de roedores, e principalmente dos exemplares de *T. vitticeps* de campo (mortos e inviáveis ao exame tradicional), utilizamos uma PCR multiplex recentemente desenvolvida por Liarte (2006). A grande vantagem dessa técnica é que ela dispensa o isolamento das cepas, é rápida e de baixo custo. De acordo com Liarte (2006), os iniciadores Diaz 7, Diaz 8 e TcSat 4 classificaram corretamente todas as amostras do parasito testadas, se mostrando específica para *T. cruzi* e portanto, não amplificando o DNA dos hospedeiros (vertebrados e invertebrados) nem de outros tripanosomatídeos (*Trypanosoma rangeli*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*).

As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler®. Cada reação continha tampão de reação (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl; pH 8.4), 1,9 mM de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs (200 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos - Promega, Madison, WI, USA), 5 pmoles de cada iniciador; 0,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1 µL do DNA de *T. cruzi*, extraído na etapa anterior. Após a PCR, 3 µL do produto foi submetido à análise em gel de poli-acrilamida 6% e corado em nitrato de prata 0,2% revelando a presença de bandas específicas.

Este estudo foi desenvolvido em colaboração com a Dra. Silvane Maria Fonseca Murta do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular / CPqRR.

### 3.11.3. Infecção experimental em camundongos

Uma amostra caracterizada pela PCR multiplex como TcI (Tv 35) e outra como TcII (N1), ambas isoladas de triatomíneos provenientes do peridomicílio, foram descongeladas e incubadas a 28°C em meio McNeal, Novy e Nicolle (NNN) com 4mL de LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Chiari & Camargo, 1984). A contagem dos parasitas para a infecção foi realizada em câmara de Neubauer.

Cinco camundongos da linhagem Swiss-Webster, machos, com quatro semanas e peso entre 14 e 16g, foram utilizados para cada cepa inoculada. O inóculo foi de 10<sup>5</sup> parasitas por camundongo, via intraperitoneal. Durante um mês a cada três dias, foram realizados exames em todos os camundongos até a

observação de parasitas no sangue circulante. Para o exame, foi realizado um pequeno corte na extremidade final da cauda e 5 $\mu$ L de sangue eram coletados e observados em microscópio óptico. Para manutenção das cepas nos camundongos, o sangue era obtido por punção do plexo orbital. Como agente anticoagulante foi utilizado citrato de sódio. As inoculações eram feitas com seringas descartáveis de 1 mL.

Para a cepa do grupo TcI, os exames foram sempre negativos. Assim, foi realizado outro inoculo ( $2 \times 10^5$  parasitas por camundongo) com a mesma cepa e posteriormente mais quatro inóculos com uma outra cepa (Tv 06), também isolada do peridomicílio e caracterizada como TcI. Os inóculos com a cepa Tv 06 iniciaram com  $2 \times 10^5$  até alcançarem  $6 \times 10^5$ , respectivamente, parasitas por camundongo. Ainda assim, todos os camundongos se mantiveram negativos ao exame.

Uma última tentativa de infecção para a cepa TcI foi realizada em 10 camundongos machos da linhagem C57BL/6, "knockout" para interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Estes animais foram inoculados com  $10^5$  tripomastigotas metacíclicos obtidos diretamente das fezes de cinco ninfas de quinto estágio de *T. vitticeps*, infectadas a partir de uma alimentação artificial com formas de cultura da cepa Tv06.

Estes camundongos foram cedidos pelo Dr. Ricardo T. Gazzinelli, que mantém esta colônia no Centro de Pesquisa René Rachou (CPqRR). Os procedimentos de infecção e exames foram realizados no Biotério de Experimentação do CPqRR, seguindo todas as normas e procedimentos de Biossegurança.

#### 3.11.4. Hemocultura e citometria de fluxo

O sangue de um camundongo "knockout" (IFN- $\gamma$ ) com tripomastigotas sanguíneos foi utilizado para infecção de camundongos Swiss-Webster, com inóculo intraperitoneal de  $6 \times 10^5$  parasitos. A parasitemia permaneceu subpatente durante 30 dias de exame, realizados a cada três dias. Estes animais foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do CPqRR (BIOTEX). Nove meses após infecção, aproximadamente 1000 $\mu$ L de sangue foram coletados por punção cardíaca em quatro camundongos (anestesiados com Thiopental 5% - 0,02 mL/g). Parte desse sangue (500 $\mu$ L) foi utilizado para hemocultura, sendo

colocado em tubos com 4mL de meio LIT, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantido a 28°C. As hemoculturas foram examinadas a partir do décimo dia, a fim de detectar a presença de formas evolutivas do *T. cruzi*. Quando não se observava nenhuma forma evolutiva, estas eram novamente avaliadas em intervalos de 10 dias. O restante do sangue coletado (500µL) foi utilizado para obtenção de soro, para avaliação sorológica através da citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma técnica de análise celular automatizada que permite caracterizar aspectos morfológicos e bioquímicos de células individuais suspensas em meio líquido, através da análise das propriedades do raio laser que incide sobre estas células. A caracterização morfológica da célula inclui a determinação do seu tamanho e de sua granulosidade. A caracterização bioquímica inclui a identificação de moléculas presentes na superfície celular bem como a identificação da ligação de moléculas a receptores de superfície celular, através da utilização de reveladores fluorescentes. Uma abordagem proposta por Martins-Filho et al. (1995), permite a detecção da ligação de anticorpos líticos, presente em soros de pacientes chagásicos, à formas tripomastigotas vivas do *T. cruzi*. Essa mesma abordagem foi utilizada por Araújo et al. (2000) para avaliar a eficácia do tratamento em camundongos infectados utilizando diferentes fármacos. Neste trabalho, utilizamos esta metodologia como ferramenta para determinar se os camundongos haviam sido infectados, através da presença de anticorpos líticos.

Para a obtenção do soro de camundongos normais (controle) e dos camundongos supostamente infectados, aproximadamente 500µL de sangue foi deixado a temperatura ambiente durante 45 minutos e depois centrifugado a 1000g a 4°C. O soro foi então coletado, alíquotado e estocado a -20° até o uso. Alíquotas do soro foram diluídas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, nas razões 1:3000 e 1:6000, centrifugadas a 10.000g, 4°C por três minutos. Após centrifugação, alíquotas de 100µL de cada soro diluído foram transferidas para tubos de poliestireno contendo 100µL de uma suspensão de tripomastigotas vivos da cepa CL ( $5 \times 10^6$ /mL) obtidos de cultura celular seguindo a metodologia de Araújo et al. (2000). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida a suspensão de parasitas foi lavada com 2ml de PBS (10% SFB) e submetida à centrifugação a 1000g, 4°C por 10 minutos. Os tripomastigotas foram reincubados nas mesmas condições anteriores, na presença de 100µL de anticorpo monoclonal de cabra anti-IgG de camundongo (anti molécula total) conjugado com fluoresceína (Sigma

immunochemical reagents), diluído 1:200 em PBS (10% SFB). Novamente os parasitos foram lavados com 2ml de PBS (10% SFB), centrifugados 1000g, 4°C por 10 minutos e fixados em 300µl de solução fixadora (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,65g/l de cloreto de sódio, pH 7,2). Foi realizado um controle da reação que permitia monitorar a ligação inespecífica do conjugado. Os tubos foram mantidos a 4°C por aproximadamente 16 horas e depois submetidos à leitura no citômetro de fluxo (FACScan-Becton Dickinson), interligado a um computador. Para cada amostra foram adquiridas informações referentes a 10.000 tripomastigotas. Os resultados para cada amostra de soro testada foram expressos sob a forma de percentual de parasitos fluorescentes (PPFP), em relação ao controle interno da reação. Os resultados de PPFP superiores a 20% foram considerados positivos.

Esta metodologia foi realizada pelo Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo, em colaboração com o Laboratório Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração/CPqRR.

## **IV – RESULTADOS**

---

#### 4.1. Pesquisa de infestação das unidades domiciliares

A pesquisa abrangeu 280 domicílios e 212 peridomicílios com 381 anexos peridomiciliares no período de 3 a 14 de junho de 2002. Nesta ocasião, o número de UD's infestadas foi igual a 16, sendo 11 intradomicílios (3,9%) e sete peridomicílios (3,3%) com sete anexos (1,8%) positivos para o *T. vitticeps*, que foi a única espécie capturada. Em seis das 11 localidades trabalhadas, foram capturados apenas exemplares adultos de *T. vitticeps* no intradomicílio (Tabela 1). No peridomicílio, foram pesquisados paióis (165), galinheiros (75), chiqueiros (62), currais (43), privada (17), engenhos (3), porões (3), cabanas (3), varanda (1), garagem (1), moinho (1), picadeira (1), forno (1), madeiras (1), telhas (1), cozinha (1) e outros (2). Os três porões pesquisados e quatro paióis estavam infestados (Tabela 1), sendo encontradas colônias (presença de estádios imaturos) em todos os porões e um paiol. A população seguiu fazendo as notificações, sendo computados os dados obtidos até o mês de dezembro de 2002. Incluindo as notificações, o número de localidades positivas para o *T. vitticeps* subiu de seis para oito, e de UD's para 30, permanecendo negativas somente as localidades Liés Alves, João Caboclo e José Horton. No total, o número de insetos capturados variou no intradomicílio de um a sete e no peridomicílio de uma a cinco ninfas, tendo sido encontrados em um paiol 21 ovos já eclodidos.

Os resultados apresentados a seguir se referem à caracterização das localidades infestadas pelo *T. vitticeps*, incluindo as notificações. Todos os tetos das casas pesquisadas eram cobertos por telhas de barro. O material de construção das residências variou entre alvenaria com reboco (199), alvenaria sem reboco (28) e apenas uma casa era de madeira, sendo que 23 (92%) das 25 casas infestadas eram de alvenaria com reboco. A maioria dos insetos capturados no intradomicílio (80%) estava nas salas. Os outros 20% foram localizados nos quartos. Inversamente, para os insetos notificados, 77% foram capturados nos quartos.

O censo de animais presentes no peridomicílio no momento da captura revelou uma população de 4.853 indivíduos. As galinhas correspondiam a 65,9%, bovinos a 16,4%, porcos a 6,9%, gatos a 4,2% e os cães a 3,9%. A soma dos demais (cavalos e outros) corresponde a 2,6%. A média desses animais por UD foi de 14,1 galinhas; 3,5 bovinos; 1,5 porcos; 0,9 gatos e 0,8 cães.

As casas encontravam-se a uma distância média de  $126 \pm 211,8\text{m}$  do

ambiente silvestre, representado por uma cadeia de montanhas e vegetação representativa de Mata Atlântica. Os principais ecótopos mencionados no ambiente silvestre são "morros, serras e pedreiras" (de acordo com a descrição dos agentes de saúde), além das plantações e cultivo de diferentes frutas. A distância entre a casa e os anexos peridomiciliares variou de zero a 100m. O zero corresponde aos três porões infestados e três paióis, representando 2,5%. As demais distâncias variaram de 1 a 5m (50,3%); 6 a 10m (29,9%); 11 a 20m (13,2%); 21 a 49m (3,2%) e 1,06% a uma distância máxima de até 100m das UD.

**Tabela 1** – Localidades onde foram realizadas as capturas (busca ativa) e notificações de *T. vitticeps*, no intradomicílio e peridomicílio (pa=paiol e po=porão) do município de Itanhomi, no ano de 2002.

Localidade	N° de casas trabalhadas	N° intradomicílio positivo		Anexos	
		pesquisa de infestação	notificação	pesquisados	infestados
Adão Daniel	26	2	1	49	2 (pa)
Cabeceira do Guido	16	3	1	16	2 (po)
Francisco Inácio	11	0	2	9	0
Jesus Julião	26	1	2	31	0
José Noberto	25	1	0	42	0
Júlio Carlos	24	1	2	43	0
Orides I	30	0	2	27	0
Valico	70	3	4	83	1(po) 2(pa)
<b>Total</b>	<b>228</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>300</b>	<b>7</b>

#### 4.2. Estudo da fonte alimentar

Foram analisados 89 insetos. Destes, 43 foram positivos para uma fonte alimentar (48,3%), 20 para duas fontes (22,5%) e cinco (5,6%) para três fontes diferentes. A associação mais freqüente, considerando-se todas as amostras, foi sangue de ave com sangue de roedor (7,9%). Agrupando os insetos que se alimentaram de uma única fonte, com os que se alimentaram de duas ou mais, o sangue de roedor prevaleceu totalizando 36 amostras (30%), seguido do sangue de aves (25%), encontrado em 30 amostras processadas. Além disso, 21 insetos não reagiram para nenhum dos anti-soros testados (Tabela 2).

A origem do sangue ingerido e a porcentagem de reações positivas para seus respectivos anti-soros estão representadas na Tabela 3. A identificação dos

repastos mostra os roedores como principal fonte alimentar nos três ambientes pesquisados. As aves aparecem em seguida no intra e peridomicílios. No ambiente silvestre, há participação dos tatus, como fonte alimentar desse vetor. Entretanto, esse anti-soro só foi usado na terceira bateria de exames, onde foram incluídos os exemplares silvestres, podendo ser um resultado falso negativo para os outros dois ambientes. O sangue humano aparece somente no intradomicílio com 9% das reações.

**Tabela 2** – Fontes alimentares identificadas pela reação de precipitina em *T. vitticeps*, capturados e notificados, no município de Itanhomi, Minas Gerais.

<b>Número de fontes alimentares</b>	<b>Hospedeiros</b>	<b>Total (%)</b>
01	Roedor	17 (19,1)
	Ave	15 (16,8)
	Gado	01 (1,1)
	Gambá	06 (6,7)
	Cão	02 (2,2)
	Humano	01 (1,1)
	Tatu	01 (1,1)
02	Ave/humano	01 (1,1)
	Ave/roedor	07 (7,9)
	Ave/cão	03 (3,4)
	Cão/humano	02 (2,2)
	Cão/roedor	01 (1,1)
	Gambá/roedor	01 (1,1)
	Humano/roedor	03 (3,4)
	Lagarto/roedor	01 (1,1)
	Roedor/tatu	01 (1,1)
03	Ave/gambá/roedor	01 (1,1)
	Ave/cão/roedor	03 (3,4)
	Cão/humano/roedor	01 (1,1)
Não reagiram		21 (23,6)
<b>Total de insetos</b>		<b>89 (100)</b>

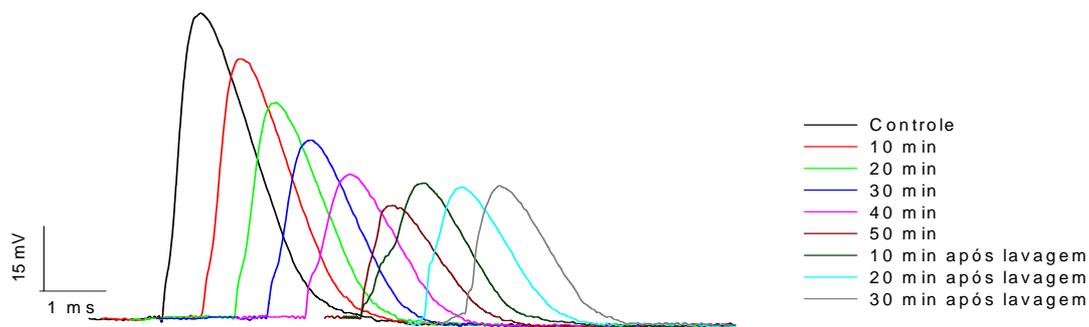
**Tabela 3** - Origem e porcentagem das fontes alimentares em relação aos locais de captura de *T. vitticeps* capturados no município de Itanhomi, Minas Gerais.

Hospedeiro	Ambiente			Total (%)
	Intra (%)	Peri (%)	Silvestre (%)	
Roedor	26 (29,2)	7 (31)	3 (37)	36 (30)
Ave	25 (28)	5 (23)	—	30 (25)
Gambá	4 (4,5)	3 (14)	1 (13)	8 (6,7)
Humano	08 (9)	—	—	8 (6,7)
Lagarto	1 (1,1)	—	—	1 (0,8)
Cão	10 (11,2)	2 (9)	—	12 (10)
Gado	—	1 (5)	—	1 (0,8)
*Tatu	—	—	2 (25)	2 (1,7)
Não reagiram	15 (17)	4 (18)	2 (25)	21 (17,6)

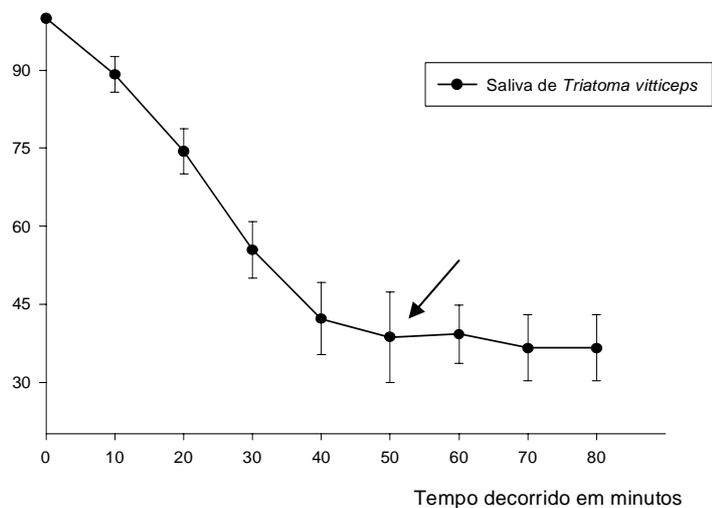
\* Anti-soro testado somente na terceira bateria de exames

### 4.3. Ação da saliva do *T. vitticeps* sobre o nervo ciático de rato

A adição de 1 $\mu$ L de saliva de *T. vitticeps* (diluída em 39 $\mu$ L de solução de Locke) na preparação de nervo isolado de rato causou uma redução progressiva da amplitude, sem apresentar alterações na fase de repolarização ou duração do PAC, quando comparada ao registro do PAC controle (PACc). A figura 11 ilustra uma das quatro réplicas deste experimento. Essa inibição progressiva não apresentou recuperação mesmo 30 minutos após a substituição da solução contendo saliva por solução controle (solução de Locke). A redução média observada foi de 66,1%  $\pm$  6,3 (n=4) (Figura 12).



**Figura 11** – Efeito de 1µL de saliva bruta de *T. vitticeps* sobre o Potencial de Ação composto (PAC) de nervo isolado de rato. Cada curva corresponde a um PAC, registrado a cada 10 minutos.



**Figura 12** – Porcentagem de redução da atividade de 1µL de saliva de *T. vitticeps* sobre o Potencial de Ação Composto (PAC) (média ± EP). A seta indica o momento da lavagem.

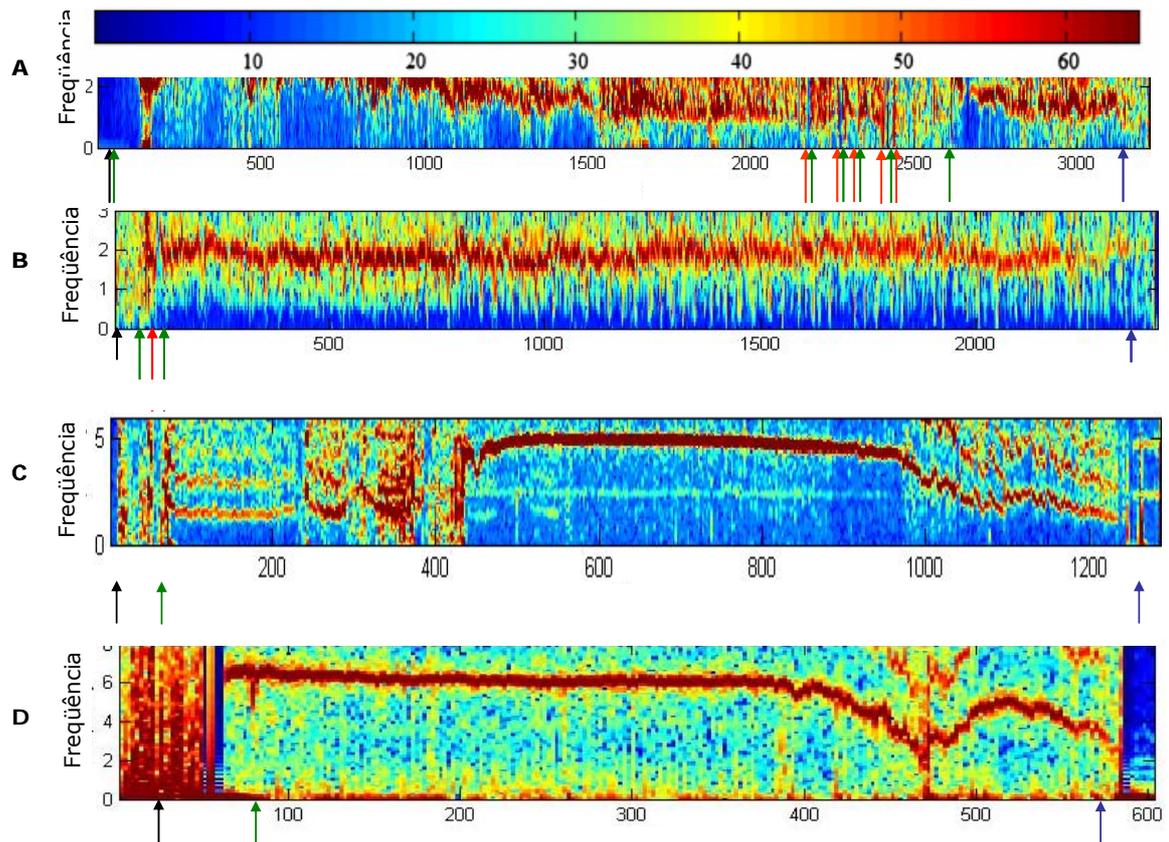
#### 4.4. Dinâmica de ingestão sanguínea: monitoramento da bomba cibarial

O processo alimentar de ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps* analisado pelo eletromiograma da bomba cibarial está mostrado na Tabela 4. As ninfas de *T. vitticeps* que se alimentaram em camundongos apresentaram um taxa de ingestão média de sangue menor que a observada em pombos devida principalmente a uma menor frequência de contração da bomba cibarial. O ganho de peso dos insetos foi semelhante nos dois hospedeiros, já o tempo de contato e o número de interrupções tenderam a ser maiores em camundongos. (Tabela 4).

A maior dificuldade de obtenção de sangue em camundongos também ficou evidente na análise do espectro de frequência de sinais elétricos produzidos pela bomba cibarial durante o processo de hematofagia. Espectros ruidosos (frequência mal definida) são decorrentes de contrações arrítmicas e de perfis elétricos irregulares da bomba cibarial (Figura 12 A e B). Já nos experimentos em que a bomba cibarial apresentou um padrão de contração rítmico e perfis elétricos mais regulares o espectro é mais limpo (Figura 12 C e D). De maneira geral, os espectros obtidos nos experimentos com camundongos foram mais ruidosos do que com pombos (Anexo 4).

**Tabela 4** – Parâmetros do processo alimentar de ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps* (com aproximadamente 12 dias de jejum pós-muda) em camundongos e em pombos obtidos a partir do eletromiograma da bomba cibarial. TTC: tempo total de contato; TIT: taxa de ingestão total; GP: ganho de peso; F: frequência das contrações da bomba cibarial.

Parâmetros	camundongo	pombo	Teste t
TTC (min)	26,8 ± 13,09	19,75 ± 11,54	n.s.
TIT (mg/min)	2,01 ± 0,83	2,82 ± 1,39	p<0,05
GP (mg)	46,44 ± 12,77	41,53 ± 9,08	n.s.
F (contrações/seg)	2,71 ± 0,67	4,2 ± 1,3	P<0,05
Nº de Interrupções	1,43 ± 1,79	0,5 ± 0,8	n.s.



**Figura 13** – Espectro de frequência de sinais elétricos produzidos pela bomba cibarial durante o processo alimentar de ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps*. Exemplos de espectro ruidoso (A) alimentação em camundongo e (B) em pombo. Exemplo de espectros menos ruidosos (C) Alimentação em camundongo e (D) em pombo. A escala de cores que representa a magnitude da ocorrência de cada valor de frequência esta representada no topo da figura. As setas abaixo de cada figura representam o momento da picada (preta), o início da fase de ingurgitamento ou reinício após uma interrupção (verde), interrupção do ingurgitamento (vermelho) e final do repasto (azul).

#### 4.5. Dinâmica de alimentação e dejeção

Na Tabela 5 estão representados os resultados referentes à dinâmica alimentar do *T. vitticeps* em comparação ao *T. infestans* e *T. brasiliensis*. A média do tempo de contato efetivo do *T. infestans* com o hospedeiro foi significativamente menor que as outras duas espécies. Por outro lado, a média observada para o ganho de peso do *T. vitticeps* foi significativamente maior que *T. infestans* e *T. brasiliensis*, ocasionando 84% de muda. Logo, o IIR do *T. vitticeps* também foi maior, com uma taxa de ingestão total correspondente a 1,9 mg/seg, intermediária às demais.

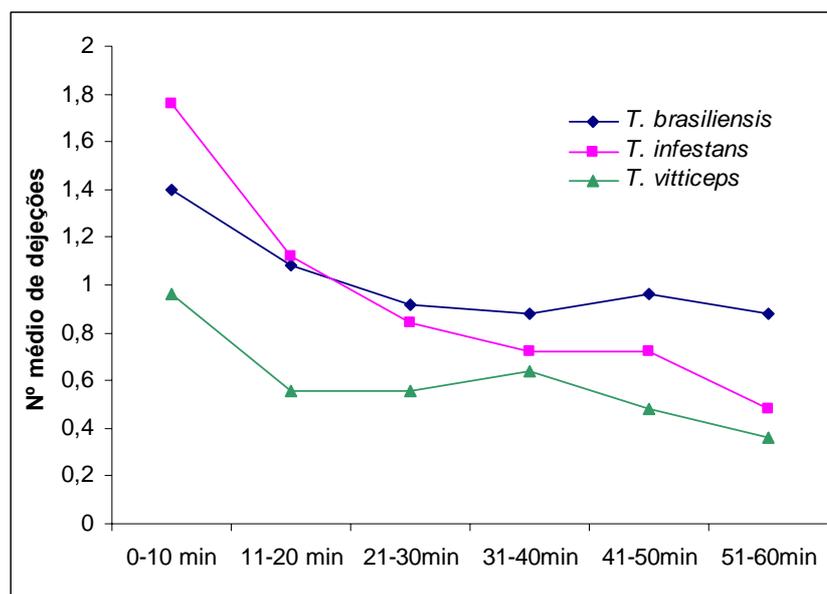
Nenhum triatomíneo defecou durante o repasto. Nos primeiros 10 minutos de observação pós-repasto, o número de dejeções realizadas pelo *T. infestans* foi significativamente maior em relação ao *T. vitticeps* (Tabela 6). Entretanto, a proporção de triatomíneos que realizaram pelo menos uma dejeção nos primeiros 10 minutos de observação não apresenta diferença mesmo quando os resultados foram comparados dois a dois. Durante os 60 minutos de observação, o número total de dejeções realizadas foram 89, 141 e 153 para *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*, respectivamente. Quando o número médio de dejeções das três espécies é comparado ao longo do tempo, também há diferença significativa do *T. vitticeps* em relação as demais (Figura 14). Após uma hora de observação, somente dois exemplares de *T. vitticeps* e um de *T. infestans* e *T. brasiliensis* não haviam defecado.

**Tabela 5** – Padrão do comportamento alimentar para ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*. Os valores em negrito mostram resultados onde  $p < 0,05$ . IIR= Índice de Ingestão Relativa.

Espécies	Média de peso inicial	Tempo de contato efetivo (min) M±DP	Ganho de peso (mg) M±DP	IIR	Taxa de ingestão total (mg/min) M±DP	Muda (%)
<i>T. vitticeps</i>	5,2	23±12,9	<b>33,6±7,6</b>	6,5	1,9±0,95	21 (84)
<i>T. infestans</i>	3,8	<b>10,6±7,3</b>	18±8,5	4,7	<b>2,1±0,91</b>	<b>10 (40)</b>
<i>T. brasiliensis</i>	3,6	13,5±3,5	17,4±3,9	4,8	<b>1,3±0,4</b>	19 (76)

**Tabela 6** – Padrão do comportamento de dejeção para ninfas de *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* pós-repasto sanguíneo. Os valores em negrito mostram resultados onde  $p < 0,05$ . ID= Índice de dejeção.

Espécies	Nº total de dejeções (60 min)	Nº dejeções nos 10 primeiros min	% de pelo menos uma dejeção em 10 min	M±DP de dejeções por inseto nos primeiros 10 min	Média de dejeções por inseto nos 60 min	ID
<i>T. vitticeps</i>	89	<b>24</b>	72	<b>0,96±0,7</b>	<b>3,6</b>	0,7
<i>T. infestans</i>	141	<b>44</b>	92	<b>1,76±0,9</b>	5,6	1,6
<i>T. brasiliensis</i>	153	35	84	1,4±0,9	6,1	1,2



**Figura 14** – Comparação do número médio de dejeções ao longo do tempo entre *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis* ( $p < 0,05$ ).

## 4.6. Estudos de higropreferência

### 4.6.1. Efeito da umidade relativa (UR) na eclosão dos ovos

A eclosão dos ovos de *T. vitticeps* variou de 3,1 a 95,4% entre os cinco níveis de umidade relativa (Figura 15). Estes resultados demonstram que a UR interfere dramaticamente na taxa de eclosão, com um ponto de corte entre as umidades de 52 e 41% ( $p < 0,05$ ). Em contrapartida, não houve diferença entre os setores com umidade superior a 52%, com um pico de eclosão dos ovos a 100% de UR ( $H_2O$ ).

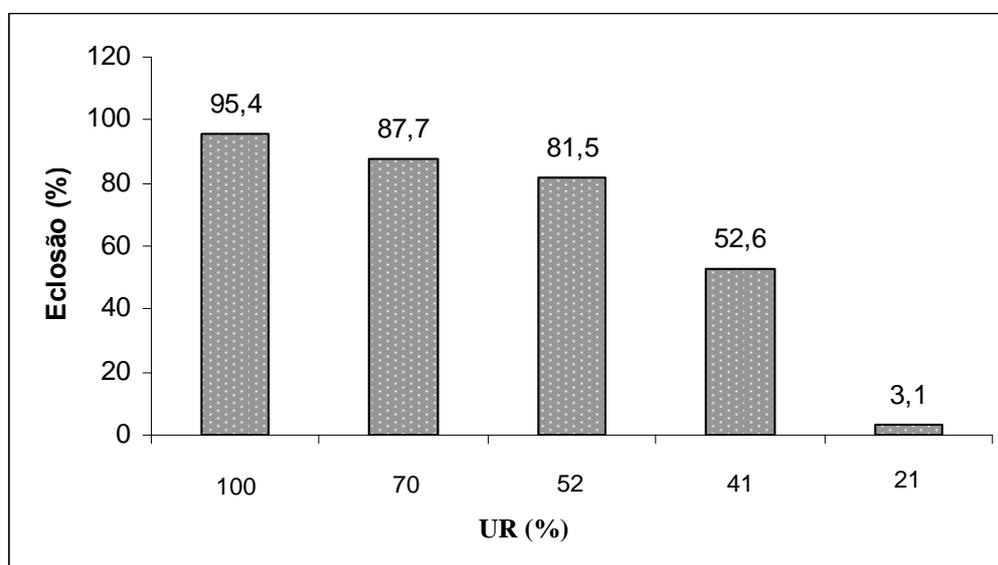


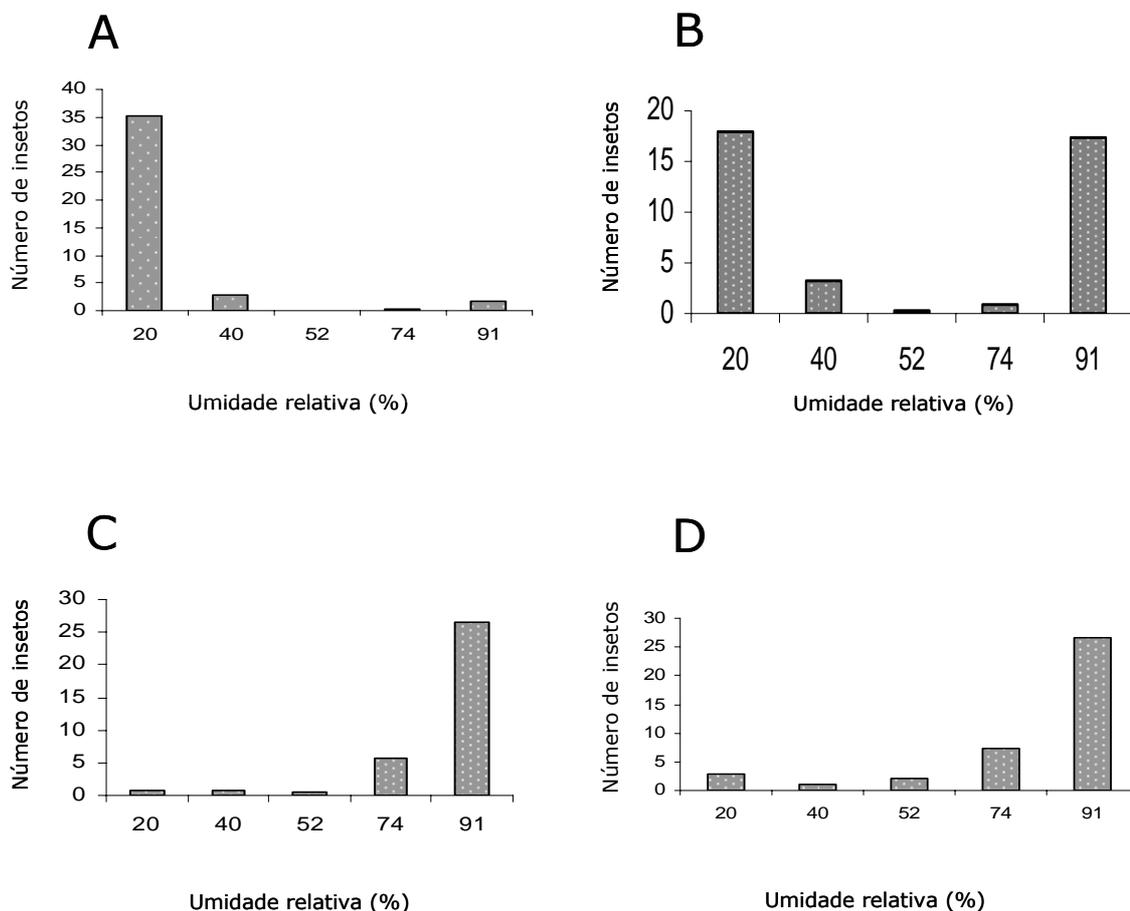
Figura 15 – Influência da umidade relativa (UR) no sucesso de eclosão dos ovos de *T. vitticeps*.

### 4.6.2. Higropreferência das ninfas de *T. vitticeps*: efeito do estado nutricional

As análises estatísticas mostraram não haver diferenças entre os dois ensaios realizados independentemente ( $p < 0,05$ ). Os dados mostrados a seguir referem-se ao primeiro experimento.

As ninfas de quarto estágio de *T. vitticeps* tendem a permanecer no setor mais seco da arena durante os primeiros cinco dias após alimentação (Figura 16 A,  $p < 0,05$ ). Durante a ecdise, há um grande número de insetos distribuídos igualmente entre o setor mais seco e mais úmido (Figura 16 B,  $p < 0,05$ ). Já no

primeiro período de jejum, equivalente a 15 dias após a muda, os insetos escolhem o setor mais úmido do gradiente permanecendo igualmente distribuídos com o jejum prolongado para 30 dias (Figuras 18 C e D respectivamente,  $p < 0,05$ ).



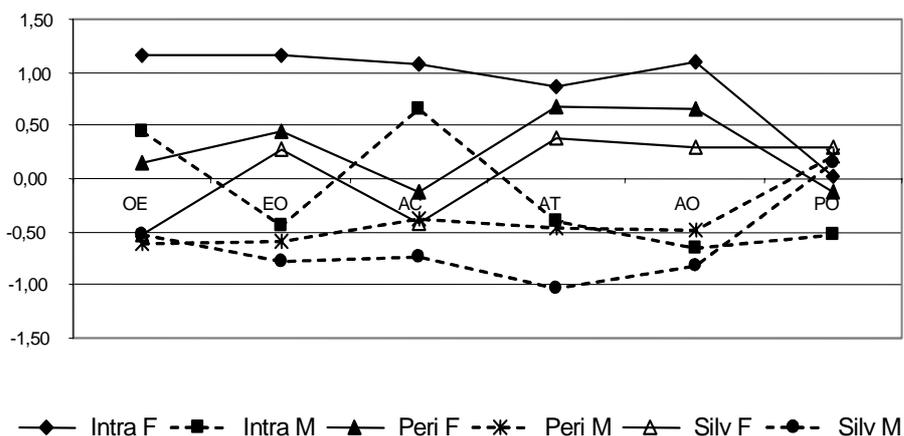
**Figura 16** – Higropreferência de ninfas de quarto estágio de *T. vitticeps* em função do estado nutricional: (A) recentemente alimentadas, (B) durante a ecdise, (C) 15 dias após a muda, (D) 30 dias após a muda.

## 4.7. Variabilidade genética

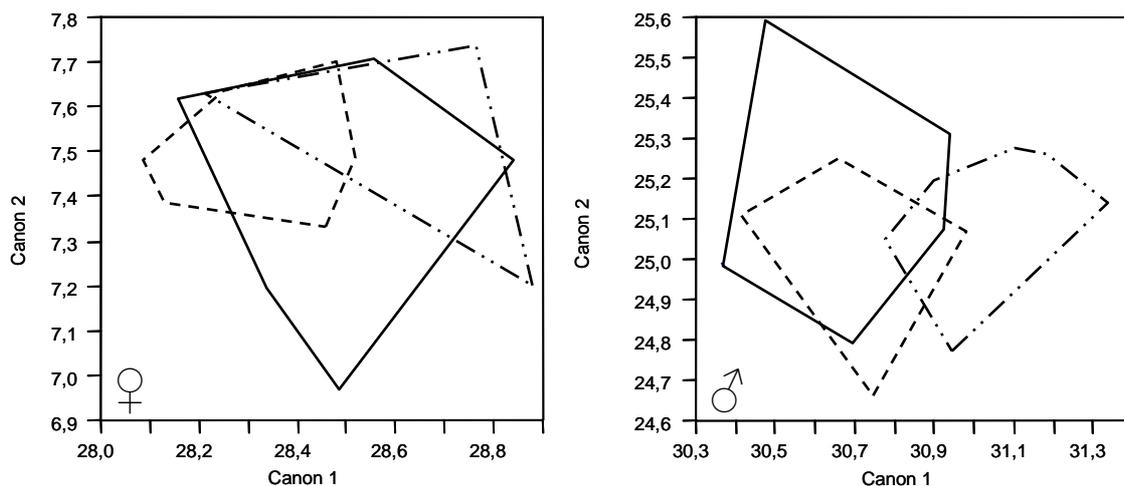
### 4.7.1. Morfometria

O perfil de Guillaumin demonstrou de forma clara ( $p < 0,05$ ) a presença de dimorfismo sexual nas três amostras de *T. vitticeps* estudadas (Figura 17). As fêmeas do intradomicílio foram maiores que as demais, e os machos silvestres os menores. Na análise dos Componentes Principais Comuns, o primeiro

componente principal (que corresponde a análise de tamanho) contribuiu com 67,5% para os machos e 71,3% para as fêmeas e nenhuma diferença estatística foi apontada pelo teste de Tukey-Kramer ( $P > 0,05$ ). O mapa fatorial construído a partir dos componentes canônicos para as populações de *T. vitticeps* (Figura 18), também não discrimina os insetos pelo ambiente de origem (Wilks' Lambda  $P > 0,05$ ).



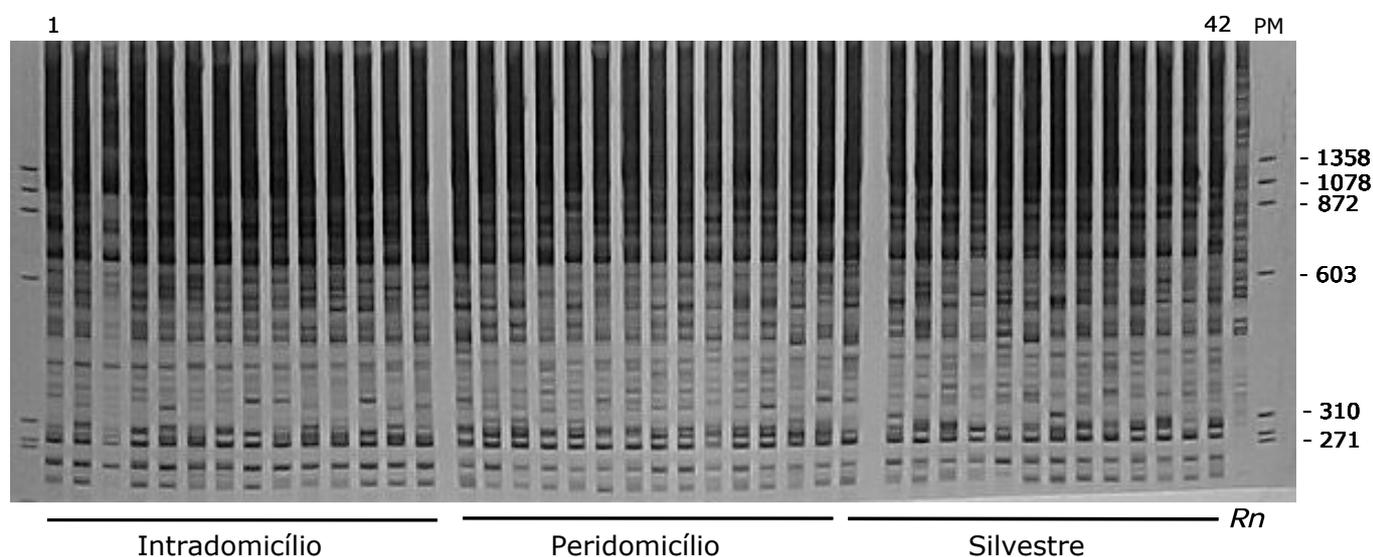
**Figura 17.** Perfil de Guillaumin para *T. vitticeps*, machos (M) e fêmeas (F), utilizando as variáveis: OE - distância extra-ocular; EO - distância extra-ocelar ; AC - tamanho do anticlípeo; AT - tamanho do tubérculo antenífero; AO - distância ante-ocular; PO - distância pos-ocular.



**Figura 18.** Mapa fatorial mostrando a relação entre as populações de *T. vitticeps* para a análise discriminante de forma. Os polígonos incluem todos os indivíduos de cada população sendo: --- Intradomicílio, — Peridomicílio, - - - Silvestre.

#### 4.7.2. Polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente (RAPD)

Os "primers" selecionados para este estudo geraram 42 loci de RAPD para as populações de *T. vitticeps* estudadas, dos quais 12 foram obtidos pelo "primer" 3302, 11 pelo 3303 e 3304 e 8 pelo "primer" 3307 (Figura 19). Dos 42 loci analisados, 22 foram polimórficos ( $k = 52,38\%$ ). A variabilidade observada foi muito baixa, sendo o peridomicílio o ambiente onde se encontrou o maior número de loci polimórficos ( $S = 19 / k = 45,24\%$ ), enquanto no intradomicílio foi observado o menor número ( $S = 15 / k = 37,71\%$ ). O número efetivo de alelos ( $N_e$ ), bem como a heterozigosidade ( $H$ ) apresentaram valores baixos para todas as populações estudadas (Tabela 7). Os valores do índice de endocruzamento ( $G_{st}$ ) e distância genética foram muito baixos variando de 0,073-0,099 e 0,02-0,04, respectivamente.

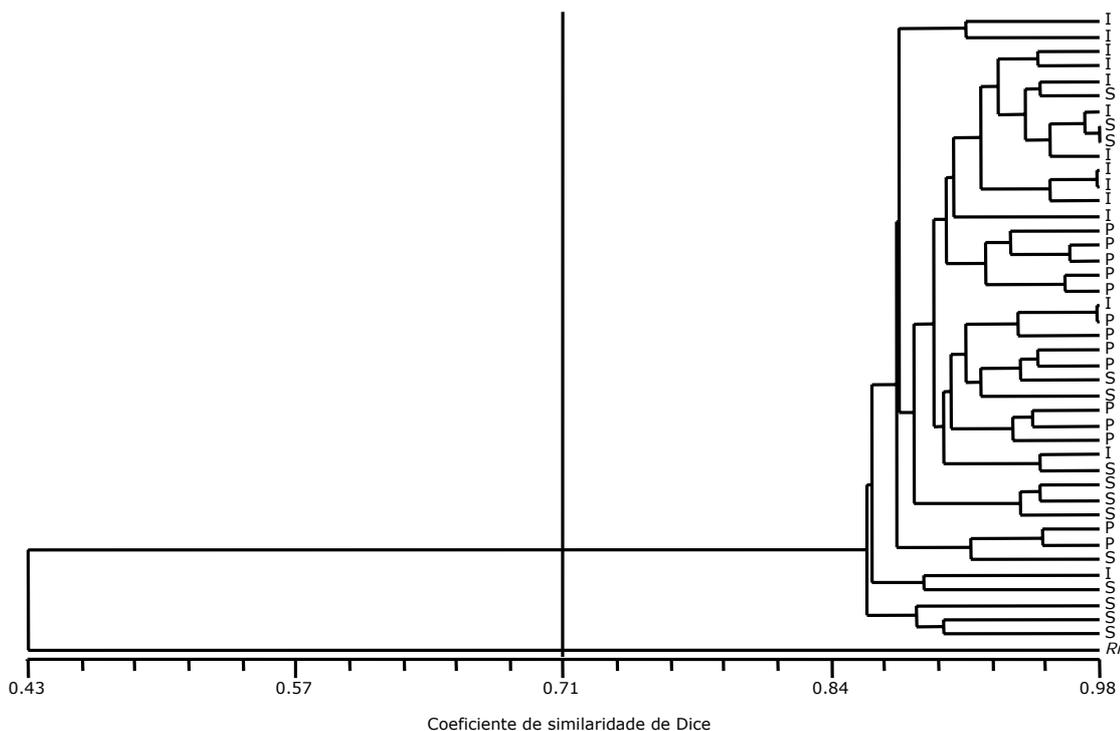


**Figura 19.** Perfis de RAPD das populações de *T. vitticeps* usando o "primer" 3303. PM: Padrão de peso molecular; Canaletas 1-7: fêmeas intra; 8-14: machos intra; 15-21: fêmeas peri; 22-28 machos peri; 29-35: fêmeas silvestre; 36-42: machos silvestre; *Rn*: *R. neglectus*. Os números acima do gel representam as canaletas.

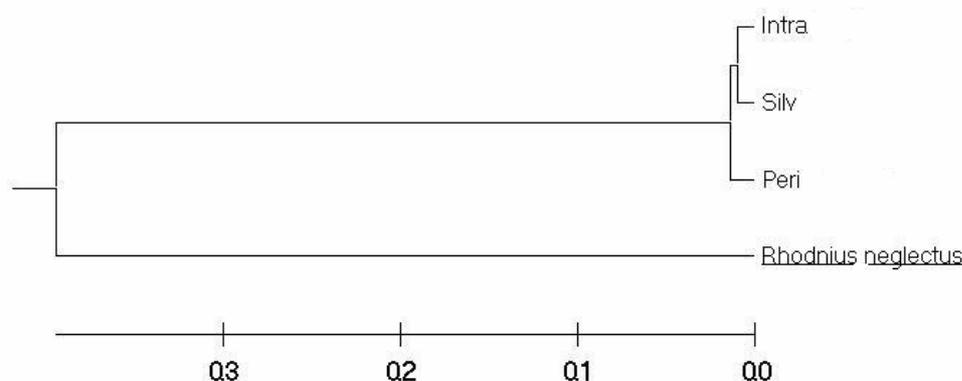
**Tabela 7.** Estrutura genética das amostras analisadas, comparadas "pairwise" e separadas de acordo com o ambiente de origem.  $N_e$ : número efetivo de alelos;  $H$ : heterozigosidade;  $G_{st}$ : índice de endocruzamento;  $N_m$ : número efetivo de migrantes por geração;  $D$ : distância genética.

Amostras	$N_e$	$H$	$G_{st}$	$N_m$	$D$
Intra/Peri	1,27	0,15	0,099	4,56	0,04
Intra/Silv	1,23	0,14	0,073	6,37	0,04
Peri/Silv	1,22	0,13	0,093	4,9	0,02

O dendograma obtido pelo Coeficiente de Similaridade de Dice (Figura 20) mostra um único grupo formado por todos os exemplares de *T. vitticeps*, independente do ambiente de origem e sexo (todos os exemplares muito abaixo da linha de Fenon), além do grupo de referência formado pelo *R. neglectus* (outgroup). Aproximadamente 87% de similaridade pode ser visto entre as amostras, e não há evidências de separação destas em populações, sendo confirmado pelos baixos valores de distância genética (Figura 21).



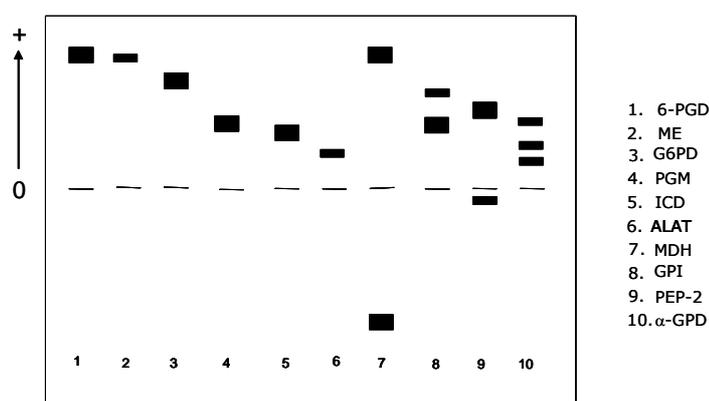
**Figura 20.** Dendograma construído a partir do Coeficiente de Similaridade de Dice obtido a partir dos perfis eletroforéticos de RAPD para as três amostras de *T. vitticeps* estudadas, utilizando os iniciadores 3302, 3303, 3304 e 3307. A barra vertical corresponde à linha de Fenon. Os códigos à direita indicam o ambiente de origem de cada indivíduo: I intradomicílio; P, peridomicílio; S, silvestre.



**Figura 21.** Dendrograma construído a partir da distância genética obtido dos perfis eletroforéticos de RAPD para as três amostras de *T. vitticeps*, utilizando-se os iniciadores 3302, 3303, 3304 e 3307.

#### 4.7.3. Perfil isoenzimático

Nenhum polimorfismo na mobilidade eletroforética das isoenzimas de *T. vitticeps* foi encontrado. As enzimas 6PGD, ME, G6PD, PGM, ICD, e ALAT apresentaram uma banda; MDH, GPI e PEP-2 duas bandas e  $\alpha$ -GPD três bandas (Figura. 22).



**Figura 22.** Esquema do perfil eletroforético das isoenzimas observados nos indivíduos das três amostras de *T. vitticeps* (intra, peri e silvestre). Para identificação das enzimas ver materiais e métodos.

#### 4.8. Obtenção dos dados de ocorrência do *T. vitticeps* em ambiente doméstico e peridoméstico do Estado de Minas Gerais

Na Tabela 8 é apresentado o número de triatomíneos capturados pelo PCDCCh em Minas Gerais no período analisado. Em 1979, à exceção de Caratinga, *T. vitticeps* não foi capturado nos demais distritos sanitários, e conseqüentemente as outras espécies não foram contabilizadas. Considerando o total de triatomíneos (31.097), *T. sordida* foi a espécie mais capturada (80,5%), concentrando-se em Montes Claros 88,2% dos insetos pertencentes a esta espécie. *P. megistus* e *T. vitticeps* representaram 7,1% e 6,7% do total de triatomíneos capturados, respectivamente. *T. infestans*, espécie de maior importância na transmissão humana do *T. cruzi*, esteve presente principalmente no Distrito de Montes Claros (3,4%), e muito secundariamente no Distrito de Teófilo Otoni (0,1%), como resíduo de infestação anterior mais importante, como demonstram os próprios dados da FUNASA aqui não incluídos por não estarem de acordo com o critério aqui utilizado (restringir-se aos dados de captura de triatomíneos apenas quando *T. vitticeps* fosse encontrado). As demais espécies

representaram 2,9% dos triatomíneos. A ocorrência de *T. vitticeps* chama a atenção nos distritos de Caratinga, onde representa a espécie mais capturada (52%), e de Teófilo Otoni, onde representa 26,3% dos triatomíneos. Somados em ambos os distritos, o total de *T. vitticeps* capturados (1.455) representa 70,1% sobre o total da espécie (2.076 exemplares).

Na Tabela 9 são mostrados os dados de captura realizados nos quatro distritos, por espécie e nos diferentes anos analisados. A partir de 1985, quando o PCDCh atingiu o máximo de atividade (Dias, 2002), observa-se que o *T. vitticeps*, juntamente com o *T. sordida*, foram as espécies que menor impacto sofreram diante das ações de controle, apresentando em 1995 a menor redução em comparação com as demais. Também neste período se observa a eliminação do *T. infestans*.

O número de *T. vitticeps* reportados no intradomicílio foi maior que no peridomicílio nos Distritos de Diamantina, Montes Claros (na década de 80) e principalmente em Caratinga (Figura 23). No Distrito de Teófilo Otoni e na década de 90 em Montes Claros, a captura peridomiciliar deste triatomíneo foi mais freqüente. A taxa de infecção dos triatomíneos capturados no intradomicílio mostrou-se maior que no peridomicílio (Figura 23). Observa-se predominância de adultos em relação às ninfas, exceto para o Distrito de Teófilo Otoni em 1995 (Figura 24). Quanto à infecção, novamente os adultos se sobressaíram, à exceção também de Teófilo Otoni em 1995, e de Montes Claros, neste mesmo ano.

**Tabela 8** – Resultado das atividades de captura de triatomíneos nos municípios incluídos nos distritos sanitários de Montes Claros, Caratinga, Teófilo Otoni e Diamantina, Minas Gerais, nos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995 pelo Programa de Controle da Doença de Chagas da Fundação Nacional de Saúde: número de triatomíneos e percentual correspondente ao total de capturas no período.

Distrito	Espécie	1979 (%)	1985 (%)	1990 (%)	1995 (%)	Total (%)
Montes Claros	<i>T. infestans</i>		820 (9,3)	53 (0,5)	0	873 (3,4)
	<i>T. sordida</i>		6.488 (73,6)	9.571 (94,3)	6.317 (98,4)	22.376 (88,2)
	<i>T. vitticeps</i>		376 (4,5)	203 (2,0)	11 (0,2)	590 (2,3)
	<i>P. megistus</i>		773 (8,8)	66 (0,6)	0	839 (3,3)
	Outros		352 (3,9)	260 (2,6)	93 (1,4)	705 (2,8)
Caratinga	<i>T. infestans</i>	0	0	0	0	0
	<i>T. sordida</i>	0	0	0	0	0
	<i>T. vitticeps</i>	3 (3,0%)	297 (52,4)	270 (69,6)	183 (46,8)	753 (52,1)
	<i>P. megistus</i>	97 (97%)	268 (47,3)	115 (29,6)	208 (53,2)	688 (47,6)
	Outros	0	2 (0,3)	3 (0,8)	0	5 (0,3)
Teófilo Otoni	<i>T. infestans</i>		3 (0,3)	0	0	3 (0,1)
	<i>T. sordida</i>		678 (55,8)	627 (61,1)	289 (67,5)	1.594 (59,7)
	<i>T. vitticeps</i>		300 (24,7)	275 (26,8)	127 (29,7)	702 (26,3)
	<i>P. megistus</i>		145 (11,9)	58 (5,7)	05 (1,2)	208 (7,8)
	Outros		95 (7,6)	63 (6,1)	07 (1,6)	165 (6,2)
Diamantina	<i>T. infestans</i>		0	0	0	0
	<i>T. sordida</i>		24 (22,9)	180 (30)	853 (95,9)	1.057 (66,2)
	<i>T. vitticeps</i>		11 (10,5)	18 (3,0)	02 (0,2)	31 (1,9)
	<i>P. megistus</i>		69 (65,7)	394 (65,6)	18 (2,0)	481 (30,1)
	Outros		1 (0,9)	9 (1,5)	17 (1,9)	27 (1,7)
<b>Total</b>						<b>31.097</b>

**Tabela 9** – Total de triatomíneos capturados por espécie nos municípios incluídos nos distritos sanitários de Caratinga, Diamantina, Montes Claros e Teófilo Otoni, nos anos de 1979, 1985, 1990 e 1995 pelo Programa de Controle da Doença de Chagas da Fundação Nacional de Saúde.

Espécies	1979	1985	1990	1995	Total
<i>P. megistus</i>	97	1.255	633 (50,4%)	231 (18,4%)	2.216
<i>T. infestans</i>	-	823	53 (6,4%)	0 (100%)	876
<i>T. sordida</i>	-	7.190	10.378 (+44,3%)	7.459 (+3,7%)	25.027
<i>T. vitticeps</i>	03	984	766 (77,8%)	323 (32,8%)	2.076
Outros	-	450	335 (74,9%)	117 (26%)	902

( ) Percentual de redução ou aumento em relação ao número de triatomíneos capturados em 1985.

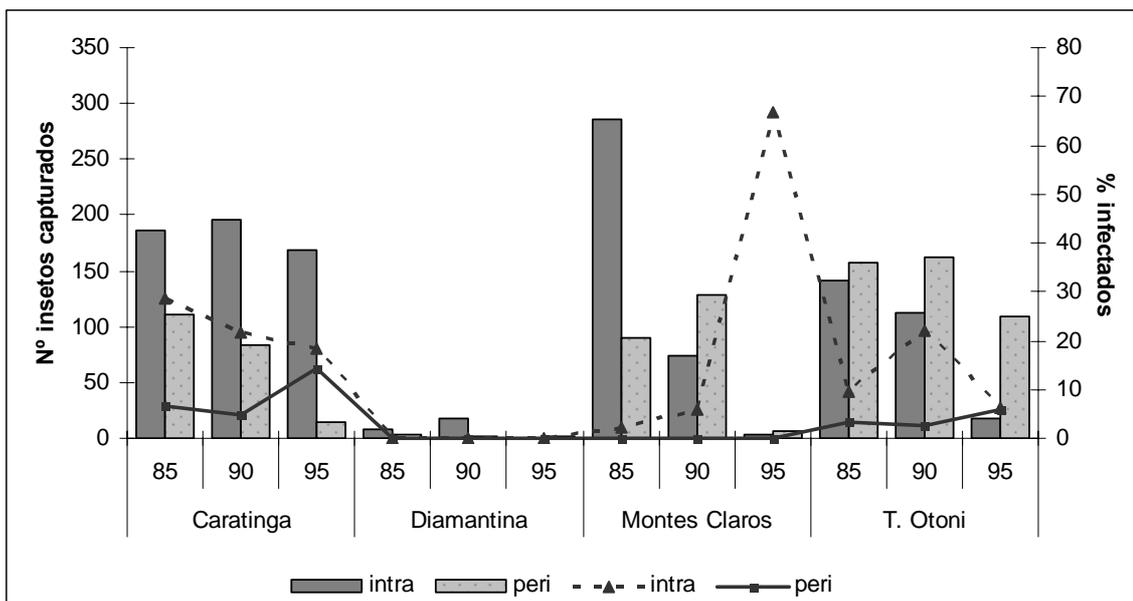


Figura 23 - Número de *T. vitticeps* capturados (colunas) e a taxa de infecção (linhas) no intra e peridomicílio em quatro distritos do Estado de Minas Gerais nos anos de 1985, 1990 e 1995.

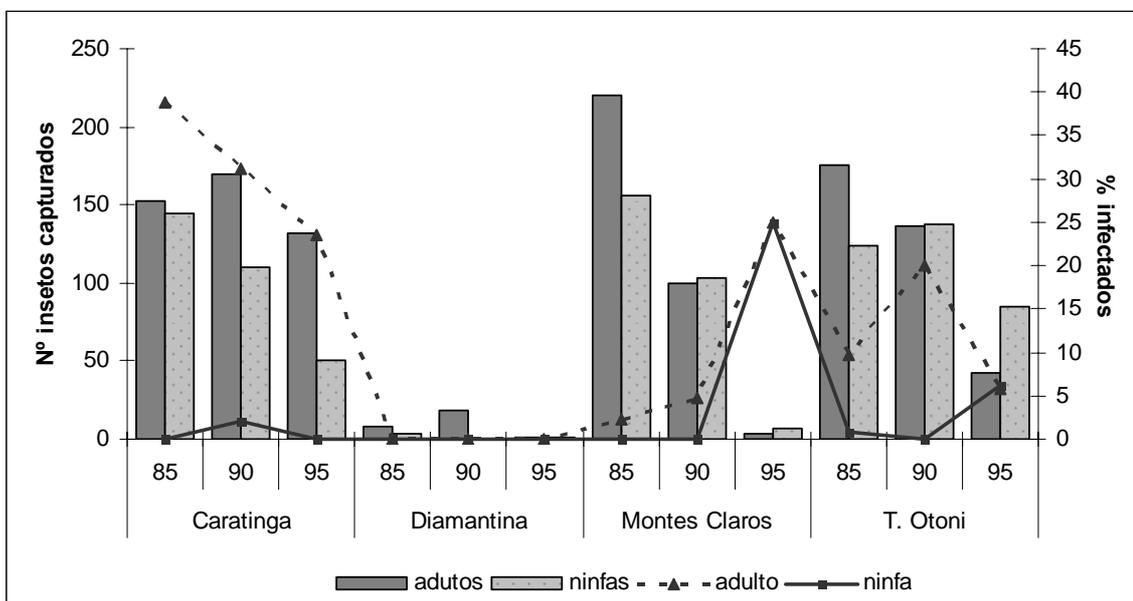


Figura 24 - Número de adultos e ninfas de *T. vitticeps* capturados (colunas) e a taxa de infecção (linhas) correspondente, em quatro distritos sanitários do Estado de Minas Gerais nos anos de 1985, 1990 e 1995.

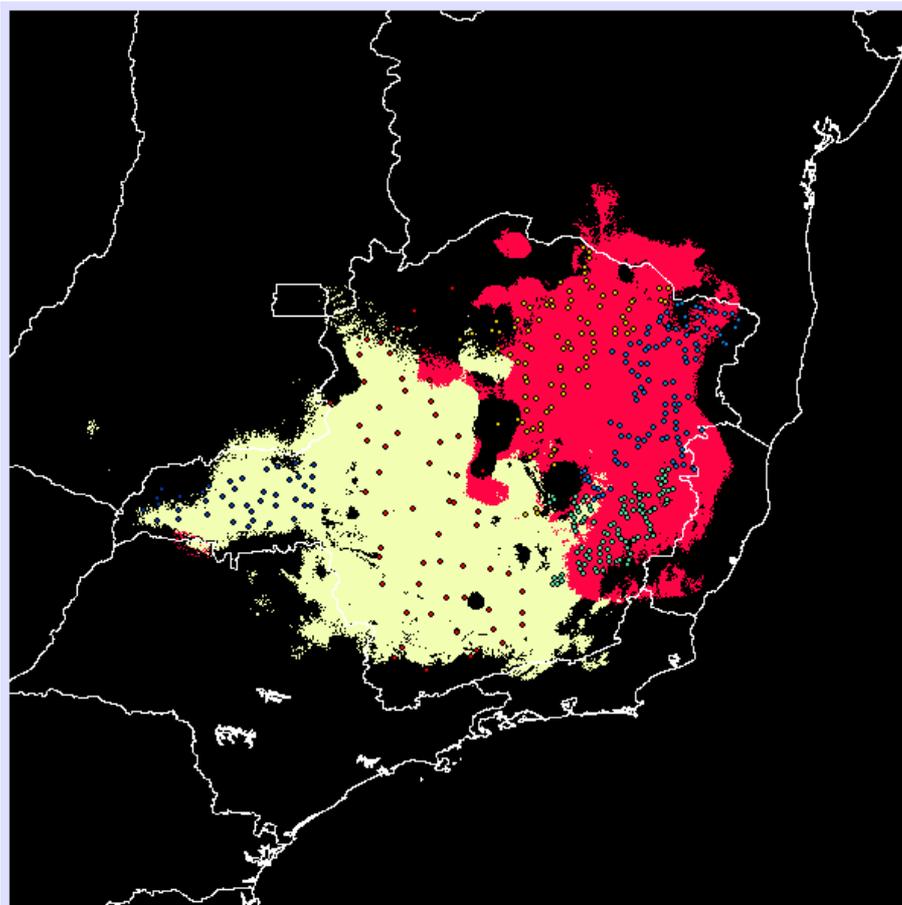
#### 4.9. Análise de distribuição espacial

Das 20 variáveis utilizadas para a realização da análise discriminante, cinco foram selecionadas para classificar os sítios amostrais quanto à ausência e presença do *T. vitticeps*, sendo que duas variáveis correspondem a variação de temperatura e três à precipitação (Tabela 10). Destas, as mais importantes para a discriminação foram a precipitação anual e a precipitação do trimestre mais úmido. Este modelo classificou corretamente 98,7% e 91% das áreas de presença e ausência, respectivamente. O erro de pós-classificação foi de 4%, ou seja, quatro pontos de presença na área são previsíveis e nove pontos na zona de ausência são previsíveis dentro da área de presença da espécie.

Usando as funções de classificação para as categorias de presença e ausência resultantes da análise discriminante, e os dados de cada uma das cinco variáveis identificadas para a discriminação, obtivemos como resultado final um mapa de previsão da possível ocorrência da espécie estudada (Figura 25).

**Tabela 10** - Valores médios e desvio padrão das cinco variáveis que melhor discriminam as áreas de presença e ausência do *T. vitticeps*. **BIO2**: Variação média diária (diferença entre a temperatura máxima e mínima), **BIO3**: Variação diária/Variação anual da temperatura, **BIO12**: Precipitação Anual, **BIO16**: Precipitação do trimestre mais úmido, **BIO18**: Precipitação do trimestre mais quente.

	BIO2	BIO3	BIO 12	BIO16	BIO18
Presença	12,0 (0,77)	6,7 (0,28)	1108 (194)	602.7 (109,6)	417 (90,4)
Ausência	12,6 (0,67)	6,9 (0,19)	1402 (116)	734.8 (48,3)	601 (110)



**Figura 25** - Áreas de presença (vermelho) e ausência (amarelo) de *T. vitticeps* derivadas da classificação baseada nas variáveis biofísicas pela análise discriminante. Os pontos verdes, azuis e amarelos dentro da área de presença se referem a municípios dos distritos de Caratinga, Teófilo Otoni e Montes Claros/Diamantina, respectivamente. Os pontos vermelhos e azuis dentro da área amarela representam áreas selecionadas aleatoriamente para ausência da espécie.

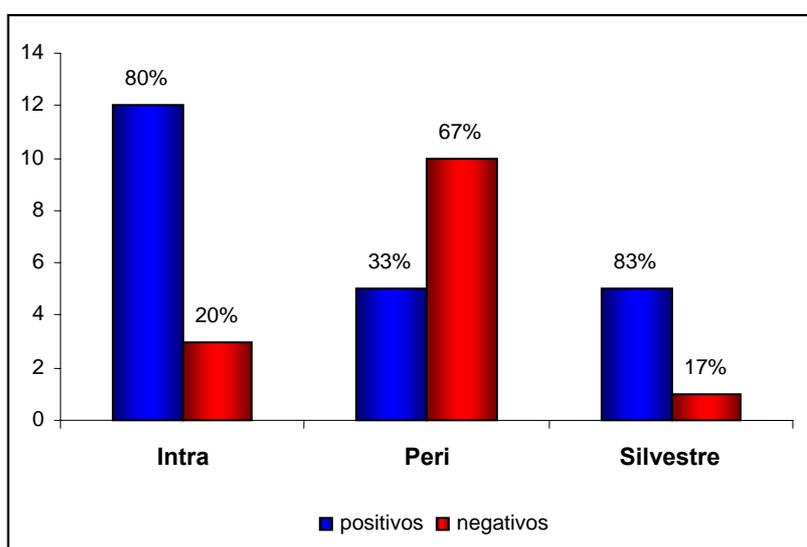
## 4.10. Pesquisa de tripanosomatídeos

### 4.10.1. Em hospedeiros invertebrados

Considerando a pesquisa de infestação do ambiente artificial realizada em 2002, e os insetos capturados por armadilha luminosa (amostra silvestre) em 2003, somente três eram ninfas, todas capturadas no peridomicílio, e apenas uma estava contaminada pelo *T. cruzi*, sendo os demais insetos capturados, adultos machos ou fêmeas. Vale ressaltar que os insetos capturados no peridomicílio se alimentam principalmente de animais domésticos, mantendo um contato maior com as aves, o que pode diminuir a taxa de infecção dos insetos capturados neste ambiente. Dos 36 insetos examinados, 15 (41,6%) são

provenientes do intradomicílio (12 positivos e três negativos), 15 (41,6%) do peridomicílio (cinco positivos e 10 negativos) e seis (16,7%) capturados no ambiente silvestre através de armadilha luminosa (cinco positivos e um negativo) (Tabela 11). Estes valores representam um índice de infecção total de 61,1%. Se comparados por ambiente de origem, observamos um aumento da taxa de infecção para os insetos provenientes dos ambientes intradomiciliar ( $p=0,02$ ) e silvestre (Figura 26).

A tentativa de aumentar a amostra de insetos capturados no ambiente silvestre, através das 180 armadilhas de Noireau distribuídas, não foi possível uma vez que nenhum inseto foi capturado por este método.



**Figura 26.** Índice de infecção por tripanosomatídeos dos *T. vitticeps* capturados nos ambientes intradomiciliar, peridomiciliar e silvestre, do município de Itanhomi, MG, Brasil.

**Tabela 11.** Resultado do exame de conteúdo intestinal dos *T. vitticeps* quanto à infecção por tripanosomatídeos e cepas isoladas.

Ambiente de captura	Código dos insetos	Exame
Intradomicílio	07*	+
	14**	+
	15*	+
	16**	+
	17	-
	18*	+
	37*	+
	38	-
	39*	+
	54*	+
	55	-
	134*	+
	135**	+
	157**	+
158**	+	
Peridomicílio	06*	+
	08	-
	20(N4)*	+
	22	-
	23	-
	24 (N5)	-
	25 (N5)	-
	26*	+
	27	-
	31	-
	32	-
	33	-
	34	-
	35*	+
36*	+	
Silvestre	133**	+
	159**	+
	160**	+
	161**	+
	162**	+
	163	-

\* Cepas criopreservadas em glicerol 10%.

#### 4.10.2. Em hospedeiros vertebrados (xenodiagnóstico)

Roedores adultos, não sexados, foram capturados vivos. Três gêneros foram identificados: *Trychomis* sp.(n=10), *Rattus rattus* (n=3) e *Calomys calosus* (n=3) (Tabela 12). Houve captura de um maior número de roedores do que o número de potes disponíveis, sendo os xenodiagnósticos aplicados pelos agentes de saúde. Por iniciativa dos mesmos, em algumas ocasiões um mesmo pote foi aplicado em diferentes roedores. Este material não foi descartado porque os triatomíneos foram negativos ao exame, sendo todos os roedores considerados negativos.

**Tabela 12.** Dados dos hospedeiros vertebrados capturados no ambiente silvestre do município de Itanhomi e resultado obtido no exame das ninfas utilizadas no xenodiagnóstico quanto à infecção por tripanosomatídeos.

Nº do pote do Xenó	Código do roedor	Espécie do roedor	Ninfas examinadas	
			+	-
1	883; 884; 897	<i>Calomys calosus</i>	0	10
1	889	<i>Trychomis</i>	0	10
2	866	<i>Trychomis</i>	0	09
3	888	<i>Trychomis</i>	0	08
4	865	<i>Trychomis</i>	0	10
5	867	<i>Trychomis</i>	0	07
6	898	<i>Rattus rattus</i>	0	08
6	882	<i>Rattus rattus</i>	0	08
7	866	<i>Trychomis</i>	0	10
8	889	<i>Trychomis</i>	0	08
9	867	<i>Trychomis</i>	0	07
10	865	<i>Trychomis</i>	0	07
11	881; 896	<i>Rattus rattus</i>	0	09
12	885; 886; 887	<i>Trychomis</i>	0	10

#### 4.11. Diagnóstico e caracterização do *T. cruzi*

Das 65 amostras de fezes de *T. vitticeps* conservadas em papel filtro, 39 estavam positivas para *T. cruzi* e 26 estavam negativas, ou seja, não amplificaram nenhum fragmento de DNA, mesmo após serem reavaliadas. Além

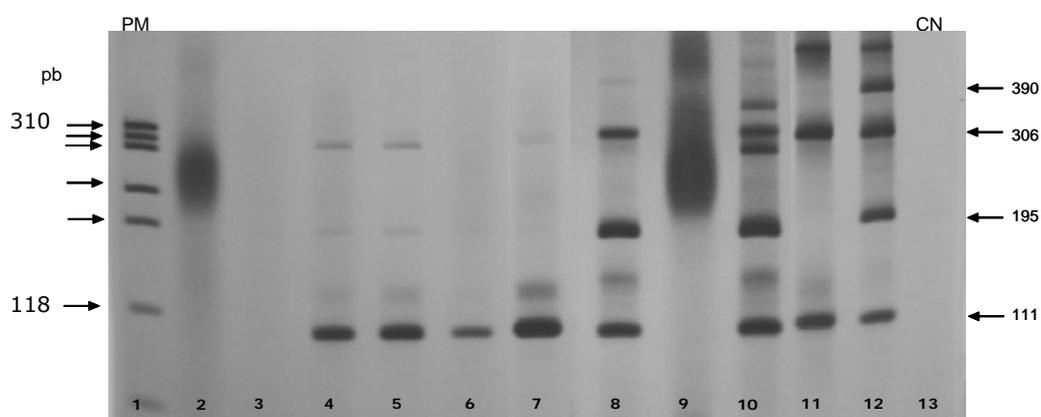
dessas amostras, avaliamos também as 12 cepas que haviam sido isoladas após exame do conteúdo intestinal (item 4.10.1.).

A presença dos fragmentos de 111pb além de diagnosticar, caracteriza as amostras como *T. cruzi* I. Já o fragmento de 195pb é exclusivo e característico para o grupo *T. cruzi* II. A classificação das amostras diagnosticadas estão apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 13.** Classificação das amostras de *T. cruzi* obtidas de *T. vitticeps*, através da PCR multiplex.

Amostras	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II
Cepas criopreservadas	10 (83,3%)	02 (16,7%)
Insetos mortos	35 (89,7%)	04 (10,3%)
Total	45 (88,2%)	06 (11,7%)

A Figura 27 representa um dos perfis de amplificação obtidos pela PCR multiplex. Os resultados revelaram cepas com perfil de amplificação compatível ao grupo padrão TcI, e duas amostras compatíveis ao padrão TcII.



**Figura 27** – Perfil eletroforético (gel de poliacrilamida 6% corado pela prata) obtido através da PCR multiplex de nove amostras de DNA extraídas de fezes de *T. vitticeps*, coletados em Itanhomi, Minas Gerais. Canaleta 1: padrão de peso molecular; 2, 3 e 9: insetos não infectados; 4 a 7: infecção por *T. cruzi* I; 8 e 10: infecção por *T. cruzi* II; 11: cepa padrão *T. cruzi* I; 12: padrão *T. cruzi* II e 13: controle negativo.

As 266 amostras de sangue dos roedores, também conservadas em papel filtro, não amplificaram nenhum fragmento pela PCR multiplex, que diagnosticasse a presença de *T. cruzi*. Os roedores submetidos às análises foram capturados em áreas de pastagem ou repouso entre safras (110), brejos (38),

pedras (47) e paióis (71) em 24 localidades dentro do município de Itanhomi: Adão Daniel (27), Agenor Fernandes (10), Antônio Gonçalves (6), Antônio Marciano (12), Barro Branco (4), Barra do Guido (12), Cabeceira do Guido (8), Córrego do Guido (21), João Caboclo (19), João Pedro Porciano (1), José Dutra (3), José Lopes (7), José Tavico (13), Jovem Calixto (8), Júlio Carlos (32), Liés Alves (23), Luiz Alves dos reis (5), Manuel Simão (9), Maria Leite (16), Messias Nogueira (8), Titino Lage (15), Valentino Vieira (3), Valico (3), Vivaldo (1). Nove gêneros de roedores foram identificados: *Akodon arviculoides* (12), *Bolomys lasiurus* (9), *Calomys callosus* (23), *Oligoryzomys sp* (7), *Oryzomys sp* (23), *Mus musculus* (1), *Nectomys sp* (38), *Rattus rattus alexandrinus* (19), *Rattus rattus frugivorus* (36), *Rattus rattus* (50), *Thrichomys inermis* (48).

#### 4.12. Infecção experimental em camundongos

No inóculo referente à cepa de origem domiciliar (TcII), a presença de tripomastigotas sanguíneos foi constatada em um camundongo no sétimo dia após infecção. A partir desse camundongo, foi feita a manutenção dos tripanosomas sanguíneos através de passagens sucessivas, com inóculos variados.

Em relação à cepa de origem silvestre (TcI), não foi possível obter nenhum tripomastigota sanguíneo mesmo após várias tentativas de infecção, com inóculos variados e, inclusive quando outra cepa (Tv06) foi usada.

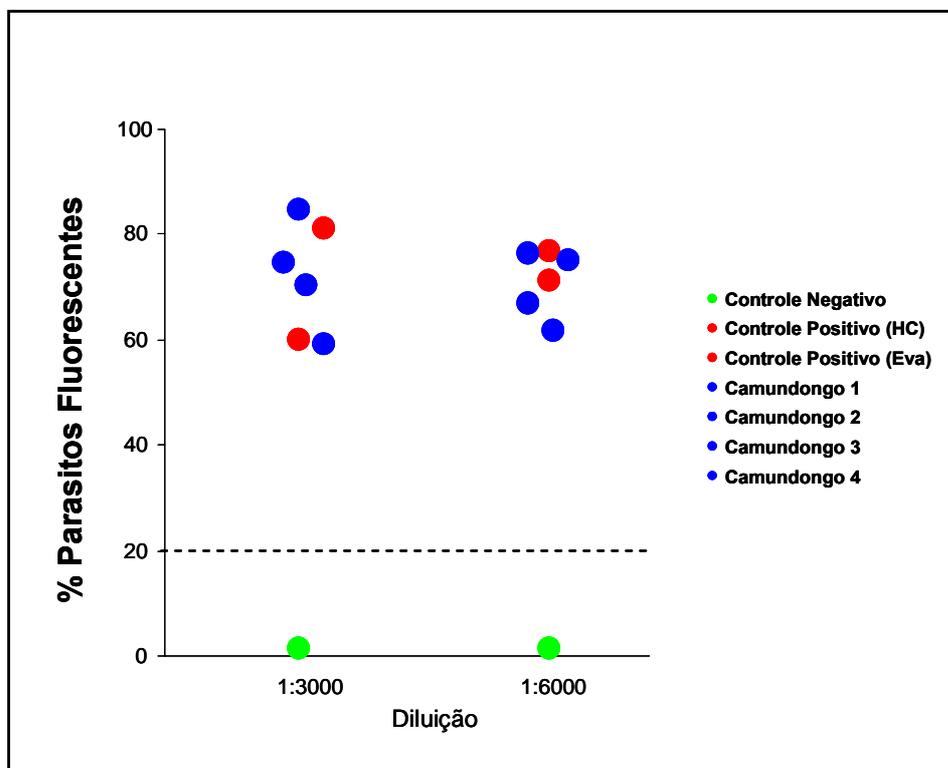
Nos camundongos INF- $\gamma$  knockout, inoculados com a cepas TcI, a parasitemia foi patente a partir do sétimo dia, alcançando seu pico no 16<sup>o</sup> dia. Dois dias após infecção os camundongos se mostravam arrefriados, com aspecto de doentes. Todos os camundongos morreram. A mortalidade teve início no sétimo dia com um camundongo, cinco (50%) morreram 19 dias após infecção e o último camundongo morreu 30 dias após infecção.

##### 4.12.1 Hemocultura e citometria de fluxo

Todos os quatro camundongos inoculados com tripomastigotas sanguíneos, obtidos do camundongo INF- $\gamma$  knockout infectado com a cepa Tv06, mostraram resultados positivos, tanto na citometria de fluxo quanto na hemocultura, nove

meses após a infecção.

Na Figura 28 está demonstrado que os soros destes animais apresentam um valor de PFP  $> 20$  nas duas diluições avaliadas, indicando a presença de *T. cruzi* e conseqüentemente, uma infecção crônica por este protozoário.



**Figura 28** – Porcentagem de parasitas fluorescentes obtidos pela citometria de fluxo utilizando soro de camundongos inoculados com a cepa Tv06.

**V - DISCUSSÃO**

---

A doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde pública na América Latina, onde se estima que 4% a 5% da população possa estar infectada pelo *T. cruzi* (Schmunis et al. 2007). No Brasil, a transmissão vetorial da doença de Chagas encontra-se controlada e a maioria das áreas consideradas originalmente endêmicas estão na etapa da vigilância epidemiológica, sendo a manutenção desta, um dos principais desafios para a consolidação do PCDCh pelo Sistema Único de Saúde (Dias, 2006). Sob este aspecto, os esforços devem se concentrar no sentido de manter os resultados obtidos, consolidar o controle de focos residuais e impedir o estabelecimento de novos focos de transmissão vetorial. Além disso, existe a necessidade de ampliação dos conhecimentos sobre vetores autóctones e de origem silvestre, que eventualmente, possam colonizar o ambiente domiciliar e transmitir o *T. cruzi*, como é o caso de *T. vitticeps*.

Com a recente eliminação das populações domiciliares de *T. infestans* pelo Programa de Controle da Doença de Chagas no Brasil (Dias, 2006), e considerando as sucessivas transformações ambientais causadas pelo homem, várias espécies de importância secundária e até mesmo terciária na transmissão da doença humana estão sendo encontradas no interior das habitações, aumentando o risco de transmissão e adquirindo importância epidemiológica (Diotaiuti, 2007). O *T. vitticeps* encontra-se neste contexto e com o agravante do elevado índice de infecção natural dos exemplares capturados.

O município de Itanhomi foi escolhido para este estudo pela freqüência com que o *T. vitticeps* era (e ainda é) encontrado nas casas da região, e com altos índices de infecção. Nossos estudos comprovaram que estes parasitos eram *T. cruzi*. De fato, a migração diária de insetos para o interior das casas foi relatada frequentemente pelos moradores do município nas duas ocasiões de busca por estes triatomíneos. Entretanto, nenhuma ninfa ou exúvia foi encontrada no intradomicílio, evidenciando mais uma vez a dificuldade de colonização por esta espécie, apesar dos insetos invadirem o ambiente artificial e de haver postura de ovos pelas fêmeas. O encontro de 21 ovos comprova este fato, mas também demonstra que o desenvolvimento de colônias no peridomicílio não é fácil, uma vez que nunca foi encontrada uma colônia com mais de cinco insetos, apesar da grande disponibilidade de fontes alimentares no peridomicílio. O *T. vitticeps* não se distribui nos diferentes anexos peridomiciliares, mas concentra-se principalmente nos paióis e porões, ao contrário do que se observa com outras espécies, como *T. sordida*, *T. brasiliensis* e *P. megistus* (Diotaiuti, 2007).

Em nossa observação, a qualidade da habitação apresenta duplo aspecto.

As casas das localidades estudadas apresentam bom padrão de construção, sendo a maioria de alvenaria com reboco e cobertas por telhas de barro. De um lado, este bom padrão certamente dificulta a domiciliação da espécie, fato sobejamente relatado para outras espécies. Por outro, não impede a chegada constante de alados, mormente em épocas mais quentes e chuvosas. No intradomicílio, considerando a baixa infestação observada, e a diferença na predominância das capturas realizadas pelos moradores (maioria dos barbeiros nos quartos) e pelos agentes de saúde (maioria na sala), fica claro que o método de pesquisa ativa não é o ideal para constatação da infestação por *T. vitticeps*, sendo mais adequado o método utilizado pela vigilância epidemiológica, de estímulo aos moradores para notificação da infestação.

Uma característica peculiar da localidade é a proximidade entre as unidades domiciliares e o ambiente silvestre, o que deverá facilitar o trânsito de triatomíneos a partir dos mananciais naturais. No levantamento das características da infestação aqui apresentadas, apenas três porões foram mencionados. Entretanto, muitas casas são construídas sobre palafitas, deixando um espaço entre o assoalho e o solo, oferecendo abrigo para animais domésticos e depósito de materiais. O teto deste porão, que se constitui do assoalho da casa, é de madeira e possui gretas que favorecem o trânsito dos insetos entre os dois ambientes. Este anexo peridomiciliar é reconhecido pelos agentes de saúde do município como sendo um local frequentemente infestado. Lamentavelmente esta informação não foi adequadamente trabalhada. O índice de infestação desses porões foi de 100%, mostrando a importância desse microambiente na manutenção de colônias peridomiciliares. Diante deste fato, sugerimos estudos futuros que caracterizem melhor este ambiente, levando em consideração a importância destes porões para a infestação triatomínica da região.

Os resultados obtidos com a análise de morfometria, RAPD e isoenzimas demonstraram grande intercâmbio entre os ambientes silvestre e artificial. A análise morfométrica da cabeça é uma técnica muito utilizada em estudos populacionais de triatomíneos (Dujardin et al. 1998b, Soares et al. 1999, Borges et al. 2000, Jaramillo et al. 2002, Barbosa 2004, Borges et al. 2005). Na análise univariada, o perfil de Guillaumin permitiu fazer uma comparação entre as populações para cada caráter separadamente, fornecendo informações acerca do tamanho e simetria de um grupo em relação ao outro. No presente estudo, essa análise demonstrou a ocorrência de dimorfismo sexual nas três amostras estudadas, sendo as fêmeas de cada população significativamente maiores que

os machos, conforme o padrão dos triatomíneos. De acordo com Dujardin et al. (1998b), a perda do dimorfismo sexual, pela diminuição do tamanho das fêmeas, provavelmente resulta da competição por alimento e pelo grande dispêndio energético para realização da postura, podendo ser utilizada como marcador no processo de domiciliação. A presença do acentuado dimorfismo sexual em nossos resultados reflete, mais uma vez, a baixa capacidade de colonização intradomiciliar pelo *T. vitticeps*. Na comparação entre os indivíduos do mesmo sexo e diferentes ambientes de captura, nenhuma diferença de tamanho (ACPC) ou forma (componentes canônicos) foi significativa.

Os marcadores RAPD têm sido utilizados em diversos estudos de genética de populações de triatomíneos (Garcia et al. 1998, Jaramillo et al. 2001, Dorn et al. 2003, Calderón et al. 2004, Borges et al. 2005, Barbosa et al. 2006). Através da análise de similaridade apresentada pelos perfis de RAPD, Borges et al. (2005) observaram nítida separação em três populações de *T. brasiliensis* do Estado do Ceará, correspondentes aos ambientes de captura silvestre, peridomiciliar e domiciliar. O encontro de alguns exemplares com perfil correspondente ao de outro ambiente, como o de insetos peridomiciliares no intradomicílio e o de insetos silvestres no peridomicílio, demonstra o intercâmbio de triatomíneos entre estes ambientes, sugerindo que a população do peridomicílio funcione como uma "ponte", recebendo genes do ambiente silvestre e repassando-os para o ambiente domiciliar.

Em nosso trabalho, o dendograma UPGMA obtido a partir dos perfis gerados pela RAPD mostra um único grupo incluindo os insetos capturados nos três ambientes, aleatoriamente distribuídos, e sem nenhuma separação por sexo ou ambiente de origem, reforçado ainda pelos baixos valores de distância genética encontrados. Sequer no peridomicílio, onde há colonização, ficou evidente a formação de um grupo homogêneo, reforçando a idéia de fluxo de insetos entre os ambientes. Na Guatemala, Dorn et al. (2003) e Calderón et al. (2004) observaram altos níveis de variabilidade genética em populações de *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), com valores de  $k$  entre 79,3 a 100%, e heterozigosidade variando de 0,283 a 0,352. No presente trabalho, observamos que tanto a proporção de loci polimórficos ( $k = 37,71-45,24\%$ ) quanto a heterozigosidade ( $H = 0,13-0,15$ ) das amostras estudadas foram muito menores, demonstrando uma pequena diferenciação genética entre os insetos provenientes dos diferentes ambientes. Estes resultados coincidem com as condições ambientais de Itanhomi, caracterizada pela proximidade dos três ambientes,

ausência de formação de colônias intradomiciliares e o relato de afluxo diário de triatomíneos pela população local.

As isoenzimas também podem ser importantes marcadores populacionais para algumas espécies de triatomíneos. Para *T. infestans*, Dujardin & Tibayrenc (1985) encontraram três padrões para a enzima PGM, permitindo a caracterização de populações silvestres e domiciliares. Pires (1995), comparando populações de *T. infestans* da Bolívia e do Brasil, encontraram para esta enzima dois padrões isoenzimáticos para os insetos de Cochabamba (região de origem da espécie) e apenas um padrão para as populações brasileiras. Estes resultados ajudaram a comprovar a hipótese de simplificação genética em consequência do processo de dispersão passiva desta espécie, que resultou na seleção de indivíduos extremamente homogêneos, em áreas onde a espécie não é autóctone. Também pela utilização de isoenzimas, Barbosa et al. (2003) propõem a ampliação do centro de origem do *P. megistus*, nele incluindo Minas Gerais e Bahia, considerando a hipótese de que no seu local de origem os triatomíneos apresentam maior grau de variabilidade. Entretanto, em outros estudos populacionais de triatomíneos baseados na morfometria e RAPD, as isoenzimas não mostraram diferenças (Soares et al. 1999, Dujardin et al. 1987, 1997 e 1998, Borges et al. 2000). Em nosso trabalho, este marcador mostrou-se extremamente homogêneo para as três amostras estudadas, em concordância com as análises anteriores, sugerindo que se trata de mesma população.

Este é o primeiro relato de estudo de dinâmica populacional de *T. vitticeps* envolvendo ferramentas taxonômicas. A similaridade dos padrões de RAPD, de tamanho e forma, o nítido dimorfismo sexual pela morfometria e o monomorfismo isoenzimático entre os indivíduos dos três ambientes, sugerem intensa movimentação dos triatomíneos entre os ambientes estudados. Até o momento, esta espécie mostrou ser incapaz de estabelecer colônias intradomiciliares, embora a captura no interior das casas seja freqüente, coincidindo com o relato da população local de invasão diária por estes insetos.

Os estudos laboratoriais e de ocorrência do *T. vitticeps* comprovam a associação da espécie com ambientes de maior umidade. Estudando o comportamento de higropreferência de *T. infestans*, Roca & Lazzari (1994) observaram que estes insetos preferem permanecer em umidades baixas mesmo durante um período prolongado de jejum. Contrariamente, *T. brasiliensis* (Guarneri et al. 2002) e *P. megistus* (Pires, 2003) mudam sua higropreferência para níveis de umidade mais altos quando seu jejum é aumentado. Para o *T.*

*vitticeps*, nossos resultados demonstram que as ninfas dessa espécie têm um comportamento semelhante ao das últimas espécies citadas, já que escolhem o setor mais seco da arena experimental quando recentemente alimentadas, e o setor mais úmido quando em jejum. Guarneri et al. (2002) sugerem que esse comportamento represente um mecanismo para controle do balanço hídrico, modulado pelo estado nutricional dos insetos. Sobre o comportamento do *T. vitticeps* durante o processo de muda é interessante notar que praticamente 50% dos exemplares permaneceram no setor mais seco da arena e os outros 50% no setor mais úmido. Este resultado particular sugere que a tigmotaxia (tendência a agarrar-se aos objetos com que se põem em contato) deva ser um fator que pode estar influenciando fortemente este comportamento. Entretanto, é necessário fazer permutações nas umidades relativas na arena experimental para comprovar este fato.

Sobre a eclosão dos ovos, os resultados mostram que estes foram extremamente afetados pela baixa umidade. Somente dois ovos eclodiram em umidade de 21%. Ainda assim as ninfas não sobreviveram. Resultados semelhantes foram observados para *P. megistus*, onde não foi observada eclosão para umidade de 9% e somente 23% de eclosão para os ovos expostos a 37% de umidade (Pires, 2003). Da mesma forma, os ovos de *R. prolixus* não eclodem a 0% e somente 45% deles eclodem a 30% de umidade relativa (Clark 1935, Schilman, 1998). Contrariamente, Roca & Lazzari (1994) analisando o efeito da umidade relativa na eclosão dos ovos de *T. infestans* observaram que 94% dos ovos expostos a 0% de umidade eclodiram. Guarneri et al. (2002) discutem a dificuldade de eclosão do *T. brasiliensis* nas umidades extremamente baixas ou altas. Todavia ainda foi observado 68,9% de eclosão a 9% de umidade, resultado bastante superior quando comparado aos 52,3% encontrado para *T. vitticeps* em 41% de umidade.

Observações realizadas anteriormente por Schilman et al. (1998) com *R. prolixus*, Guarneri et al. (2003) com *T. brasiliensis* e Pires (2003) com *P. megistus*, mostram que umidades próximas a 100% afetam negativamente a eclosão dos ovos, levando os autores a sugerirem que a presença de fungos patógenos contribuiria para diminuir a eclosão neste nível de umidade. Contrariamente a estas espécies, a maior taxa de eclosão foi observada na umidade mais alta (95,4%) para o *T. vitticeps*, mostrando a importância da interação desse vetor com fatores abióticos do ambiente, o que poderia ser um fator limitante para a sua dispersão.

A adaptação de uma espécie no ambiente artificial está diretamente relacionada à capacidade desta em explorar de forma eficiente os recursos disponíveis, como, por exemplo, abrigo e alimentação. Além disso, é necessária ainda a existência de um perfil ambiental que se mostre adequado para a ocorrência da espécie. O *T. infestans*, por exemplo, encontrou no intradomicílio das regiões onde foi introduzido todas as condições necessárias para sua permanência, tornando-se o vetor mais importante na transmissão da doença, devido a seu hábito quase exclusivamente doméstico e sua ampla distribuição geográfica (Schofield, 1994).

O bom trabalho exercido pelo PCDCh levou à eliminação do *T. infestans* de quase todo o território nacional brasileiro. No presente trabalho, a análise dos resultados do PCDCh nas áreas de ocorrência do *T. vitticeps* demonstra que já em 1985, não havia registro desta espécie em nenhum dos municípios pesquisados em Minas Gerais, ou, o que é mais razoável de se pensar, é que este número era tão pequeno que não foi constatado. Para espécies autóctones, como *T. sordida* e *T. vitticeps*, a mudança cada vez maior no habitat natural, em consequência de contínuas pressões antrópicas, leva a dispersão de triatomíneos silvestres para o interior de habitações humanas. No caso do *T. vitticeps*, normalmente as taxas de infecção são altas e uma vez que há escassez de alimento, os insetos invadem as casas, podendo ou não formar colônias e, eventualmente transmitir o *T. cruzi* (Schofield 1994).

Silveira et al. (1984) reuniram informações ao longo do período de 1975 a 1983 relativas a capturas domiciliares e peridomiciliares, anteriores e posteriores ao tratamento com inseticidas, obtidos na rotina de trabalho da antiga SUCAM (Superintendência de Campanhas de Saúde Pública). Nesta ocasião foram investigados 1942 municípios pertencentes a 19 Estados brasileiros. Em 36 municípios do Espírito Santo, 31 (86,1%) foram positivos para o *T. vitticeps*; de 442 municípios de Minas Gerais, 96 (21,7%) foram positivos para esta espécie e somente um (0,4%) dos 239 municípios investigados no Estado da Bahia. Embora o Estado do Rio de Janeiro tenha sido pesquisado (dois municípios) e a distribuição do *T. vitticeps* seja conhecida nesta região, nenhum exemplar deste vetor foi registrado naquele trabalho. Recentemente, dados de distribuição da fauna triatomínica, segundo o PCDCh no Estado de Minas Gerais, para o período de 2002 a 2006 mostram que o *T. vitticeps* é a terceira espécie mais capturada (Siloto et al. 2007), apesar de aparecer em baixas porcentagens em comparação com outras espécies autóctones, principalmente o *T. sordida*.

A redução no número de insetos capturados ao longo dos anos trabalhados já era esperada, tendo em vista a extensa campanha com borrifação de inseticida nos domicílios infestados e a progressiva devastação ou modificação do ambiente natural. Todavia, o impacto do controle sobre o *T. vitticeps* e o *T. sordida* foi menor em relação às demais espécies. Este fato deve estar relacionado ao comportamento e biologia destas duas espécies. O *T. vitticeps* é sem dúvida uma espécie silvestre. Entretanto, invade as casas frequentemente e apesar de não colonizar o ambiente artificial, tem sua importância epidemiológica devida à alta taxa de infecção. Já o *T. sordida*, no Brasil é uma espécie que ocupa principalmente o peridomicílio, mas na ausência do *T. infestans* pode invadir e até formar pequenas colônias (Schofield, 1994).

Em alguns casos nos distritos de Montes Claros e principalmente em Teófilo Otoni, a análise dos dados de ocorrência do *T. vitticeps* revelou um maior número de insetos capturados no peridomicílio em relação ao intradomicílio, ao contrário das demais regiões. Considerando que as taxas de infecção dos exemplares capturados também se mostraram altas, este fato torna-se ainda mais importante. Assim como ocorre em Itanhomi, onde o peridomicílio é o único ambiente onde a colonização se mostra eficiente, é possível a existência de um intercâmbio entre os ambientes, o que pode favorecer a transmissão do *T. cruzi*. Infelizmente, a base de dados utilizada para esta análise não fornece informações que possibilitem uma melhor compreensão dos diferentes potenciais de colonização do peridomicílio.

Da mesma forma, a base de dados da FUNASA, não permite discriminar quantos adultos e ninfas foram capturados por ambiente. Por outro lado, quanto à taxa de infecção, à exceção das capturas realizadas ao longo de 1995 em Caratinga e Teófilo Otoni, os insetos capturados no intradomicílio apresentavam maior taxa de infecção do que os do peridomicílio, e se referem principalmente aos insetos adultos. Embora os dados sejam relativamente antigos, a série histórica analisada se parece bastante com a realidade atual em Itanhomi, reforçando mais uma vez a hipótese de invasão contínua pelo *T. vitticeps*.

Os estudos baseados em sensoriamento remoto oferecem grandes benefícios uma vez que são fornecidos dados históricos para comparação e análise (Ostfeld et al. 2005). Uma aplicação importante para essa ferramenta consiste na utilização de variáveis ambientais, registradas em formato digital, que são utilizadas para elaborar modelos de predição da distribuição geográfica potencial de vários vetores de doenças. Em estudos com triatomíneos, Gorla

(2002) foi pioneiro na utilização de dados de variáveis ambientais obtidos através de satélites, propondo um mapa de predição para o *T. infestans*, principal espécie vetora na América do Sul. Recentemente, Carbajal de la Fuente et al. (2008) também propuseram um mapa de predição para *T. wygodzinskyi* e *T. pseudomaculata*, espécies morfológicamente semelhantes. A partir das análises dos dados, os autores concluem que a distribuição das duas espécies é definida por características ambientais diferentes. Às variáveis de temperatura e pressão de vapor são significativas para a presença de *T. wygodzinskyi*, enquanto para *T. pseudomaculata* as variáveis que melhor discriminaram os locais de presença e ausência estão relacionadas ao índice de vegetação e temperatura de superfície da terra.

Na presente análise, a similaridade entre o mapa de distribuição hipotético e a distribuição real do *T. vitticeps*, demonstram as variáveis ambientais de precipitação e temperatura como indicadores potenciais para a ocorrência desse vetor. O Estado de Minas Gerais apresenta uma localização ambiental de transição entre três dos mais importantes biomas brasileiros: a Floresta Atlântica, o Cerrado e a Caatinga (Scolforo & Carvalho, 2006). Além disso, nascem em Minas Gerais importantes rios que formam cinco bacias hidrográficas (São Francisco, Grande, Paranaíba, Doce e Jequitinhonha), que drenam cerca de 90% de sua área, e lhe conferem um enorme potencial hídrico. Detentor de um relevo fortemente acidentado, onde se destacam a Serra da Mantiqueira e do Espinhaço, Minas Gerais apresenta altitudes que variam de um mínimo de 79m no município de Aimorés, a 2.890m no Pico da Bandeira, divisa com o Estado do Espírito Santo. A organização do relevo está intimamente associada às grandes bacias hidrográficas, com seus respectivos divisores, e os biomas nelas presentes. Desta forma, a presença do *T. vitticeps* parece de fato, estar intimamente relacionada às características descritas pela análise. Além disso, vale ressaltar os resultados obtidos nos experimentos de eclosão, que é favorecida pela umidade alta, reforçando os resultados obtidos pelas análises espaciais no modelo teórico.

Nossos resultados se mostraram altamente similares à distribuição geográfica conhecida atualmente para o *T. vitticeps*. Embora a análise tenha selecionado uma região de presença maior para o Estado da Bahia do que é conhecido atualmente, deve-se considerar que a similaridade ambiental com a variação de ocupação da espécie indica que esta região poderia ser potencialmente ocupada, e a ausência de *T. vitticeps* nesta área pode significar,

entre outros fatores, a presença de algum tipo de barreira física que impede ou limita sua ocupação.

Os resultados sobre higropreferência, eclosão dos ovos e análise espacial mostram a importância da interação do *T. vitticeps* com fatores abióticos. Entretanto, para que a espécie tenha sucesso nos locais onde habita é necessário que ocorra também uma adaptação dos insetos aos seus hospedeiros vertebrados.

O processo alimentar dos triatomíneos varia grandemente entre as espécies, sendo influenciado por inúmeros fatores, entre eles, as características do aparato alimentar e da composição da saliva do inseto, bem como a fisiologia do hospedeiro vertebrado e do sítio de alimentação (Guarneri et al. 2000, 2003, Araújo et al. 2008). Assim, a capacidade de explorar os recursos alimentares disponíveis pode influenciar diretamente na dinâmica populacional e na capacidade vetorial dos triatomíneos (Pereira et al. 2006).

Os triatomíneos são ectoparasitos solenofágicos, isto é, obtêm sangue diretamente dos vasos sanguíneos (vênulas ou arteríolas) de seus hospedeiros vertebrados. Suas mandíbulas serrilhadas perfuram e ancoram o aparato bucal na região superficial da pele, enquanto as maxilas penetram até a derme. Após a picada, inicia um período de sondagem caracterizado por movimentos intradérmicos das maxilas que lembram um chicote. Uma vez que um vaso adequado é encontrado, inicia-se a fase de ingurgitamento (Lavoipierre et al. 1959). A ingestão de sangue através do canal alimentar é favorecida pela bomba cibarial, cujos movimentos são regulados por uma complexa e forte musculatura ocupando grande parte da cabeça do inseto (Bennet-Clark, 1963). Parâmetros como pressões negativas produzidas pela bomba cibarial, dimensões do canal alimentar, viscosidade do sangue, o tamanho e a capacidade de deformação das hemáceas do hospedeiro, são fatores que podem influenciar a taxa de ingestão (Kingsolver & Daniel, 1995).

O monitoramento da bomba cibarial foi originalmente descrito por Friend & Smith (1971) e posteriormente modificado por Guarneri et al. (2000, 2003). A análise da atividade elétrica da bomba cibarial durante o processo de hematofagia de ninfas de *T. vitticeps* permitiu identificar eventos como o momento da picada, a fase de sondagem, as contrações dos músculos dilatadores da bomba durante o ingurgitamento e a retirada das peças bucais da pele do hospedeiro no fim do repasto. Estas informações associadas ao ganho de peso do inseto permitiram calcular vários parâmetros do processo alimentar que

foram utilizados no presente estudo.

A duração do tempo de contato é um fator importante na interação entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros, uma vez que o comportamento defensivo destes pode reduzir o sucesso alimentar ou até ocasionar a morte do inseto. Desta forma, as espécies que possuem as mais altas taxas de ingestão tendem a ter melhores status nutricionais, e alcançar densidades populacionais mais altas, como ocorre com *T. infestans* e *R. prolixus* (Sant'Anna et al. 2001).

Nossos dados mostraram que as ninfas de *T. vitticeps* demandam um maior tempo de contato quando o repasto é realizado em camundongos. De acordo com Guarneri et al. (2000) e Sant'Anna et al. (2001), quando ninfas da mesma espécie e mesmo estágio de desenvolvimento são alimentadas em diferentes hospedeiros, as variações no tempo de contato estão relacionadas principalmente a diferenças na frequência de contrações da bomba cibarial e no número de interrupções.

Neste estudo, observamos que *T. vitticeps* apresenta maior dificuldade em se alimentar em camundongos do que em pombos. A menor taxa de ingestão de sangue de camundongos se deve principalmente a menor frequência de contrações da bomba cibarial no roedor do que no pombo (2,7 e 4,2 contrações/seg, respectivamente).

A taxa de ingestão de sangue obtida pelas ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps* (2,0 mg/min) foi maior do que o relatado para ninfas de segundo estágio de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* (1,0 e 0,4 mg/min, respectivamente) em camundongo (Soares et al. 2000). Entretanto, deve-se considerar que o *T. vitticeps* é um triatomíneo grande necessitando de maiores quantidades de sangue em cada repasto, fato que aumenta consideravelmente o tempo de contato com seus hospedeiros. O tempo contato de ninfas de segundo estágio de *T. vitticeps* foi maior (26,8 minutos) do que o relatado para *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* (22,1 e 19,5 minutos, respectivamente) (Soares et al. 2000).

Durante as alimentações experimentais das ninfas, realizadas em camundongos e pombos, foi possível notar a dificuldade na obtenção do repasto devido à irregularidade dos sinais elétricos produzidos pela bomba cibarial (tanto na frequência como no seu perfil) gerando espectros de frequência em função do tempo com muitos ruídos, principalmente nos experimentos com camundongos. Sobretudo, se compararmos com os espectros de frequência obtidos em camundongo durante a alimentação de ninfas de *R. prolixus* normais (Araújo et

al. 2008).

A eficiência alimentar também pode ser diretamente influenciada pela ação da saliva. A saliva dos triatomíneos, assim como a de outros insetos hematófagos, auxilia na tarefa da alimentação, atenuando os danos mecânicos decorrentes da movimentação das peças bucais sobre a pele do hospedeiro, que irá desencadear uma série de respostas fisiológicas de reparo durante a obtenção do repasto sanguíneo. Para contrapor a essas reações adversas do hospedeiro, os triatomíneos liberam saliva durante todo o seu processo alimentar (Soares et al. 2006), contendo uma grande variedade de atividades biológicas.

Dan et al. (1999) observaram que a saliva do *T. infestans* possui atividade inibitória irreversível sobre a geração do impulso nervoso em nervo ciático de rato. Também já foi demonstrado que *P. megistus* possui atividade inibitória sobre a geração do impulso nervoso (Alves, 2007). Entretanto, uma diferença observada entre essas duas espécies de triatomíneos estudadas é que, ao contrário do observado na saliva de *T. infestans*, a saliva de *P. megistus* causa inibição progressiva da amplitude do PAC, de maneira reversível, atuando de forma semelhante a um anestésico local. Nossos resultados obtidos com a saliva de *T. vitticeps*, são muito semelhantes ao descrito para a saliva de *T. infestans*, ou seja, possui uma atividade inibitória irreversível sobre a amplitude do PAC de nervo ciático de rato, mesmo após 30 minutos de lavagem. Como ocorre com os outros triatomíneos, a saliva do *T. vitticeps* deve inibir a geração do impulso nervoso e conseqüentemente, diminuir a percepção do hospedeiro à picada durante o processo de ingestão sanguínea.

Outra implicação da melhor exploração do recurso alimentar pelos triatomíneos seria quanto à dinâmica de dejeções e conseqüentemente, a transmissão do *T. cruzi*. Segundo Trumper & Gorla (1991), o momento da dejeção não só depende da espécie de triatomíneo como também da quantidade de sangue ingerido, uma vez que as espécies que fazem repastos sanguíneos maiores tendem a defecar mais rapidamente que aqueles que fazem repastos menores.

Em relação ao estudo comparativo do comportamento alimentar, os dados mostram que o *T. vitticeps* foi a espécie que necessitou um maior tempo para completar a repleção. Se comparado ao *T. infestans* esse valor é 2,3 vezes maior, ficando o *T. brasiliensis* intermediário. Em geral, a média do ganho de peso corresponde a 6,5; 4,7 e 4,8 vezes a média do peso inicial para *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*, respectivamente. Esse volume de sangue ingerido

foi suficiente para que 84%, 40% e 76% dos insetos (na mesma ordem) tivessem sucesso no processo de muda para o terceiro estágio. A quantidade mínima de sangue ingerido para realização da muda foi 26,2mg, 18,6mg e 13,6mg para *T. vitticeps*, *T. infestans* e *T. brasiliensis*.

Diotaiuti et al. (1995) mostram para ninfas de quarto estágio de *T. infestans* e *T. sordida* a ocorrência de dejeção durante ou imediatamente após o repasto em 90% e 86% dos insetos, respectivamente. Soares et al. (2000) em um estudo semelhante, encontrou 75%, 86% e 56% para ninfas de quarto, quinto e insetos adultos de *T. pseudomaculata*. Para *T. brasiliensis* os resultados foram 50%, 66% e 56%, para os respectivos estágios. Zeledón et al. (1977) dizem ainda que o número de dejeções durante os experimentos pode estar relacionado com o número de interrupções sofridas durante o repasto, como observado para *T. dimidiata*. Em nosso trabalho, a dejeção durante o repasto não foi observada para nenhuma das três espécies estudadas, mesmo após algumas interrupções terem sido observadas. O tempo que o inseto permanece em contato com a fonte alimentar, mesmo após o repasto, também é de grande importância. Quanto maior a exposição e o contato do inseto com o hospedeiro vertebrado, maiores serão as chances de percepção do inseto pelo hospedeiro. Quando comparamos a porcentagem de insetos que defecaram durante os 10 primeiros minutos após alimentação, tempo considerado por Zeledón (1975) de mais alto risco para transmissão do *T. cruzi*, 92% das ninfas de *T. infestans* haviam realizado pelo menos uma dejeção contra 84% para *T. brasiliensis* e 72% para *T. vitticeps*. Os resultados obtidos para *T. infestans* e *T. brasiliensis* apresentam certa similaridade aos apresentados por Zeledón et al. (1977), que encontraram para ninfas de 2º estágio de *T. infestans* 86,7%. Neste mesmo intervalo, o total de dejeções realizadas pelo *T. infestans* foi significativamente maior que o total de *T. vitticeps*. Quando os 60 minutos de observação pós-repasto são separados em intervalos de 10 minutos, o número médio de dejeções das ninfas de *T. vitticeps* também foi significativamente menor que as outras duas espécies.

Vários autores fazem uma correlação entre o volume de sangue ingerido e o tempo para dejeção (Trumper & Gorla 1991, Crocco & Catalá 1996, Nattero et al. 2002). Segundo Friend & Smith (1985) quando a quantidade de sangue ingerido é grande, os triatomíneos tendem a eliminar suas fezes mais rapidamente devido a grande quantidade de água presente no sangue. Entretanto, para o *T. vitticeps* esta relação não pode ser estabelecida, já que as ninfas dessa espécie foram as que mais se alimentaram (IIR=6,5) e as que menos defecaram (ID=0,96).

Dias (1956) observou uma grande variação no comportamento de dejeção de algumas espécies de triatomíneos da América do Sul. Naquela ocasião, *R. prolixus* se destacou pela velocidade de obtenção do alimento e eliminação das fezes, seguido pelo *T. infestans*. Apesar do autor não mencionar o estágio evolutivo das ninfas, o *T. vitticeps* foi considerado o mais lento dentre as seis espécies estudadas. Enquanto o *R. prolixus* gastou em média 14 minutos para sucção, foram necessários 27 minutos para *T. vitticeps*. Mais recentemente, Santos et al. (2006) fizeram um estudo comparativo entre adultos de *T. infestans* mantidos em laboratório e duas colônias de *T. vitticeps* (uma proveniente do ambiente silvestre e outra mantida em laboratório). Novamente o tempo médio para ingurgitamento do *T. infestans* (15,3 minutos) foi significativamente menor que o observado nos dois grupos de *T. vitticeps* (20,3 e 22,2 minutos, respectivamente). Quanto ao comportamento de dejeção, a média obtida para *T. infestans* foi 1,2 minutos contra 21,1 minutos para os exemplares de *T. vitticeps* mantidos em laboratório e 64,02 minutos para os insetos silvestres. Em geral o *T. infestans* foi a espécie mais rápida, tanto nos aspectos relacionados à alimentação quanto à dejeção. Inversamente encontra-se o *T. vitticeps*, ficando o *T. brasiliensis* em posição intermediária.

O estudo da fonte alimentar também tem importância significativa sob o ponto de vista epidemiológico. Nosso estudo revelou um amplo ecletismo alimentar dos exemplares de *T. vitticeps* estudados, sendo os roedores (30%) e aves (25%) as principais fontes de alimentação. Dias et al. (1989) concluem que o *T. vitticeps* não é um bom vetor baseados em um estudo das fontes alimentares, através da reação de precipitina, realizado em insetos capturados no Estado do Espírito Santo. Os insetos apresentaram 60,8% de infecção e uma acentuada antropofilia, com 89,2% de anti-soros reagindo para humanos e 65,3% para aves, levando os autores a reforçarem a hipótese de que a infecção se origina fora do ambiente domiciliar. Resultados semelhantes foram mostrados posteriormente por Gonçalves et al. (2000) na localidade de Triunfo (RJ), onde os tatus (30%) foram as principais fontes de alimentação, seguidos dos humanos e porcos (16%) e aves e cães (14%). Em menores proporções vieram cavalos, gambás, roedores e vacas. Ainda no Rio de Janeiro, município de Arcádia, Lorosa et al. (2003) demonstraram, também pela precipitina, a significativa participação dos homens (31,4%) como parte da dieta desse vetor, seguido dos roedores (24,35) e aves (20%). Os nossos resultados demonstraram que as aves juntamente com os roedores constituem as principais fontes de alimentação para

os *T. vitticeps* capturados em Itanhomi. Apesar de não ter sido realizado um estudo sobre a presença de roedores nas casas, a presença dos mesmos foi indiretamente verificada (fezes nas casas, relato dos moradores); além disso, os mesmos existem em abundância no ambiente silvestre próximo das UD's. Vale lembrar ainda que as aves (galinhas) correspondiam a 65,9% dos animais presentes durante a pesquisa de infestação do peridomicílio. Estes animais transitam pelo quintal, dormindo não apenas em galinheiros, mas nos porões das casas, nos currais, paióis, etc. Considerando a proximidade entre os ambientes e a disponibilidade destes animais, podemos supor que estes fatores contribuam para os resultados encontrados pela precipitina.

Outros animais domésticos também participam como fontes alimentares para o *T. vitticeps*, entre eles os cães (10%). Estes animais representaram 3,9% dos animais verificados pelo censo realizado durante as pesquisas de infestação do peridomicílio, ou uma média de 0,8 cão por casa, o que significa que quase todas as casas tinham um cachorro. Os cães são mencionados como hospedeiros importantes do *T. cruzi* em vários países do Continente Americano (Barretto et al. 1979), sendo na Argentina, caracterizado como principal reservatório doméstico (Wisnivesky-Colli et al. 1985, Cohen & Gurtler 2001). Desta forma possuem um importante papel epidemiológico para a doença de Chagas, uma vez que a infecção destes animais pode se constituir num elo entre o ciclo doméstico e silvestre da doença (Barretto 1963, Forattini 1982). Apesar da ausência de colonização, o encontro de sangue humano no tubo digestivo de *T. vitticeps* capturados no intradomicílio demonstra que o triatomíneo adulto que invade a casa se alimenta, e tem habilidade para fazer seu repasto sobre os moradores, sendo fundamental a manutenção de um sistema eficiente de vigilância entomológica.

Sobre o *T. cruzi*, estudos experimentais mostram uma grande diversidade intra-específica evidenciada por diferenças na morfologia de formas sanguíneas (Brener, 1965), virulência e patogenicidade (Tekiel et al. 1997), susceptibilidade a agentes quimioterápicos (Brener et al. 1976, Filardi & Brener 1987, Murta et al. 1998), constituição antigênica e propriedades bioquímicas (Bongertz & Dvorak 1983, Zingales et al. 1984), propriedades imunológicas (Braga et al. 1993) e infectividade em células hospedeiras (Doyle et al. 1984).

Para a classificação das cepas do *T. cruzi* seja por isoenzimas ou por marcadores de DNA, necessita-se de grandes quantidades de amostras do parasito. Para isso, é necessário o isolamento da cepa do hospedeiro, o que nem

sempre é possível. Além disso, o ressurgimento de casos de infecção aguda e a ocorrência de surtos de infecção oral pelo *T. cruzi* mostram a necessidade de métodos mais sensíveis e rápidos de diagnóstico da doença. Baseado nisso, Liarte (2006) buscou identificar marcadores moleculares sensíveis e específicos, que permitam classificar as cepas do parasito quanto aos grupos principais TcI e TcII.

A PCR multiplex utilizada é bastante sensível quando comparada a outras técnicas de diagnóstico molecular (Liarte, 2006). Utilizando amostras de DNA genômico do *T. cruzi*, é possível amplificar o DNA satélite do parasito a partir de 10 fg de DNA, que correspondem a aproximadamente 1/30 do DNA de um parasito. A tipagem feita por meio do rDNA e genes do mini-exon necessita de maiores concentrações de DNA, em torno de 100 pg. Esse valor é aproximadamente 10.000 vezes maior comparado com o sistema multiplex (10 fg). Um outro ponto importante é que o cultivo dos parasitos em meio LIT para obtenção de maior quantidade de material, pode selecionar uma determinada população do parasito, não refletindo mais a heterogeneidade populacional original (Veloso et al. 2005).

Outra grande vantagem que a metodologia permite é utilizar amostras de sangue e fezes de triatomíneos conservadas em papel de filtro para fazer a extração do DNA. Isso significa facilidade de coleta e manuseio da amostra no campo e principalmente na simplicidade do método de extração, que economiza tempo e custo.

Uma desvantagem da PCR multiplex utilizando os primers Diaz 7, Diaz 8 e Tsat 4 é que esta não é capaz de discriminar infecções mistas de cepas de TcI e TcII. Neste caso, o perfil eletroforético da PCR seria semelhante a cepas TcII. Esta limitação também ocorre com outras reações de PCR para diagnóstico e classificação das cepas (Vargas et al. 2000, Chiurillo et al. 2003, Yeo et al. 2006). Entretanto, como nosso objetivo era estudar a dinâmica de populações do parasita nos diferentes ambientes, a técnica não interfere em nossas análises. Além disso, as amostras com perfil eletroforético TcI, sabidamente não apresentam infecções mistas entre TcI e TcII, sendo possível desta forma estimar a prevalência de TcII e a prevalência mínima de TcI mesmo na ocorrência de infecções mistas dos dois grupos.

A prevalência de TcI foi de 88,2% enquanto TcII foi de 11,7% nos triatomíneos estudados. No Brasil o TcI foi originalmente descrito no ciclo silvestre enquanto o TcII predomina no ciclo de transmissão doméstico. Além

disso, há uma intensa discussão sobre diferenças na patogenia causadas por estes dois grandes grupos. Já foi visto que TcII produz maior número de lesões e, conseqüentemente, maior mortalidade que as cepas TcI (Risso et al. 2004). Apesar de não ter sido possível a visualização de parasitos circulantes no sangue de camundongos inoculados com cepas TcI, a infecção foi evidenciada através de hemocultura e sorologia. Tendo em vista a baixa prevalência de infecção humana nas áreas de ocorrência do *T. vitticeps*, e considerando os resultados apresentados, estudos posteriores para a determinação da infectividade, virulência e patogenicidade das cepas de *T. cruzi* carregadas pelo *T. vitticeps* são necessários.

Uma espécie animal é definida como reservatório quando ela se torna essencial para a manutenção de um determinado parasita, em um ecossistema específico (Ashford, 1996). Nossos resultados de precipitina demonstram uma participação efetiva (30%) de roedores no ciclo alimentar do *T. vitticeps*, nos levando a crer que estes mamíferos sinantrópicos estariam associados ao *T. vitticeps* e aos ecótopos naturais desta espécie. Entretanto, o estudo de 266 amostras de sangue de roedores, preservados em papel filtro e analisados pela multiplex PCR, não apresentaram nenhum resultado positivo para a presença de *T. cruzi*. Este resultado é reforçado ainda pela ausência de xenodiagnósticos positivos, apesar do número relativamente pequeno (16 exemplares de roedores), de modo que, na área estudada, estes mamíferos não funcionam como reservatórios potenciais para o ciclo de transmissão deste parasita, sinalizando que outros reservatórios devam estar envolvidos.

A importância epidemiológica do gênero *Didelphis* na transmissão da doença de Chagas, deve-se principalmente: à sua extensa distribuição geográfica, índices de infecção pelo *T. cruzi* relativamente altos, parasitemia patente com longa duração e por serem freqüentes visitantes de áreas domiciliares (Fernandes et al. 1994). Já que as análises de precipitina mostram que os gambás (7%) participam como fontes de alimentação para o *T. vitticeps*, é possível que os ninhos desse hospedeiro funcionem como ecótopos naturais para o vetor e principalmente, atuem como reservatórios silvestres para o *T. cruzi*. Herrera et al. (2005) realizaram um estudo de prevalência de infecção pelo *T. cruzi* em diferentes espécies de mamíferos no Parque Nacional da Serra da Capivara, Piauí, Brasil. Nesta ocasião, *Trichomys apereoides* foi a espécie mais abundante (80%). Entretanto, coube aos espécimes de *Didelphis albiventris* o maior índice de infecção (61%), com parasitos caracterizados como TcI e TcII. A

partir da caracterização de cepas isoladas em vetores, hospedeiros vertebrados, e análise de dados históricos no Paraguai, Yeo et al. (2005) propõem que os gambás sejam os hospedeiros naturais para o TcI e os tatus os hospedeiros naturais do TcII. Na Ilha de Jaguanum, Rio de Janeiro, o índice de infecção dos *D. marsupialis* capturados foi de 90%, correspondentes à linhagem 2 do parasito (Fernandes et al. 1999).

Como mencionado anteriormente, nossos resultados sobre a caracterização das cepas de *T. cruzi* veiculadas pelos espécimes de *T. vitticeps*, nos ambientes artificiais e silvestres, revelam uma infecção com ambos os grupos de parasitos: *T. cruzi* I (88%) e *T. cruzi* II (12%), indicando uma sobreposição dos ciclos de transmissão da doença de Chagas. Visto que a colonização não é eficiente e que existe trânsito de *T. vitticeps* entre os três ambientes, é possível que esteja ocorrendo o retorno do parasito do ciclo de transmissão doméstico para o silvestre ou, a infecção natural de reservatórios silvestres com *T. cruzi* II.

Nos últimos anos vários estudos têm mostrado a ocorrência de infecção natural de várias espécies de primatas não humanos por protozoários do gênero *Trypanosoma*. As espécies de macacos mais associados à infecção por tripanosomatídeos pertencem às famílias Callitrichidae (micos e sagüis), Cebidae (macaco esquilo e capuchinhos), Aotidae (macacos da noite) e Atelidae (macaco aranha e macaco vibrador) (Deane et al. 1972, Sousa et al. 1974, Marinkelle 1976, Lanham et al. 1984, D'Alessandro et al. 1986, Ziccardi et al. 2000, Lisboa et al. 2006, 2007, Maia da Silva et al. 2008). Deane et al. 1972, através de xenodiagnóstico, encontrou *T. cruzi* infectando sagüis da espécie *Callithrix jacchus* no Estado da Bahia. Outros estudos realizados nos municípios de Manaus e de Atalaia do Norte, Brasil, identificaram macacos das espécies *Alouatta seniculus straminea* (guariba-vermelho), *Chiropotes satanas chiropotes* (Cuxiu), *Pithecia pithecia* (parauacu) e *Callicebus torquatus torquatus* (zogue-zogue) infectados pelo *Trypanosoma lambrechtii* (Deane et al. 1970). Foi identificado também *T. cruzi* infectando mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*) na reserva biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brasil (Lisboa et al. 2000), neste caso com padrões tipo Z1 e também Z2 do parasita. Posteriormente, verificou-se a infecção de sagüis na Amazônia e novamente de região da Mata Atlântica, em altas prevalências, sendo caracterizados parasitas do grupo TcI, TcII e infecções mistas, demonstrando a ocorrência natural do TcII no ambiente natural, e sugerindo importante papel destes reservatórios na manutenção do parasita na natureza (Lisboa et al. 2006, Monteiro et al. 2006). No município de

Silva Jardim, Rio de Janeiro, os primatas foram os reservatórios mais importantes apresentando uma taxa de infecção de 20% (35/172), correspondentes à linhagem 1 de *T. cruzi* (Fernandes et al. 1999). Neste mesmo trabalho os autores sugerem a partir de um exemplar de *T. vitticeps* capturado no município, que este vetor está envolvido com o ciclo de transmissão dos primatas, já que o tripanosoma caracterizado também pertencia à linhagem 1 e que os marsupiais seriam os principais reservatórios para a linhagem 2 do parasito. Mais ainda, os autores discutem a possibilidade de diferentes espécies animais atuarem como filtros, selecionando determinado genótipo do parasito.

De modo geral, fica claro que o *T. vitticeps* é uma espécie com características peculiares, onde o risco de transmissão não parece estar relacionado à ocorrência de colônias intradomiciliares, mas à convivência dos moradores com a alta frequência de insetos infectados que invadem as casas. Aparentemente esta convivência não resulta na transmissão do *T. cruzi* ao homem, uma vez que a prevalência da doença de Chagas em Itanhomi é muito baixa (Camargo et al. 1984). A ambigüidade entre a alta taxa de infecção dos vetores e a baixa prevalência de infecção humana, pode ter várias causas, entre elas, a dificuldade de obtenção de sangue por estes vetores, um longo intervalo entre o processo de alimentação e dejeção e ainda a características das cepas de *T. cruzi* que circulam no ambiente entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados. Entretanto, não se pode ignorar a ocorrência deste triatomíneo nas casas. A vigilância epidemiológica é um fator de grande importância nesta circunstância, antecipando-se à possibilidade de mudanças comportamentais do *T. vitticeps* que possam significar futuro risco de transmissão da doença de Chagas para a população.

## **VI – CONCLUSÕES**

---

- Na região estudada, apesar de as taxas de infestação e da densidade triatomínica intradomiciliar serem muito baixas, a ocorrência do encontro de triatomíneos dentro das casas, a alta taxa de infecção pelo *T. cruzi* e o estreito relacionamento com o ciclo silvestre caracteriza-se, para o *T. vitticeps*, uma situação que demanda atenção e controle;
- As amostras de *T. vitticeps* provenientes do ambiente artificial e silvestre não apresentaram variabilidade genética quando analisadas pela morfometria, RAPD e isoenzimas, evidenciando um intenso intercâmbio entre os ambientes, e mostrando a presença de uma única população de insetos que invade frequentemente o domicílio humano, sem colonizar;
- A saliva de *T. vitticeps* atua nas fibras nervosas inibindo de forma gradual e irreversível a amplitude do Potencial de Ação Composto, o que deverá fazer com que a picada seja menos perceptível;
- A fonte alimentar interferiu principalmente na frequência de contrações da bomba cibarial, sendo este o principal fator que influenciou na taxa de ingestão nos dois hospedeiros estudados;
- Provavelmente a limitação do *T. vitticeps* para adaptar-se ao ambiente intradomiciliar esteja também relacionada à sua dificuldade para obtenção do repasto, uma vez que a espécie necessita maior tempo para alimentar-se.
- Em relação ao *T. infestans* e *T. brasiliensis*, o *T. vitticeps* é a espécie que demanda maior tempo para eliminação das dejeções, apesar do maior volume de sangue ingerido;
- Apesar disso (conclusão anterior), a reação de precipitina demonstrou a habilidade do triatomíneo alimentar-se de sangue humano, o que não descarta definitivamente a espécie como vetor potencial do *T. cruzi* para o homem;
- Fora o contato com o homem, o *T. vitticeps* também se alimenta do sangue de cães, o que poderia conferir-lhe importância na manutenção do ciclo peridomiciliar do *T. cruzi*;

- A ocorrência do *T. vitticeps* está intimamente relacionada aos fatores ambientais de precipitação e temperatura;
- A umidade relativa afeta a eclosão dos ovos de *T. vitticeps*, que é diminuída em umidades baixas e favorecida pelas umidades mais altas. Além disso, as ninfas dessa espécie quando recém alimentadas, permanecem em umidades relativas baixas com o aumento do jejum, este comportamento muda, e as ninfas preferem umidades altas;
- As amostras de *T. cruzi* caracterizadas pela PCR Multiplex demonstram uma alta prevalência de TcI (88,2%) e uma proporção menor de TcII;
- Apesar da hemocultura e citometria de fluxo comprovarem a infecção experimental de camundongos com a cepa TcI, a adaptação deste parasita ao hospedeiro parece ter algumas limitações, pois a parasitemia permaneceu subpatente, exceto quando a infecção se procedeu em camundongos INF- $\gamma$  knockout. O mesmo não ocorre com a cepa TcII;
- Apesar da grande prevalência de roedores em Itanhomi, estes não constituem fonte importante de infecção para os triatomíneos, já que não foi detectado DNA do parasita nas amostras testadas pela PCR multiplex;
- A ocorrência de TcII em triatomíneos silvestres revela a participação desta linhagem do parasita no local, o que poderá ter importância em processos de evolução e adaptação parasita/hospedeiro que merecem aprofundamento;

## VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abderrazak SB, Guerrini F, Mathieu-Daudé F, Truc P, Neubauer K, Lewika K, Barnabé C, Tibayrenc M. Isoenzyme eletroforesis for parasite characterization. In: John E, *Methods in Molecular Biology, Protocols in Molecular Parasitology*. Totowa, N.J.: hyde Co. Humana Press. Inc., p.361-381. 1993.
- Almeida EAB. Diversidade e estrutura genética de populações de duas espécies de Euglossini (Hymenoptera: Apidae) em florestas fragmentadas na região metropolitana de Belo Horizonte, MG [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2002.
- Alves CL. Estudo comparativo da ação da saliva de triatomíneos Heteroptera: Reduviidae) e do predador *Belostoma anurum* (Heteroptera: Belostomatidae) sobre as preparações de nervo isolado de *Rattus norvegicus* e de vaso dorsal de *Rhodnius prolixus* [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.
- Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 429-432. 1999.
- Apostol BL, Black IV WC, Reiter P, Miller BR. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325-334. 1996.
- Araújo CAC, Mello CB, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* I e *Trypanosoma cruzi* II: recognition of sugar structures by *Arachis hypogaea* (peanut agglutinin) lectin. *J Parasitol*, 88: 582-586. 2002.
- Araújo MSS, Martins-Filho OA, Pereira MES, Brener Z. A combination of benzonidazole and ketoconazole enhanced efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' Disease. *J Antimicrob Chemother*, 45: 819-824. 2000.
- Araújo RN, Soares A, Paim RM, Gontijo NF, Gontijo AF, Lehane MJ, Pereira MH. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae; Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol*, (article in press). 2008.
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Derm*, 14: 523-532. 1996.
- Barbosa SE. Biosistemática de três diferentes populações brasileiras de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 1998.
- Barbosa SE. Biosistemática e Biogeografia de populações de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) no Brasil [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2004.
- Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RCM, Paula ASP, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti L. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. *Acta Trop*, 99: 144-154. 2006.
- Barbosa SE, Dujardin JP, Soares RPP, Pires HHR, Margonari C, Romanha AJ, Panzera F, Linardi PM, Duque-de-Melo M, Pimenta PFP, Pereira MH, Diotaiuti L. Interpopulation variability among *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) from Brazil. *J Med Entomol*, 40: 144-420. 2003.
- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*, 120: 513-526. 2000.

- Barreto MP. Reservatórios e vetores do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. *Rev Goiana Med*, 9: 38-75. 1963.
- Barretto MP, Ribeiro RD, Rocha GM. Forest reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LXXVIII. Geographical distribution of triatomids in the Paranaíba River valley, Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 32: 1-8. 1979.
- Barros G, Mayrink W, Salgado AA, Barros RC, Sessa PA. Contribuição para o conhecimento da doença de Chagas autóctone no estado do Espírito Santo. *Rev Inst Med Trop*, 17: 319-329. 1975.
- Bennet-Clark HC. Negative pressures produced in the pharyngeal pump of the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol*, 40: 223-229. 1963.
- Bongertz V, Dvorak JA. *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned ticks. *Am J Trop Med Hyg*, 32 (4): 716-722. 1983.
- Borges EC, Dujardin JP, Romanha AJ, Diotaiuti L. Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera:Reduviidae) populations. *J Med Entomol*, 37: 872-877. 2000.
- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera:Reduviidae) in Ceará State, Northeastern Brazil. *Acta Trop*, 93: 119-126. 2005.
- Borges EC, Pires HHE, Barbosa SE, Nunes CMS, Pereira MH, Romanha AJ, Diotaiuti L. Genetic Variability in brazilian triatomines and the risk of domiciliation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(suppl.I): 371-373. 1999.
- Bosseno MF, Barnabé C, Gastélum EM, kasten FL, Ramsey J, Espinoza B, Brenière SJ. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol*, 40: 627-632. 2002.
- Bowland AE, Bishop KS, Taylor PJ, Lamb J, van der Bank FH, van Wyk E, York D. Estimation and management of genetic diversity in small populations of plains zebra (*Equus quagga*) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Biochem Syst Ecol*, 29: 563-583. 2001.
- Braga EM, Galvão LM, Chiari E, Martins MS. Difference in susceptibility to lysis between clones of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 88(4): 529-534. 1993.
- Brener Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol*, 59: 19-26. 1965.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*, 27: 240-247. 1973.
- Brener Z. *Trypanosoma cruzi*: Taxonomy, Morphology and life cycle. In: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A, *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): It's Impact on Transfusion and Clinical Medicine*, São Paulo, Brazil. p. 13-30. 1992.
- Brener Z, Costa CA, Chiari E. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Rev Inst Med Trop*, 18: 450-455. 1976.
- Brise S, Barnabé C, Tibyrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*, 30: 35-44. 2000.

- Brisse S, Verhoef J, Tibyrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol*, 31: 1218-1226. 2001.
- Bronfem E, Rocha FSA, Machado GBN, Perillo MM, Romanha AJ, Chiari E. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84(2): 237-240. 1989.
- Calderón CI, Dorn PL, Melgar S, Chávez JJ, Rodas A, Rosales R, Monroy CM. A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. *J Med Entomol*, 41: 882-887. 2004.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop*, 6: 93-100. 1964.
- Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev Inst Med Trop*, 26: 192-204. 1984.
- Carbajal de La Fuente AL, Porcasi X, Noireau F, Diotaiuti L, Gorla D. The association between the geographic distribution of *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera:Reduviidae) with environmental variables recorded by remote sensors. *Infect Genet Evol.* (article in press). 2008.
- Carvalho O, Caldeira RL, Simpson AJG, Vidigal THDA. Genetic variability and molecular identification of Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae). *Parasitology*, 123: 197-209. 2001.
- Casini CE, Dujardin JP, Martinez M, Bentos-Pereira A, Salvatella R. Morphometric differentiation between two geographic populations of *Triatoma infestans* in Uruguay. *Res Rev Parasitol*, 55(1): 25-30. 1995.
- Chiari E, Camargo EP. Culture and cloning of *Trypanosoma cruzi*. In: Morel CM, *Genes and Antigens of Parasites, A laboratory Manual*. Fundação Oswaldo Cruz, World Health Organization, Rio de Janeiro, pp. 23-26. 1984.
- Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, Anez N, Ramirez JL. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10(5): 775-779. 2003.
- Clark N. The effect of temperature and humidity upon the eggs of the bug *Rhodnius prolixus* (Heteroptera, Reduviidae). *J Anim Ecol*, 4: 82-87. 1935.
- Cohen J, Gurtler R. Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science*, 299: 694-698. 2001.
- Cooper ML. Random amplified polymorphic DNA analysis of southern brown bandicoot (*Isodon obesulus*) populations in Western Austrália reveals genetic differentiation related to environmental variables. *Mol Ecol*, 9: 469-479. 2000.
- Corrêa RR. Informe sobre a doença de Chagas no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 20: 39-81. 1986.
- Costa FS. Estudo comparativo do comportamento alimentar em diferentes hospedeiros e de componentes bioativos da saliva de *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758 e *Cimex hemipterus* (Fabricius, 1803) (Hemiptera, Cimicidae) [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.

- Crocco LB, Catalá SS. feeding and defaecation patterns in *Triatoma sordida*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91: 409-413. 1996.
- Cruz JS, Cotta G, Diniz CR, Beirão PSL. Partial purification and pharmacological characterization of a neurotoxic fraction isolated from the venom of the spider *Lycosa erythrognatha*. *Braz J Med Biol Res*, 27: 2653-59. 1994.
- D'Alessandro A, Eberhard M, de Hincapie O, Halsted S. *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in *Saimirisciureus* from Bolívia and *Saguinus mistax* from Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 35: 285-289. 1986.
- Dambach M, Goehlen B. Aggregation density and longevity correlate with humidity in first-instar nymphs of the cockroach (*Blattella germanica* L., Dictyoptera). *J Insect Physiol*, 45: 423-429. 1999.
- Dan A, Pereira MH, Pesqueiro JL, Diotaiuti L, Beirão OS. Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *J Med Entomol*, 36: 875-879. 1999.
- Deane LM, Almeida FB, Neto JAF, da Silva JE. *Trypanosoma cruzi* e outros trypanosomas em primatas brasileiros. *Rev Soc Bras Med Trop*, 6: 361. 1972.
- Deane LM, Batista D, Ferreira Neto JA, Souza H. Tripanosomídeos de mamíferos da região Amazônica *Trypanosoma lambrechtii* Marikelle, 1968, em macacos do Estado da Amazonas, Brasil. *Rev Inst Med Trop*, 12: 1-7. 1970.
- Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98: 1-12. 2003.
- Dias E. Observação sobre eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sulamericanos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 54: 115-124. 1956.
- Dias JCP. Doença de Chagas em Bambuí Minas Gerais, Brasil. Estudo clínico epidemiológico a partir da fase aguda entre 1940 e 1982 [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 1982.
- Dias JCP. Doença de Chagas. Ambiente, participação e Estado. *Cad Saude Publica*, 17(suppl): 165-169. 2001.
- Dias JCP. O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa internacional. In: AC Silveira, 1991/2001, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, p.155-222. 2002.
- Dias JCP. Doença de Chagas: Sucessos e desafios. *Cad Saude Publica*, 22: 2020-2021. 2006.
- Dias JCP, Borges Dias R. Aspectos sociais, econômicos e culturais da doença de Chagas. *Cienc Cult*, 31(suppl.): 105-117. 1979.
- Dias JCP, Coura JR. Epidemiologia. In: Dias JCP, Coura JR, *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Um manual prático para o clínico geral*. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, p. 33-36. 1997.
- Dias JCP, Feitosa VR, Ferras Filho A, Rodrigues VLC, Alencar SA, Sessa PA. Fonte alimentar e potencial vetorial do *Triatoma vitticeps* com relação a doença de Chagas Humana no estado do Espírito Santo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84: 165-173. 1989.
- Dias Neto E. The use of RAPDs for the study of the genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*. *State Sci*, p. 339-345. 1993.

- Dice LR. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26: 297-302. 1945.
- Diotaiuti L. Triatomíneos. In: *Doença de Chagas e Evolução*, Teixeira A, Editora Universidade de Brasília: Finatec, Brasília. p. 205-231, 2007
- Diotaiuti L, Bronfen E, Perilo MM, Machado GBN, Loiola Cf. Aspectos do comportamento biológico do *Triatoma vitticeps* na transmissão da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*, 20(suppl.): 87. 1987.
- Diotaiuti L, Penido CM, Pires HHR, Dias JCP. Dinâmica da alimentação do *Triatoma sordida*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 28: 195-198. 1995.
- Doyle PS, Dvorak JA, Engel JC. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of clones derived from various sources. *J Protozool*, 31: 280-83. 1984.
- Dórea RCC, Póvoa MM, Miles MA, Souza AAA, Brata JM. Eletroforese de enzimas para estudos de triatomíneos com referência espacial a subpopulações de *Panstrongylus megistus*. *Rev Bras Biol*, 42: 205-215. 1982.
- Dorn PL, Melgar S, Rouzier V, Gutierrez A, Combe C, Rosales R, Rodas A, Kott S, Salvia D, Monroy CM. The Chagas vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmitic within and among adjacent villages in Guatemala. *J Med Entomol*, 40: 436-440. 2003.
- Dujardin JP. Morphometry. In: *Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*. Equador, p. 45-46. 1996.
- Dujardin JP, Bermudez H, Casini C, Schofield CJ, Tibayrenc M. Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol*, 34(5): 544-551. 1995.
- Dujardin JP, Bermudez C, Schofield CJ. The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *Acta Trop*, 66: 145-153. 1997.
- Dujardin JP, Forgues G, Torrez M, Martinez E, Cordobas C, Gianella A. Morphometrics of domestic *Panstrongylus rufotuberculatos* in Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol*, 92(2): 219-228. 1998a.
- Dujardin JP, Schofield CJ, Tibayrenc M. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Med Vet Entomol*, 12: 20-29. 1998b.
- Dujardin JP, Steinden M, Chaves T, Machane M, Schofield CJ. Changes in the sexual dimorphism of triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 565-569. 1999.
- Dujardin JP, Tibayrenc M. Etudes isoenzymatiques du vecteur principal de la maladie de Chagas: *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann Soc Belge Med Trop*, 65(suppl.1): 165-169. 1985.
- Dujardin JP, Tibayrenc M, Venegas E, Maldonado L, Desjeux P, Ayala FJ. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol*, 24: 40-45. 1987.
- Fernandes AJ, Luz ZMP, Vitor RWA, Diotaiuti L, Chiari E. Possibilidade de autocura em gambá (*Didelphis albiventris*) naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*, 36: 471-473. 1994.

- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro State (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of mini-exon gene. *Parasitology*, 118: 161-166. 1999.
- Ferreira E, Souza PSA, Filho MF, Rocha I. Nota sobre a distribuição geográfica do *Triatoma vitticeps* Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) no estado do Rio de Janeiro Brasil, *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 38: 11-14. 1986.
- Ferreira ME, Grattapaglia D. Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. 3ª ed. Embrapa, Brasília, DF. 1998.
- Filardi LS Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81: 755-759. 1987.
- Forattini OP, Barata JMS, Dellatorre CC, Buralli GM. Notas sobre domiciliação de *Panstrongylus mesgistus* no litoral sul do estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saude Publica*, 16: 127-131. 1982.
- Friend WG, Smith JJB. Feeding in *Rhodnius prolixus*: mouthpart activity and salivation, and their correlation with changes of electrical resistance. *J Insect Physiol*, 17: 233-243. 1971.
- Friend WG, Smith JJB. Factores biológicos y ecológicos em la enfermedad de Chagas. In: RU Carcavallo, JE Rabinovich, RJ Tonn, *Epidemiologia y Vetores*, Centro Panamericano de Ecologia Humana y Salud OPS, OMS, Argentina, p. 55-72. 1985.
- FUNASA, Coordenação de Minas Gerais. Setor de Estatística, relatórios anuais do período de 1990 a 1999.
- Garcia AI, Carrasco HJ, Schofield CJ, Stothard 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*, 35:138-45. 1998.
- Garcia BA, Barata JML, Blanco A. Enzyme polymorphism among *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies. *J Med Entomol*, 32(2): 126-133. 1995.
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzales MS, Azambuja P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*- *Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol*, 53: 11-21. 2007.
- Gonçalves TCM, Oliveira E, Dias LS, Almeida MD, Nogueira WO, Pires FDA. An investigation on the Ecology of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(6): 711-717. 1998.
- Gonçalves TCM, Rocha DS, Cunha RA. Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Saude Publica*, 34: 348-352. 2000.
- Gonçalves TCM, Victório VMN, Juberg J, Cunha V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera, Reduviidae: Triatominae). I-Ciclo Evolutivo. *Mem Inst Osw Cruz*, 83(4) 519-523. 1988.
- Gonçalves TCM, Victório VMN, Juberg J, Cunha V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). II- Resistência ao Jejum. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84(1) 131-134. 1989.

- Gorla DE, Dujardin JP, Schofield CJ. Biosystematics of Old World Triatominae. *Acta Trop*, 63: 127-140. 1997.
- Gorla DE. Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Ecología Austral*, 12: 117-127. 2002.
- Grosberg RK, Levitan DR, Cameron BB. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: A random primer for the nervous and novice. In: *Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols*. John Wiley and Sons, New York. p. 67-100. 1996.
- Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH. Comparison of feeding behavior of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* in different hosts by electronic monitoring of the cibarial pump. *J Insect Physiol*, 46: 1121-1127. 2000.
- Guarneri AA, Diotaiuti L, Gontijo NF, Gontijo AF, Pereira MH. Blood-feeding performance of nymphs and adults of *Triatoma brasiliensis* on human hosts. *Acta Trop*, 87: 361-370. 2003.
- Guarneri AA, Lazzari CR, Diotaiuti L, Lorenzo MG. The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiol Entomol*, 27: 142-147. 2002.
- Guillaumin M. Étude biométrique des populations naturelles de *P. carlivae* Rbr et *P. ciasii* Rbr (Lep. Hesperidae). I. Estimation du taux de chevauchement des distributions statistiques de deux populations en relation avec la notion de distance taxonomique. *Arch Zool Exp Gen*, 115: 505-548. 1972.
- Harry M, Moreno G, Goyffon M. Genetic variability in populations of *Rhodnius prolixus*, vector of Chagas disease in Venezuela. *J Evol Biol*, 6: 175-194. 1992.
- Hellmann K, Hawkins RI. Prolixin-S and prolixin-G, two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature*, 207: 265-267. 1965.
- Henriksson J, Porcel B, Rydaker M, Ruiz A, Sabaj V, Galanti N, Cazzulo JJ, Frasch C, Pettersson U. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 73: 63-74. 1995.
- Herrera C, Barges MD, Fajardo A, Montila M, Triana O, Vallejo GA, Guhl F. *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the Park "Serra da Capivara" and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99: 379-388. 2005.
- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Gen Evol*, 7: 535-539. 2007.
- Hijmans RJ, Cameron Se, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Inter Jour of Climatology*, 25: 1965-1978. 2005.
- Jaramillo C, Montana MF, Castro LR, Vallejo GA, Guhl F. Differentiation and genetic analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD amplification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96: 1043-1048. 2001.
- Jaramillo NO, Castillo D, Wolf ME. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97: 667-673. 2002.

- Jannotti-Passos Lk, Magalhães kG, Carvalho OS, Vidigal THDA. Multiplex PCR for both identification of brazilian *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) and diagnosis of infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae). *J Parasitol*, 92: 401-403. 2006.
- Jannotti-Passos Lk, Vidigal THDA, Dias-Neto E, Pena SDJ, Simpson AJG, Dutra WO, Souza CP, Carvalho-Parra JF. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *J Parasitol*, 83: 395-399. 1997.
- Jean-Michel Bérenger and Denis Blanchet. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102: 733-736. 2007.
- Kingsolver JG, Daniel TL. Mechanics of food handling by fluid-feeding insects. In: Chamman RF, De Boer G, *Regulatory mechanisms in Insect Feeding*, Chapman & Hall, p. 32-73. 1995.
- Kirchhoff LV, Weiss LM, Wittner M, Tanowitz HB. Parasitic Diseases of the Heart. *Front Biosci*, 9: 706-723. 2004.
- Lana M, Pinto AS, Barnabé C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*, 89: 1-6. 1998.
- Lanham SM, Miles MA, Souza AA, Povia MM. Anion-exchange separation for neotropical trypanosomes: a preliminary trial and a description of *Trypanosoma devei* from the tamarim *Saguinus midas niger*. *Z Parasitenkd*, 70: 311-319. 1984.
- Lehane MJ. *Biology of blood-sucking insects*. Harper Collins Academic, London, 288 pp. 1991.
- Lavoipierre MMJ, Dickerson G, Gordon RM. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I - The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. *Ann Trop Med Parasit*, 53: 235-252. 1959.
- Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist*, 163: 127-520. 1979.
- Liarte DB. Desenvolvimento de uma PCR multiplex capaz de detectar e classificar cepas de *Trypanosoma cruzi* em amostras clínicas e de campo. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa René Rachou/FIOCRUZ [tese]. 107p. 2006.
- Lisboa CV, Dietz J, Baker AJ, Russel NN, Jansem AM. *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the reserva biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95: 445-452. 2000.
- Lisboa CV, Mangia RH, Luz SL, Kluczkovski Jr A, Ferreira LF, Ribeiro CT, Fernandes O, Jansem AM. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. *Parasitology*, 133: 603-611. 2006.
- Lisboa CV, Pinho AP, Monteiro RV, Jansem AM. *Trypanosoma cruzi* (kinetoplastida Trypanosomatidae): biological heterogeneity in the isolates derived from wild hosts. *Exp Parasitol*, 116: 150-155. 2007.
- Lopez G, Moreno J. Genetic variability and differentiation between populations of *Rhodnius prolixus* and *R. pallescens*, vectors of Chagas'disease in Colômbia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 90(3): 353-357. 1995.

- Lorosa ES, Valente MVM, Cunha V, Lent H, Jurberg J. Foco de doença de Chagas em Arcádia, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(7): 885-887. 2003.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 5: 150-163. 2004.
- Kutchai HC. Geração e Condução dos Potenciais de Ação. In: Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. *Fisiologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 3, p. 29-41. 2000.
- Macedo AM, Martins MS, Chiari E, Pena SD. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. *Mol Biochem Parasitol*, 55: 147-153. 1992.
- Machado EM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC. 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(6): 863-866. 2000.
- Maia da Silva F, Naiff RD, Marcili A, Gordo M, D’Affonseca Neto JA, Naiff ME, Franco AMR, Campaner M, Valente V, Valente AS, Camargo EP, Teixeira MMG, Miles MA. Infection rates and genotypes of *Trypanosoma rangeli* and *T. cruzi* infecting free-ranging *Sauis bicolor* (Callitrichidae), a critically endangered primate of the Amazon Rainforest. *Acta Trop*, 107: 168-173. 2008.
- Mamuris Z, Stamatis C, Triantaphyllidis C. Intraspecific genetic variation of striped red mullet (*Mullus surmuletus*) in the Mediterranean Sea assessed by allozyme and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Heredity*, 83: 30-38. 1999.
- Marinkelle CJ. The biology of the trypanosomes of non-human primates. In: Lumsden WHR, Evans DA, *The Biology of kinetoplastid*. Academic Press, New York, p. 217-256. 1976.
- Martins-Filho OA, Pereira MES, Carvalho JF, Brener Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas’ disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2: 569-573. 1995.
- Miles MA, Souza AA, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*, 272: 819-821. 1978.
- Miles MA, Lanhan SM, De Souza AA, Pova DG. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74: 221-242. 1980.
- Monteiro RV, Baldez J, Baker A, Lisboa Cv, Jansen AM. Clinical, biochemical, and electrocardiographic aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in free-ranging golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*). *J Med Primatol*, 35: 48-55. 2006.
- Moreira CJC, Spata MCD. Dynamics of Evolution and resistance in Starvation of *Triatoma vitticeps* (Stal 1859) (Reduviidae: Triatominae), submitted to two different regimes of food deprivation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97: 1049-1055. 2002.
- Morel CM, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 7: 6810-6814. 1980.

- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol*, 155: 335-350. 1987.
- Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benzonidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol*, 93: 203-214. 1998.
- Nattero J, Crocco LB, Rodrigues C. Feeding and defecation behavior of *Triatoma patagonica* (Del Ponte, 1929) (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 7: 1063-1065. 2002.
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590. 1978.
- Noireau F, Flores R, Vargas F. Trapping sylvatic Triatominae (Reduviidae) in hollow trees. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93: 13-14. 1999a.
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Vargas F. Triatominae en Bolívia: Importância actual de los vetores. In: *Chagas La Enfermedad en Bolívia – Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002)*, Ediciones Gráficas "É.G" La Paz – Bolívia, p. 125-126. 1999b.
- Noeske-Jungblut C, Kratzchmar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P, Schleuning WD. Na inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J Biol Chem*, 269: 5050-5053. 1994.
- O'Connor O, Bosseno MF, Barnabé C, Dourezy EJP, Brenière SF. Genetic clustering of *Trypanosoma cruzi* I lineage evidenced by intergenic minixon gene sequencing. *Infect Gen Evol*, 7: 587-593. 2007.
- Oliveira MA, Souza RCM, Diotaiuti L. Redescription of the genus *Cavernicola* and the tribe Cavernicolini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), with morphological and morphometric parameters. *Zootaxa*, 1457: 57-68. 2007.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SD. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(7): 3776-3780. 1998.
- Organización Mundial de la Salud. Control de la Enfermedad de Chagas. Ginebra: OMS; 102p. [Serie de informes técnicos, 811]. 1991.
- Ostfeld RS, Glass GE, Keesing F. Spatial Epidemiology: an emerging (or reemerging) discipline. *Trends Ecol Evol*, 20: 328-336. 2005.
- Pacheco RS, Brito CMM, Sarquis O Pires MQ, Borges-Pereira J, Lima MM. Genetic heterogeneity in *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected triatomine vectors in northeastern Brazil: epidemiological implications. *Biochem Genetic*, 43: 519-530. 2005.
- Packer L, Taylor JS, Savignano DA, Bleser CA, Lane CP, Sommers LA. Population biology of an endangered butterfly, *Lycaeides Melissa samuelis* (Lepidoptera; Lycaenidae): genetic variation, gene flow, and taxonomic status. *Can J Zool*, 76: 320-329. 1998.
- Peçanha PM, Sessa PA, Silva FJD, Pereira RS, Almeida IM. Doença de Chagas – Apresentação de três casos autoctones do Estado do Espírito Santo, p. 33. *XIX Congresso da Soc Bras Med Trop*, Rio de Janeiro. 1983.
- Pereira MH, Souza MEL, Vargas AP, Martins MS, Penido CM, Diotaiuti L. Anticoagulant activity of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* saliva (Hemiptera: Triatominae). *Acta Trop*, 61: 255-261. 1996a.

- Pereira MH, Beirão PSL, Diotaiuti L. Activity of *Triatoma infestans* saliva on the sciatic nerve of the rat. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91(suppl.I): 143. 1996b.
- Pereira MH, Gontijo NF, Guarneri AA, Sant'Anna MRV, Diotaiuti L. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends Parasitol*, 22: 516-520. 2006.
- Pinto AFS, Santos UM, Murad V, Lima FEP, Zaganelli FL, Almeida AZ. Doença de Chagas no Estado do Espírito Santo. V – Primeiro caso de Chagas diagnosticado no Município de Alfredo Chaves, ES. *Rev Soc Bras Med Trop*, 3:53. 1969.
- Pinto AFS, Vieira NER, Milanez MC, Lima Pereira FE, Sessa PA. Doença de Chagas autóctone no Espírito Santo: relato de caso agudo em gestante com transmissão para o feto. *Rev Soc Bras Med Trop*, 19(suppl.): 78. 1986.
- Pinto ZT, Lima MM, Rey L. Feeding Behavior of different species of Chagas disease vectors stimulated with blood sources at different temperatures. *Braz J Med Biol Res*, 25: 19-22. 1992.
- Pinto AS, Lana M, Bastrenta B, Barnabé C, Quesney V, Noel S, Tibayrenc M. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitol Res*, 84: 348-353. 1998.
- Pires HHR. Estudos comparativos entre duas populações distintas de *Triatoma infestans* (Klüg, 1834) [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 1995.
- Pires HHR. Ecologia comparativa de *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae) em laboratório [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2003.
- Recommendations from a Satellite Meeting: International Symposium to commemorate the 90<sup>th</sup> anniversary of the discovery of Chagas disease, April 11-16, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(suppl.I) 429-432. 1999.
- Ribeiro JMC. Role of salivary in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology*, 32: 463-478. 1987.
- Ribeiro JMC, Garcia ES. The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol*, 26: 303-307. 1980.
- Ribeiro JMC, Garcia ES. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia*, 37: 384-386. 1981.
- Ribeiro JMC, Sarkis JJF. Anti-tromboxane activity in *Rhodnius prolixus* salivary secretion. *J Insect Physiol*, 101: 932-936. 1982.
- Ribeiro JMC, Marinotti O, Gonzales R. A salivary vasodilatador in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Br J Pharmacol*, 26: 303-307. 1990.
- Ribeiro JMC, Schneider M, Guimarães JA. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking *Rhodnius prolixus*. *Biochem J*, 308: 243-249. 1995.
- Risso MG, Garbarino GB, Mocetti E, Campetella O, Gonzalez Cappa SM, Buscaglia CA, Leguizamón MS. Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *J Infect Dis*, 189: 2250-2259. 2004.
- Roca MJ, Lazzari CR. Effects of relative humidity on the Haematophagous bug *Triatoma infestans*: Hygropreference and eclosion success. *J Insect Physiol*, 40: 901-907. 1994.

- Rohlf FJ. *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0, user guide*. Exeter Software, New York. 1998.
- Romanha AJ, Silva-Pereira AA, Chiari E, Kilgour V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi* changes after prolonged subculture. *Com Biochem Physiol*, 62B: 139-142. 1979.
- Romanha AJ. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi* [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 1982.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis kB, Horn GT, Erlich HÁ, Arnheim N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350-1354. 1985.
- Sant'Anna MRV, Diotaiuti L, Gontijo AF, Gontijo NF, Pereira MH. Feeding behavior of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. *J Insect Physiol*, 47: 1459-1465. 2001.
- Santos CB, Leite GR, Sessa PA, Falqueto A. Dynamics of feeding and defecation in *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its potential in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(5): 543-546. 2006.
- Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GEM, Rodrigues AAF, Falqueto A. Peridomestic colonies of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 471-473. 2005.
- Santos UM, Pinto AFS, Zaganelli FL, Almeida AZ, Martins A, Carancho PV, Vieira HJ. Doença de Chagas no Espírito Santo. II- Inquérito sorológico. *Rev Soc Bras Med Trop*, 3: 51. 1969a.
- Santos UM, Pinto AFS, Almeida AZ. Doença de Chagas no Espírito Santo - III- Vetores do *Trypanosoma*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1: 51-52. 1969b.
- Santos UM, Murad V, Chapadeiro E, Pereira Lima FE. Doença de Chagas no Espírito Santo IV- Primeiro caso diagnosticado no município de Rio Novo do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, 3: 52-53. 1969c.
- Schilman PE. Factores que afectan la reproducción de las vinchucas: aspectos fisiológicos y comportamentales [tese]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires. 1998.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102: 75-85. 2007.
- Schofield CJ. Triatomine: Biology y control. *Eurocommunica Publications*: United Kingdom, 80 pp. 1994.
- Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110: 88-100. 2009.
- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(suppl.1): 375-378. 1999.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol*, 22: 583-588. 2006.
- Scholforo JR, Carvalho LMT. In: *Mapeamento e Inventário da Flora Nativa e dos Reflorestamentos de Minas Gerais*. Lavras: Universidade Federal de Lavras. 288 pp. 2006.

- Sessa PA, Carias VDR. Infecção natural de triatomíneos do Espírito Santo por Flagelados morfológicamente semelhantes ao *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 19: 99-100. 1986.
- Siloto HH, Diotaiuti L, Azeredo BVM. Distribuição da fauna triatomínica, segundo o Programa de Controle da Doença de Chagas (PCDCH), no Estado de Minas Gerais, no período de 2002 a 2006. *XXIII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e Leishmanioses*. Anais. 25 a 27 de outubro, Uberaba, MG, Brasil. 2007.
- Silveira AC, Alencar TA, Máximo MH. Sobre o *Triatoma vitticeps* Stål, 1859, no Espírito Santo, Brasil, 5-8. Resumos de Comunicações da *X Reunião Anual de Pesquisa básica em Doença de Chagas*, Caxambu. 1983.
- Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar, no período 1975-1983, Brasil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, 36: 15-312. 1984.
- Siqueira AF. Estudo sobre a reação da precipitina aplicada a identificação de sangue ingerido por triatomíneos. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2: 41-53. 1960.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 83(2): 141-152. 1996.
- Smith JJB. Effect of diet viscosity on the operation of the pharyngeal pump in the blood-feeding bug *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol*, 82, 93-104. 1979.
- Smith JJB, Friend WG. Feeding in *Rhodnius prolixus* responses to artificial diets as revealed by changes in electrical resistance. *J Insect Physiol*, 16:1709-1720. 1970.
- Smith JJB, Cornish RA, Wilkes J. Properties of a calcium-dependent apyrase in the saliva of the blood-feeding bug, *Rhodnius prolixus*. *Experientia*, 36:898-900. 1980.
- Soares AC, Carvalho-Tavares J, Gontijo NF, Dos Santos VC, Teixeira MM, Pereira MH. Salivation pattern of *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae) in mouse skin. *J Insect Physiol*, 52: 468-472. 2006.
- Soares RPP, Bardosa SE, Borges EC, Melo Júnior TA, Romanha AJ, Dujardin JP, Schofield CJ, Diotaiuti L. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, Morphometry, Isoenzymes, and Random amplified polymorphic DNA. *Biochem Genet*, 39: 1-13. 2001.
- Soares RPP, Barbosa SE, Dujardin JP, Schofield CJ, Siqueira AM, Diotaiuti L. Characterization of *Rhodnius neglectus* from two regions of Brazil using isoenzymes, genitalia morphology, and morphometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(2): 161-166. 1999.
- Soares RPP, Evangelista LG, Laranja LS, Diotaiuti L. Population dynamics and feeding behavior of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata*, main vectors of Chagas disease in Northeastern Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95: 151-155. 2000.
- Solano P, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha C, Tibayrenc M. Isoenzymes as a tool for identification of *Rhodnius species*. *Res Rev Parasitol*, 56: 41-47. 1996.
- Sousa OE, Rosan RN, Baerg DC. The prevalence of trypanosomes and microfilariae in panamanian monkeys. *Am J Trop Med Hyg*, 23: 862-868. 1974.

- Souza RCM, Barbosa SE, Sonoda IV, Azeredo BVM, Romanha AJ Diotaiuti L. Population dynamics of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) in Itanhomi, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(1): 14-20. 2008
- Steindel M, Dias Neto E, Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJ. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol*, 60: 71-80. 1993.
- Takahata N, Nei M.  $F^{st}$  and  $G^{st}$  statistics in the finite island model. *Genetics*, 107: 501-504. 1984.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon SA, Morris LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*, 5: 400-419. 1992.
- Tekiel VS, Mirkin GA, Gonzalez SM. Chaga's disease: reactivity against homologous tissues induced by different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 115(pt 5): 495-502. 1997.
- Tibayrenc M. Populations genetics and strain typing of microorganisms: how to detect departures from panmixia without individualizing alleles and loci. *C R Acad Sci III*, 318(1): 135-139. 1995.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*. *C R Acad Sci III*. 304(4): 89-92. 1987.
- Tibayrenc M, Neubauber K, Barnabé C Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random -primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 1335-1339. 1993.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agente of Chagas disease, have a complex multiclonal stucture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 442-447. 1986.
- Trumper EV, Gorla DE. Density-dependent timing of defecation by *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85: 800-802. 1991.
- Vargas N, Souto RP, Carranza JC, Vallejo GA, Zingales B. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. *Exp Parasitol*, 96(3): 147-59. 2000.
- Veloso VM, Romanha AJ, Lana M, Murta SM, Carneiro CM, Alves CF, Borges EC, Tafuri WL, Machado-Coelho GL, Chiari E, Bahia MT. Influence of the long-term *Trypanosoma cruzi* infection in vertebrate host on the genetic and biological diversity of the parasite. *Parasitol Res*, 96(6): 382-389. 2005.
- Vidigal THDA, Dias Neto E, Carvalho OS, Simpson Aj. *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revelead by random amplified polymorphic DNA analysis. *Exp Parasitol*, 79:187-194. 1994.
- Vidigal THDA, Magalhães KG, Kissinger J, Caldeira RL, Simpson AJ, Carvalho OS. A Multiplex-PCR approach to identification of the Brazilian intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97: 95-97. 2002.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18: 7213-7218. 1990.
- Welsh J, Honeycut RJ, McClelland M, Sobral BWS. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor Appl Genet*, 82: 743-746. 1991a.

- Welsh J, Petersen C, McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res*, 18(22): 6531-6535. 1991b.
- Williams JGH, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JÁ, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18(22) 6531-6535. 1990.
- Wilks SS. Certain generalizations in the analysis of variance. *Biometrika*, 24, 471. 1932.
- Winston PV, Bates DH, 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, 41: 232-237.
- Wisnivesky\_Colli C, Gurtler RE, Solarz ND, Lauricella MA, Segura EL. Epidemiological role of humans' dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central area of Argentina. *Rev Inst Med Trop*, 27: 346-352. 1985.
- WHO – Potential health effects of climatic change. World Health Organization, Geneva. 1990.
- Wisnivesky\_Colli C, Gurtler RE, Solarz ND, Lauricella MA, Segura EL. Epidemiological role of humans dogs and cats in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a central area of Argentina. *Rev Inst Med Trop*, 27: 346-352. 1985.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles Graham AJ, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, Arias AR, Miles MA. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Inter J Parasitol*, 35: 225-233. 2005.
- Yeo M, Lewis MD, Carrasco HJ, Costa NA, Llewellyn M, Valente SAS, Valente VC, Arias AR, Miles MA. Resolution of multiclonal infections of *Trypanosoma cruzi* from naturally infected triatomine bugs and from experimentally infected mice by direct plating on a sensitive solid medium. *Int J Parasitol*. 2006.
- Zeledón R. Effects of triatomine behavior on trypanosome transmission. *PAHO Sc Pub*, 318: 65-77. 1975.
- Zeledón R, Alvarado R, Jirón LF. Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop*, 34: 65-77. 1977.
- Ziccardi M, Lourenço de Oliveira R, Laison R, Brigido MC, Muniz JA. Trypanosomes of non-humans primates from the Nacional centre of Primates, Ananindeua, State of Pará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 95: 157-159. 2000.
- Zingales B, Abuin G, Romanha AJ, Chiari E, Colli W. Surface antigens of stocks and clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans. *Acta Trop*, 41(1):5-6. 1984.



## Anexo 1. Ficha utilizada na captura de Triatomíneos

		<b>MS-FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE</b> <b>PROGRAMA DE CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS</b> <b>DIÁRIO DE ATIVIDADES</b>		<small>FPCDCH-01</small>	
<b>A 1- Localização da Unidade Domiciliar</b>					
Código do Município		Nome do Município		Data Atividade ___/___/___	
Código da Localidade		Nome da Localidade		<b>Atividades</b> <input type="checkbox"/> 1 - Pesquisa <input type="checkbox"/> 5 - At. Notif. <input type="checkbox"/> 2 - Borrifação <input type="checkbox"/> 3 - Visita ao PIT s/Notific. <input type="checkbox"/> 4 - Visita ao PIT c/Notific.	
Nr. Casa	Compl.	<b>Pendência da Pesquisa</b> <input type="checkbox"/> 1- Recusa <input type="checkbox"/> 2- Casa Fechada		<b>Pendência da Borrifação</b> <input type="checkbox"/> 1- Recusa <input type="checkbox"/> 2- Casa Fechada	
Nome do Morador				Nº Hab.	Nº Anexos
<b>2- Dados da Pesquisa e Borrifação</b>					
<b>Tipo de Parede</b> <input type="checkbox"/> 1-Alvenaria c/ Reboco <input type="checkbox"/> 2-Alvenaria s/ Reb. <input type="checkbox"/> 3-Barro c/ Reboco <input type="checkbox"/> 4-Barro s/ Reb. <input type="checkbox"/> 5-Madeira <input type="checkbox"/> 6-Outros					
<b>Tipo de Teto</b> <input type="checkbox"/> 1-Telha <input type="checkbox"/> 2- Palha <input type="checkbox"/> 3-Madeira <input type="checkbox"/> 4-Metalico <input type="checkbox"/> 5-Outros				<b>Situação da Casa</b> <input type="checkbox"/> 1-Nova <input type="checkbox"/> 2-Demolida	
<b>Intradomicílio</b>				<b>Peridomicílio</b>	
<b>Captura</b>	<b>Vestígios</b>	<b>Local de Captura</b>		<b>Captura</b>	<b>Local de Captura</b>
<input type="checkbox"/> Triatomíneo <input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Ovos <input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Sala <input type="checkbox"/> Cozinha <input type="checkbox"/> Quarto <input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Bio-Sensor	<input type="checkbox"/> Triatomíneo <input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Galinheiro <input type="checkbox"/> Paiol <input type="checkbox"/> Chiqueiro <input type="checkbox"/> Outros
<b>Tipo de Desalojante</b>		<b>Nº de Cargas</b>		<b>Tipo de Inseticida</b>	
<b>Nº do PIT</b>		<b>Nº Notif. p/PIT</b>		<b>Assinatura do Agente de Saúde</b>	
<b>Matric. Ag. Saúde</b>		_____			
<b>Data do visto</b>	<b>Visto do Chefe de equipe</b>			<b>ETIQUETA</b>	

## Anexo 2. Fichas utilizadas para caracterização do ecótopo

Caracterização da Infestação Peridomiciliar								
Município:					Localidade:			
Presença de animais domésticos/Nº	( ) cão		( ) vaca		Outros:			
	( ) gato		( ) cavalo					
	( ) galinha		( ) porco					
Características das imediações do peridomicílio:								
Características do ambiente silvestre vistas da casa:								
Tipo de anexo	Material construção	Distância anexo/casa	Temperatura do ecótopo	Umidade do ecótopo	Infestação Sim/Não	Espécie de triatomíneo	Nº adulto	Nº ninfas

**Anexo 3.** Tampões dos eletrodos, Solução de Revelação, Voltagens e Tempo de corrida específicos para cada enzima.

### Tampões de Corrida

✓ **Tris-maleato 0,15M; pH 7,4.**

#### **Enzimas: PGM; 6PGD; G6PD**

Tris	18,17 g
Ácido maleico	17,4 g
EDTA (Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O)	5,6 g
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	3,5 g
H <sub>2</sub> O destilada	750 ml
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1000 ml

✓ **Fosfato 0,2M; pH 7,4.**

#### **Enzimas: GPI e ME**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28,4 g
H <sub>2</sub> O destilada	750 ml
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1000 ml
HCL (concentrado – 6N)	q.s.p. pH 7,4

✓ **Tris 0,33M/citrato 0,0415M; pH 8,6.**

#### **Enzimas: ICD e PEP-2**

Tris	40,03 g
Ácido cítrico	8,72 g
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1000 ml

✓ **Citrato 75mM; pH 6,0.**

#### **Enzima: MDH**

Citrato de Na <sub>3</sub> . 2H <sub>2</sub> O	22,06
H <sub>2</sub> O destilada	750 ml
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1000 ml
HCL (concentrado – 6N)	q.s.p. pH 6,0

✓ **Tris/Citrato 0,15M; pH 8,5.**

**Enzima: ALAT**

Tris	18,17 g
H <sub>2</sub> O destilada	750 ml
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1000 ml
Solução de ácido cítrico 0,5M	
q.s.p. pH 8,5 (≅ 70ml)	

✓ **Glicina/NaOH 0,15M; pH 9,5.**

**Enzima: ASAT**

Glicina	11,3 g
NaOH 5N (≅ 12ml)	q.s.p. pH 9,5
H <sub>2</sub> O destilada	750 ml
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1000 ml

✓ **Tris 0,678M/Ácido cítrico 0,157M; pH 7,0.**

**Enzima: α-GPD**

Tris	83,2 g
Ácido cítrico anidro	30,2 g
H <sub>2</sub> O destilada	750 ml
H <sub>2</sub> O destilada	q.s.p 1000 ml

**Soluções de Revelação**

**Enzima: GPI**

Tris/HCL 0,3M pH 8,0	8,5 ml
NADP 12,2mM 10mg/ml	1,0 ml
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O 0,5M	0,2 ml
D-frutose-6P 20,4mg/ml	0,5 ml
G6PD 375u/ml	20μl
MTT	0,5 ml
PMS	0,2 ml
Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H <sub>2</sub> O dest.	

**Enzima: ME**

Tris/HCL 0,3M pH 8,0	8,5 ml
NADP 12,2mM 10mg/ml	0,2 ml
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O 0,5M	0,5 ml
H <sub>2</sub> O dest.	1,6 ml
Malato 1,1M pH 7,2-7,4	1,0 ml
MTT	0,5 ml
PMS	0,2 ml
Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H <sub>2</sub> O dest.	

**Enzima: MDH**

Tris/HCL 0,3M pH 8,0	8,5 ml
β-NAD 10mg/ml	0,5 ml ou 5,1 mg
Malato 1,1M pH 7,2-7,4	2,3 ml
H <sub>2</sub> O dest.	0,5 ml
MTT	0,5 ml
PMS	0,2 ml
Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H <sub>2</sub> O dest.	

**Enzima: ALAT**

Tampão fosfato 0,1M pH 7,4	3,0 ml
β-NADH	1,5 mg
α-cetoglutarato	5,0 mg
LDH 4500 u/ml em glicerol 50%	5,0 μl
L-alanina	60 mg

**Enzima: ASAT**

Tampão fosfato 0,1M pH 7,4	3,0 ml
β-NADH	1,5 mg
α-cetoglutarato	5,0 mg
MDH 4500 u/ml em glicerol 50%	10,0 μl
L-aspartato	11,5 mg

**Enzima:  $\alpha$ -GPD**

Tris/HCl 0,3M pH 8,0	2,1 ml
H <sub>2</sub> O dest.	8,7 ml
$\beta$ -NAD 10,2mg/ml	0,5 ml ou 5,1 mg
Piruvato de sódio	106,4 mg
DL-glicerol-3fosfato Na <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	7,0 mg
MTT	0,5 ml
PMS	0,2 ml

Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H<sub>2</sub>O dest.

**Enzima: PGM**

Tris/HCl 0,3M pH 8,0	8,5 ml
NADP 10mg/ml	1,0 ml
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O 0,5M	2,0 ml
$\alpha$ -D-glicose-1P 136,2mM	1,0 ml
G-6PD 375u/ml	20 $\mu$ l
Imidazol	0,2 ml
MTT	0,5 ml
PMS	0,2 ml

Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H<sub>2</sub>O dest.

**Enzima: G-6PD**

Tris/HCl 0,3M pH 8,0	8,5 ml
NADP 10mg/ml	1,0 ml
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O 0,5M	0,5 ml
$\alpha$ -D-glicose-6P	0,5 ml
H <sub>2</sub> O dest.	1,4 ml
Imidazol	0,2 ml
MTT	0,5 ml
PMS	0,2 ml

Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H<sub>2</sub>O dest.

**Enzima: 6PGD**

Tris/HCl 0,3M pH 8,0	8,5 ml
NADP 10mg/ml	1,0 ml
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O 0,5M	1,5 ml
Ácido 6-Pglucônico	7,0 mg
H <sub>2</sub> O dest.	1,3 ml
Imidazol	0,5 ml
MTT	0,5 ml
PMS	0,2 ml

Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H<sub>2</sub>O dest.

**Enzima: PEP-2**

Tampão fosfato 0,1M pH 7,4	3,0 ml
H <sub>2</sub> O dest.	8,7 ml
MnCl <sub>2</sub> 0,1M	0,3 ml
L-aminoácido oxidase	1,0 mg
Peroxidase	1,0 mg
Leu-ala	10 mg
3-amino-9etilcarbazol	0,5

Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H<sub>2</sub>O dest.

**Enzima: ICD**

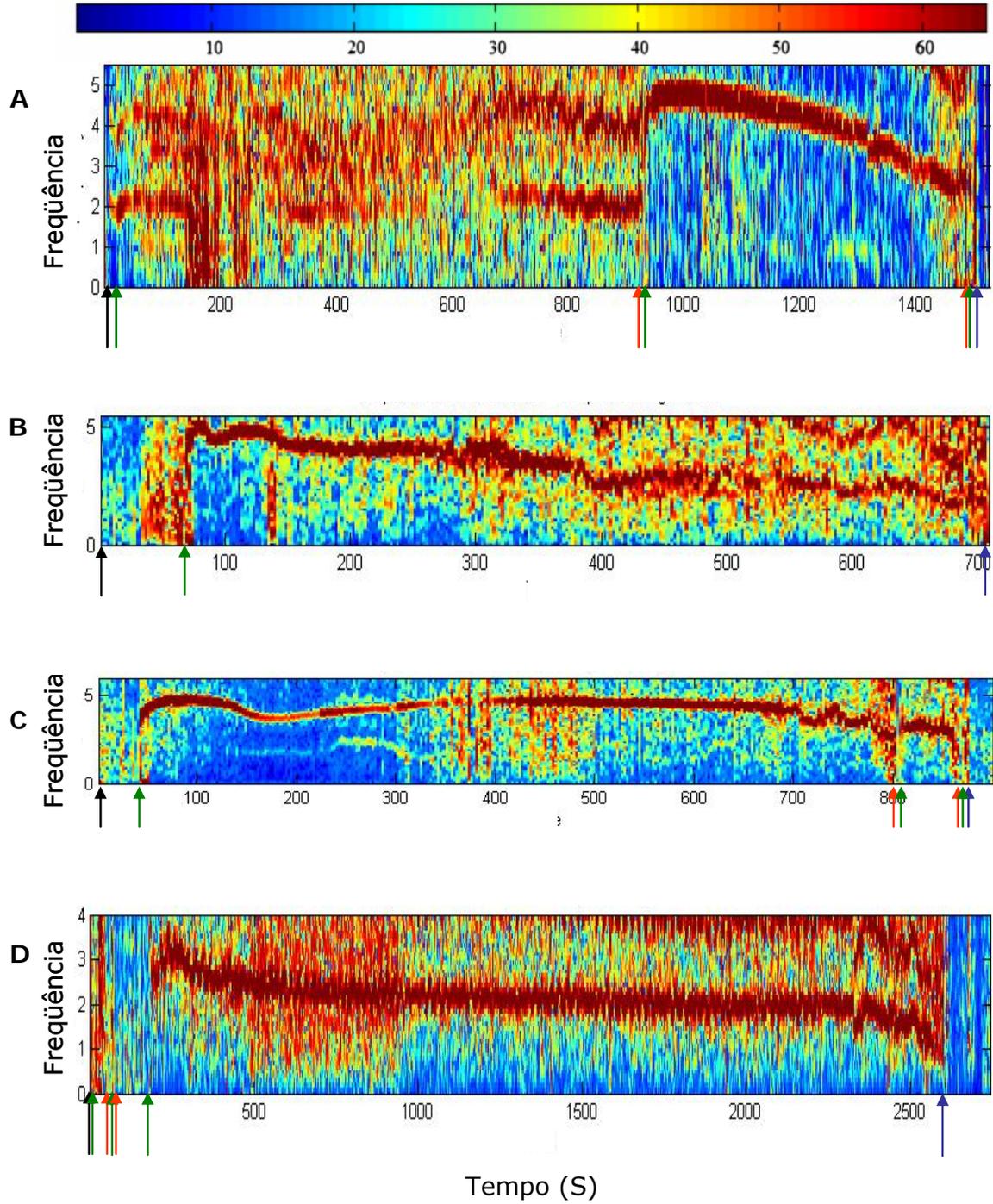
Tris 0,135M/citrato 0,042M pH 7,0	5,5 ml
NADP 10mg/ml	0,7 ml
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O 0,5M	2,0 ml
Ácido isocítrico	20 mg
H <sub>2</sub> O dest.	3,6 ml
MTT	0,5 ml
PMS	0,2 ml

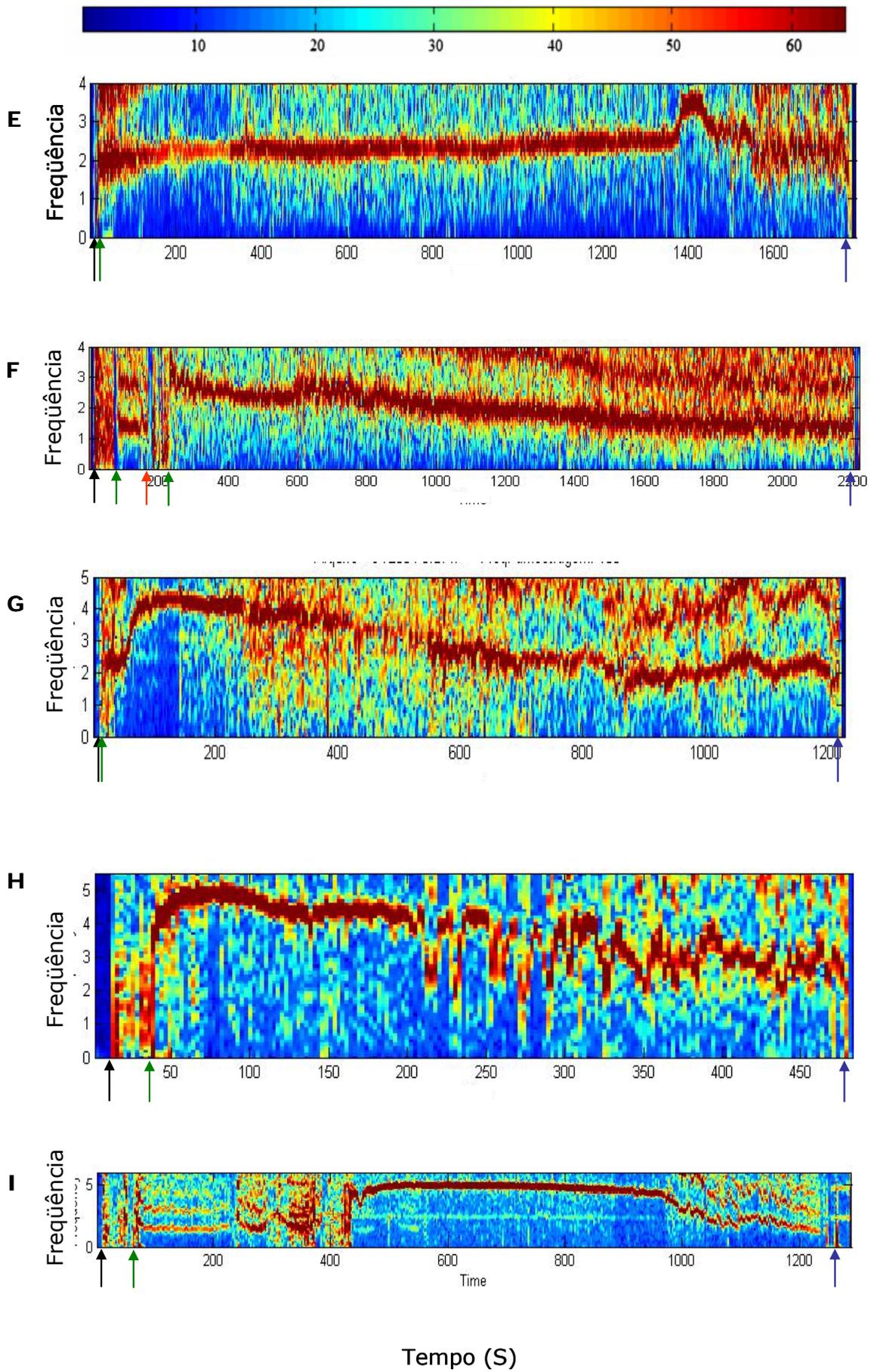
Ágar 1,2% 150mg em 12,5 ml de H<sub>2</sub>O dest.

### Condições Técnicas de Migração

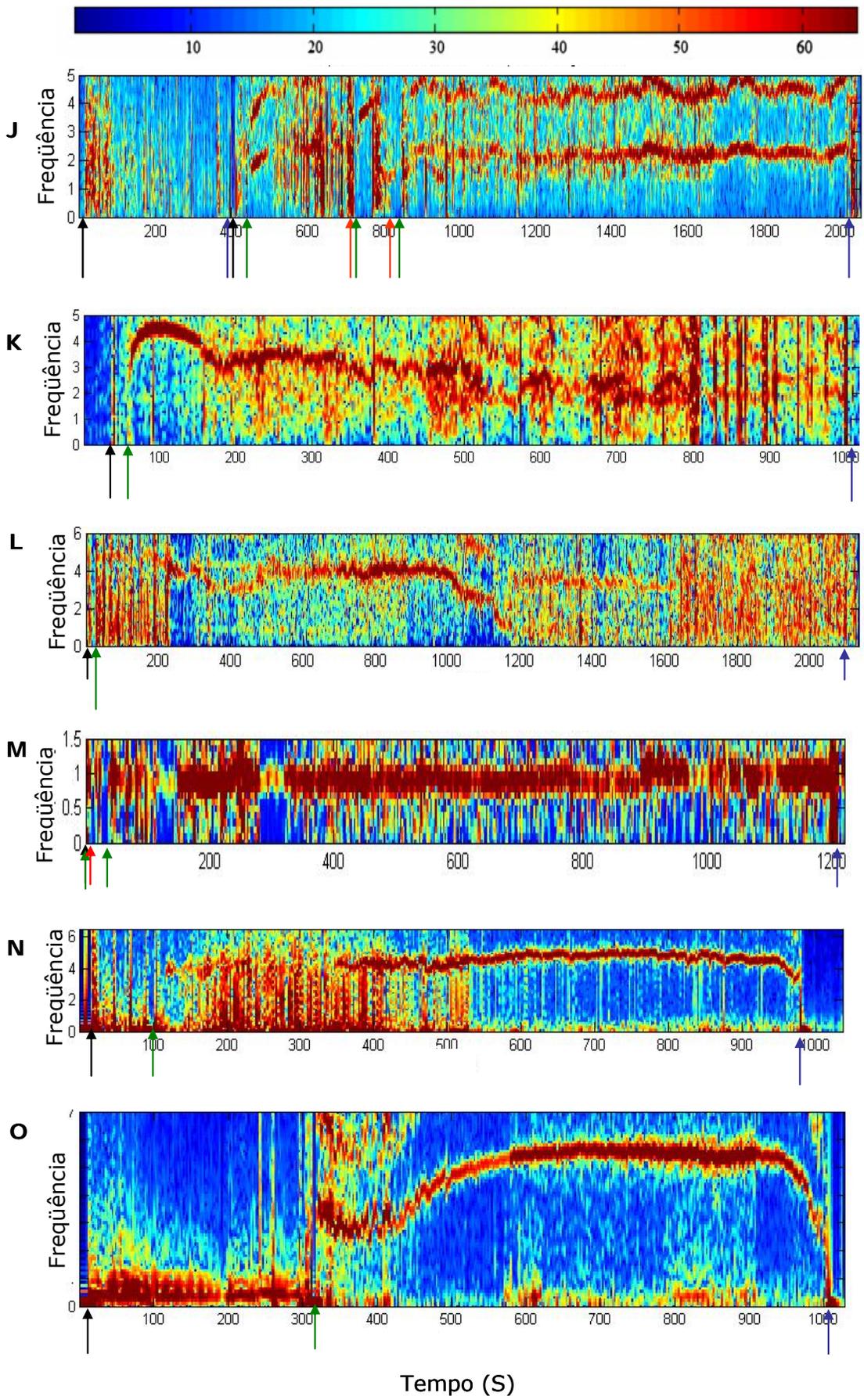
Enzimas	Condições normais	Condições realizadas	Tempo (min)
<b>G6PD</b>	242V/24mA	242V/26mA	180
<b>PGM</b>	242V/24mA	242V/20mA	180
<b>ME</b>	242V/22mA	242V/22mA	150
<b>GPI</b>	242V/20mA	242V/22mA	150
<b>ICD</b>	300V/16mA	300V/16mA	120
<b>6-PGD</b>	180V/25mA	200V/20mA	180
<b><math>\alpha</math>-GPD</b>	242V/20mA	200V/60mA	150
<b>ASAT</b>	500V/8,0mA	500V/9,0mA	90
<b>ALAT</b>	500V/9,0mA	500V/15mA	120
<b>MDH</b>	242V/25mA	270V/25mA	150
<b>PEP-2</b>	250V/22mA	250V/22mA	120

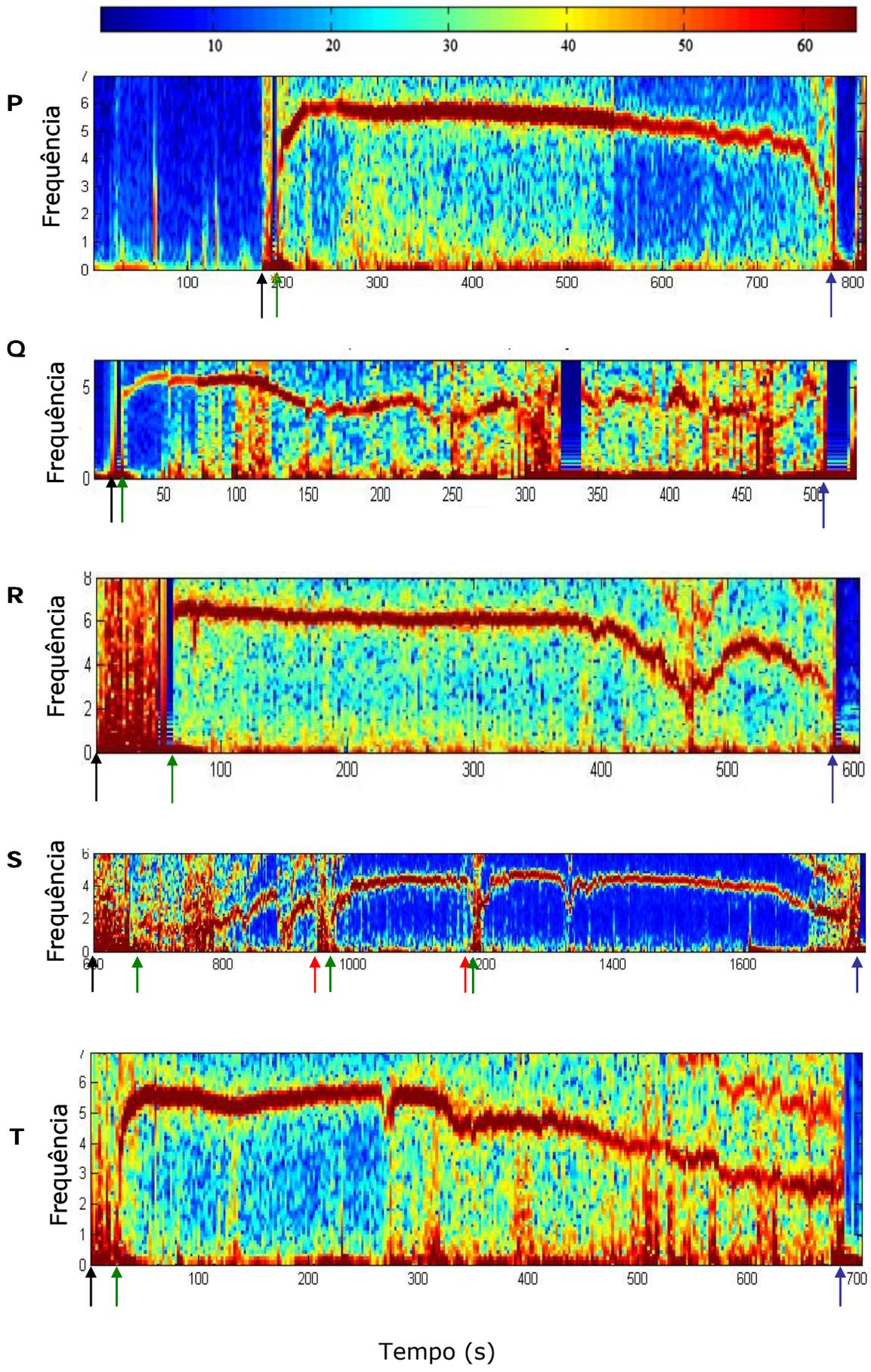
**Anexo 4.** Espectro da frequência ao longo do tempo produzido pelos sinais elétricos gerados pelas contrações da bomba cibarial de ninfas de segundo estágio de *T. vitticipes*. Alimentação em camundongo (A-K) e pombo (L-). As cores representam a magnitude da ocorrência de cada frequência na escala representada no topo da figura. As setas abaixo de cada figura representam o momento da picada (preta), o início de m ingurgitamento ou reinício após uma interrupção (verde), interrupção do ingurgitamento (vermelho) e final do repasto (azul).

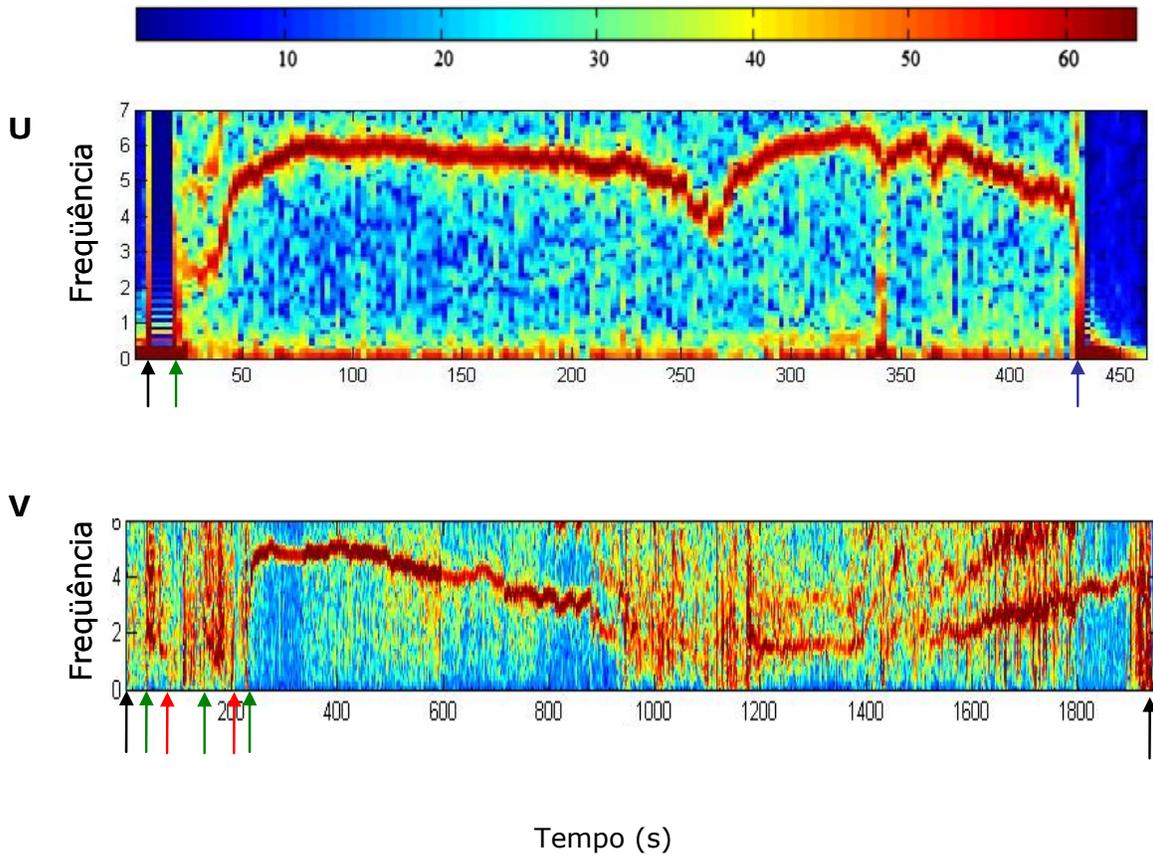




Tempo (S)







**IX – ARTIGO PUBLICADO**

---

## Population dynamics of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) in Itanhomi, Minas Gerais, Brazil

Rita de Cássia Moreira de Souza, Sílvia Ermelinda Barbosa, Ivan Vieira Sonoda, Bernardino Vaz de Melo Azeredo<sup>1</sup>, Álvaro Jose Romanha<sup>2</sup>, Liléia Diotaiuti<sup>+</sup>

Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da Doença de Chagas <sup>1</sup>Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil <sup>2</sup>Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

*Taxonomic markers (head structure morphometry, isoenzymes and random amplified polymorphism of DNA - RAPD) were used to understand the population dynamics of Triatoma vitticeps, predominant triatomine species in Itanhomi district, using samples obtained from domestic, peridomestic and sylvatic habitats. Morphometric analysis revealed sexual dimorphism within the three samples although specimens could not be separated according to the habitat in which they were captured. Forty-two bands were analyzed from RAPD profiles generated using four primers. A dendrogram constructed from Dice's similarity coefficient values showed that migration of the insects between the habitats has occurred, without structuring of populations. Moreover, the dendrogram obtained from the genetic distance values showed an important gene flow between the sylvatic and domestic habitats. No polymorphism was found in the electrophoretic mobility of proteins for the ten enzymes studied. Our results revealed movement of triatomines between the three habitats, suggesting that the presence of T. vitticeps in houses should not be ignored. As invasion of houses by sylvatic insects is frequent and the natural infection indices of this species are among the highest known, epidemiological vigilance studies may reveal possible changes in T. vitticeps behaviour which could present future risks to public health.*

Key words: *Triatoma vitticeps* - isoenzymes - head morphometry - RAPD - population dynamics

The reduviid bug *Triatoma vitticeps* (Stål 1859) is one of 141 species of Triatominae (Galvão et al. 2003, Galvão & Angulo 2006, Costa et al. 2006, Costa & Felix 2007, Sandoval et al. 2007, Bérenger & Blanchet 2007, Martínez et al. 2007) and is a vector of *Trypanosoma cruzi*. Its geographical distribution is limited to the Brazilian states of Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais (MG), and Rio de Janeiro (Galvão et al. 2003). Although considered to be of secondary importance in *T. cruzi* transmission to man, this species shows high rates of trypanosome infection (Santos et al. 1969a,c, Pinto et al. 1969, 1986, Barros et al. 1975, Sessa & Carias 1986, Dias et al. 1989, Gonçalves et al. 1998, Santos et al. 2005) and is often captured in man-made habitats, with frequent reports of adult bugs invading houses (Santos et al. 1969b, Ferreira et al. 1986, Sessa & Carias 1986, Dias et al. 1989, Gonçalves et al. 1998), possibly attracted by light (Ferreira et al. 1986).

The Itanhomi district is situated in the Rio Doce valley. Lying within an area originally occupied by the Atlantic Forest, it has a humid climate and mountainous terrain. According to technical reports of the Brazilian Health Service (FUNASA) published between 1990-1999, *T. vitticeps* is the predominant triatomine species collected in this area, and its infection rates by flagellates similar

to *T. cruzi* are very high, especially in adult bugs captured indoors in Itanhomi. However, Chagas disease is rare in the area, a prevalence of only 0.4% has been recorded as part of a national serological survey (Camargo et al. 1984). It is not known whether the low transmission of *T. cruzi* to man is due to characteristics of the vector (the long interval between feeding and defecation) or the strain of parasite involved.

Among the available taxonomic marker techniques, morphometry of the head, random amplified polymorphism of DNA (RAPD) and isoenzyme analysis have been most used in triatomine population studies (Costa et al. 1997, Dujardin et al. 1998, Borges et al. 2000, Soares et al. 2001, Barbosa et al. 2003, 2006). We used these three techniques to investigate *T. vitticeps* population dynamics in the Itanhomi district.

### MATERIALS AND METHODS

**Study area** - Itanhomi (19°11'15"S, 41°48'45"W) has an estimated population of 11,012 inhabitants. The urban and rural area comprise 93 localities. In 11 of the rural sites (Adão Daniel, Cabeceira do Guido, Francisco Inácio, Jesus Julião, Jose Horta, Jose Noberto, João Caboclo, Júlio Carlos, Liés Alves, Orides I, and Valico) the search for *T. vitticeps* was intensively performed in 2002 in domestic and peridomestic environments. The following year, sylvatic sampling was attempted in Cabeceira do Guido, particularly in a wooded area 100 m from a house where adult triatomines are periodically detected.

Houses in Itanhomi in which *T. vitticeps* was sampled conform to a distinct pattern of construction, being built on stilts. The floors of these dwellings are wooden

<sup>+</sup> Corresponding author: diotaiuti@cpqrr.fiocruz.br  
Received 16 February 2007  
Accepted 12 February 2008

and often have cracks that allow triatomines to pass in and out; the floor is a kind of roof for the open basement (classified as the peridomicile). Houses are built on stilt, providing shelter for domestic animals and storage of materials. Furthermore, 100-500 m from the houses there are remnants of Atlantic forest and rocks, constituting sylvatic habitat for the bugs. This peculiar characteristic of the locality is the proximity of the habitats.

**Insects** - A pool of *T. vitticeps* captured in Itanhomi was studied, consisting of species caught at intradomiciliary, peridomiciliary (around and under the stilt of houses), and sylvatic habitats. The *T. vitticeps* infestation rate was calculated based on manual collection in 256 houses (33 triatomines), and their respective outbuildings (16 insects). Thirty houses (11.7%) and six outbuildings (2.3%) were positive for this species. With respect to sylvatic captures, seven insects were collected in two light traps hung from 18:00-21:00 h on three consecutive nights near a house that was regularly invaded by triatomines in Cabeceira do Guido. Each trap consisted of a white sheet 2.5 m long by 1.5 m high, hung vertically 80 cm above the ground, with a 250 W white fluorescent lamp positioned centrally behind it. The insects were transported to the laboratory, maintained under controlled conditions of temperature ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and relative humidity ( $60 \pm 10\%$ ), and weekly fed on chickens. All the females were fertile and laid eggs. Adult insects of the first laboratory generation were used to perform the experiments.

**Morphometry** - A series of six measurements of the head of 15 males and 15 females from each habitat were taken (Fig. 1), as recommended by Dujardin et al. (1998). The measurements were made using the KS/300 computerized image analysis system, with a Carl Zeiss KONTRON Electronic GMBH model at a magnification of 30x. The values obtained were transformed into natural logarithms and submitted to uni- and multivariate analyses. Univariate analysis was performed by calculating Guillaumin profiles (Guillaumin 1972), calculated from the difference between the group and overall means for each variable, divided by the standard deviation showing the relationships of size among the vari-

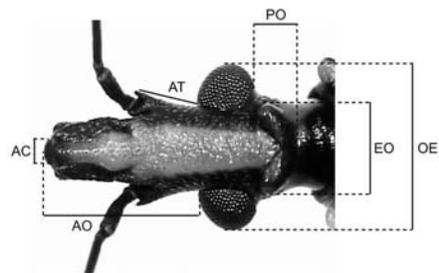


Fig. 1: morphometric measurements of the head of an adult *Triatoma vitticeps*. AC: width of anteclypeus; AT: length of antennal tubercle; AO: antecocular distance; EO: external distance between ocelli; OE: external distance between eyes; PO: postocular distance excluding neck.

able measurements, using the Microsoft Office Excel programme version 2003. The values were submitted to analysis of variance by Tukey's test using the Minitab release program 13.20. Multivariate analyses were performed separately for males and females. Analysis of the common principal components is a multivariate analysis method that examines the different matrices of variance-covariance. This analysis combines all the variable measurements, giving rise to new variables or factors, where the first common principal component is that related to size. Discriminant analysis was also performed to obtain the components of shape. This analysis generates independent factors formed from all the common principal components except the first. These factors are denominated discriminant functions or canonic variables. Their purpose is to discriminate the pre-established groups by the observer, based not only on their size but also on their form. Factorial maps were constructed to illustrate the possible differences of size and form between the sexes and populations. The significance values are given according to Wilks (1932). Multivariate analyses were made using the JMP 3.1 and NTSYSpc 2.0 programmes.

**RAPD** - Legs were removed from adult insects (10 males and 10 females) and stored at  $-70^\circ\text{C}$ . DNA was extracted using a leg from each insect and the Promega commercial kit (Wizard Genomic DNA Purification System) following the extraction protocol modified by Borges et al. (2000). The concentration and degree of purity of DNA extracted was estimated by spectrophotometric reading (GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech) to 260 and 280 nm from 60  $\mu\text{l}$  of the DNA solution, this being rejected later. The four primers used - 3302 (5' CT-GATGCTAC 3'), 3303 (5' TCACGATGCA 3'), 3304 (5' GCACTGTCA 3') and 3307 (5' AGTGCTACGT 3') - were selected based on their reproductive profiles and the great variability of displayed bands. The amplification products were visualized in 8% polyacrylamide mini gels stained with silver. A negative control was included in each mini-gel. Due to the homogeneity of the RAPD profiles presented among the groups, in the final analyses only seven randomly selected individuals of each sex and habitat and *Rhodnius neglectus* DNA (outgroup) were included in all the analysis.

The analysis of RAPD data was carried out according to the following assumptions: 1: the RAPD alleles segregate in Mendelian proportions; 2: bands of the same size are homologous; 3: different loci segregate independently; and 4: populations analysed are in Hardy-Weinberg equilibrium (Apostol et al. 1996). Thus, the profile obtained by RAPD-PCR was used to construct binary matrices based on the presence or absence of bands. These matrices were used to calculate the allelic frequencies (Apostol et al. 1996), allowing the following parameters of genetic diversity to be calculated: effective number of alleles ( $N_e$ ), number of polymorphic loci ( $S$ ), proportion of polymorphic loci ( $k$ ), and mean heterozygosity ( $H$ ). All these parameters were calculated using the PopGene programme, version 1.32. Genetic differentiation among the populations was evaluated by incrossing index ( $G_{st}$ ), which is regarded as an extension of Wright's  $F_{st}$  to the

case of multiple alleles, since it is a weighted mean of  $F_{st}$  over all extant alleles (Takahata & Nei 1984). The genetic distances (D) was also used to evaluate genetic differentiation among samples from distinct habitats (Nei 1978). All these parameters were also calculated using the PopGene programme, version 1.32.

A UPGMA dendrogram (unweighted pair-group method with arithmetic average) was constructed from the genetic distance values using the Mega program v. 2.1 (Kumar et al. 2004) to visualize the relationships among the samples studied. Binary matrices were also used to obtain the similarity coefficient of Dice (1945) and construct a UPGMA dendrogram using the NTSYSpc 2.0 program.

**Isoenzymes** - The wing muscles of 12 insects (6 males and 6 females) from each habitat were extracted by means of a section in the pronotal region, and ground in 100  $\mu$ l of enzymatic stabilizer for cryopreservation (Dujardin & Tibayrenc 1985). Ten enzymes were studied: malate dehydrogenase (MDH E.C.1.1.1.37), malic enzyme (ME E.C.1.1.1.40), glucose phosphate isomerase (GPI E.C.5.3.1.9), glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PGD E.C.1.1.1.49), 6 phosphoglyconate dehydrogenase (6PGD E.C.1.1.1.44), isocitrate dehydrogenase (ICD E.C.1.1.1.42),  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase ( $\alpha$ -GPD E.C.1.1.1.8), peptidase 2 (PEP-2 E.C.3.4.13), phosphoglycomutase (PGM E.C.2.7.5.1) and alanine aminotransferase (ALAT E.C.2.6.1.2). The electrophoretic runs were processed in amide gels at 4°C (Romanha 1982, Dujardin & Tibayrenc 1985), the reaction buffers, developing solutions, voltages and running time were specific for each enzyme (Abderrazak et al. 1993).

## RESULTS

**Morphometry** - The Guillaumin profile clearly shows the presence of significant sexual dimorphism ( $p < 0.05$ ) in the three samples of *T. vitticeps* studied. The intradomiciliary females were larger than the others and the sylvatic males the smallest. With respect to common main component analysis, the first main component (which corresponds to the size analysis) contributed 67.5% for the males and 71.3% for the females and no significant differences were revealed using the Tukey-Kramer test ( $p > 0.05$ ). The factorial map constructed from canonical components for *T. vitticeps* samples (Fig. 2), did not discriminate from distinct habitats (Wilks Lambda  $p > 0.05$ ).

**RAPD** - 42 RAPD loci were displayed for the *T. vitticeps* samples (Fig. 3): 12 were obtained by primer 3302, 11 by primers 3303 and 3304, and eight by 3307; 22 out of the 42 loci analysed were polymorphic ( $k = 52.38\%$ ). Variability was very low; samples from the peridomicile were the most polymorphic ( $S = 19 / k = 45.24\%$ ), while the intradomicile were the lowest variable ( $S = 15 / k = 37.71\%$ ). The  $N_e$ , as well as the H presented low values in all the populations studied (Table). Both the  $G_{st}$  and genetic distances were very low, ranging from 0.073-0.099 and 0.02-0.04, respectively (Table). The dendrogram obtained from Dice's similarity coefficient (Fig. 4) shows a unique group formed by all *T. vitticeps* individuals, despite their habitat and sex (all indi-

viduals lying very far from the phenon line). Approximately 87% similarity was detected among samples and there was no evidence of separation between the populations, as confirmed by the low values of genetic distance (Fig 5).

**Isoenzymes** - No polymorphism was found in the electrophoretic mobility of the isoenzymes of *T. vitticeps*. The enzymes G6PD, PGM, ME, 6PGD, ALAT and ICD presented one band while GPI, PEP-2 and MDH present two, and  $\alpha$ -GPD three.

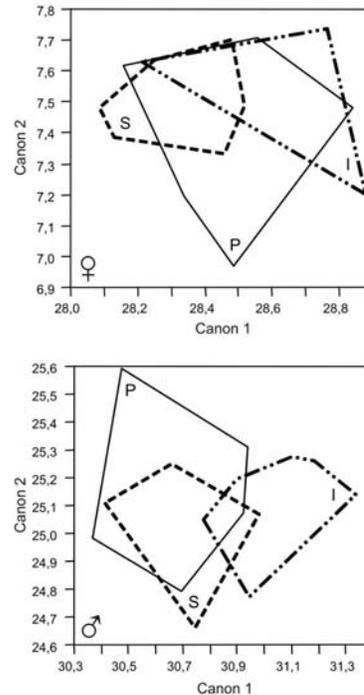


Fig. 2: factorial maps showing relationships between *Triatoma vitticeps* samples for discriminant analysis of shape. The polygons include all individuals sampled from each habitat: I: intradomicile, P: peridomicile; S: sylvatic.

TABLE

Genetic structure of samples analyzed comparing pairwise and separated with regard to habitat of origin: intradomicile, peridomicile and sylvatic

Samples	Ne	H	$G_{st}$	Nm	D
Intra/Peri	1.27	0.15	0.099	4.56	0.04
Intra/Silv	1.23	0.14	0.073	6.37	0.04
Peri/Silv	1.22	0.13	0.093	4.9	0.02

Ne: effective number of alleles; Hs: heterozygosity; Ht: total heterozygosity;  $G_{st}$ : index of incrossing; Nm: effective number of migrants per generation; D: genetic distance.

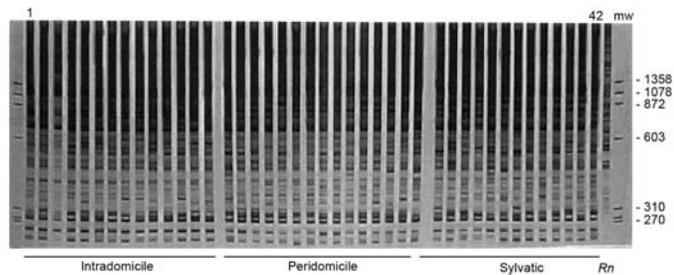


Fig. 3: random amplified polymorphism of DNA profiles of *Triatoma vitticeps* using primer 3304. mw: pattern of molecular weight; bp: base pairs; Lanes 1-7: intradomiciliary females; 8-14: intradomiciliary males; 15-21: peridomiciliary females; 22-28 peridomiciliary males; 29-35: sylvatic females; 36-42: sylvatic males; *Rn*: *R. neglectus*. Lane numbers shown above gel.

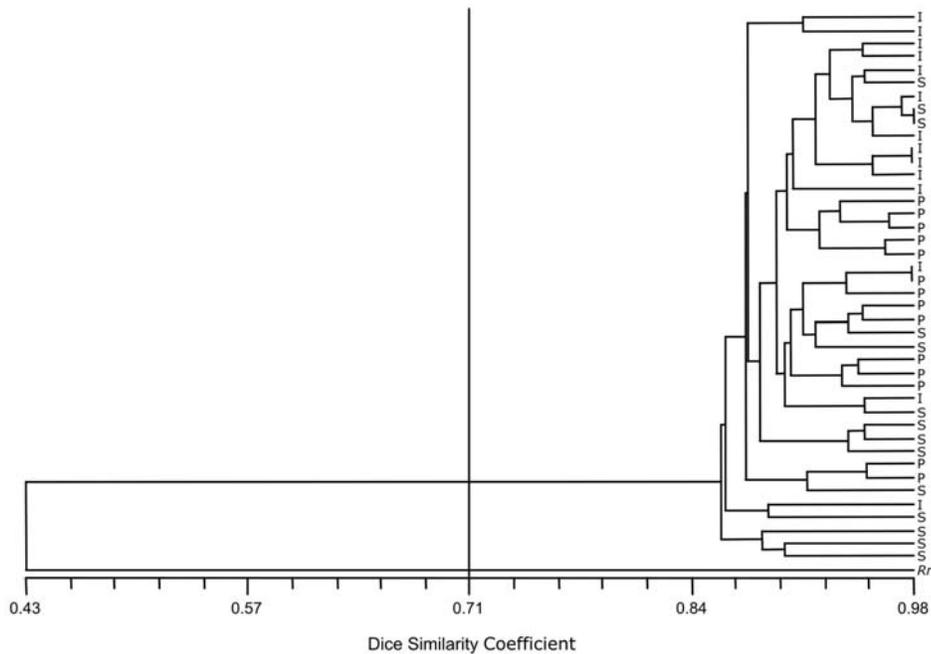


Fig. 4: dendrogram constructed from Dice similarity coefficient obtained from random amplified polymorphism of DNA electrophoretic profiles of *Triatoma vitticeps* from Itanhomi by using primers 3302, 3303, 3304 and 3307. Vertical bar corresponds to phenon line. Codes on the right indicate the habitat where each individual was captured: I: intradomicile; P: peridomicile; S: sylvatic.

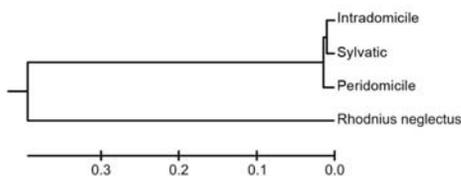


Fig. 5: dendrogram constructed from genetic distances obtained for random amplified polymorphism of DNA electrophoretic profiles of *Triatoma vitticeps* from Itanhomi by using primers 3302, 3303, 3304, and 3307.

**DISCUSSION**

Morphometric analysis of the head is a technique that is commonly used in triatomine population studies (Dujardin et al. 1998, Soares et al. 1999, Borges et al. 2000, Jaramillo et al. 2002, Barbosa 2004, Borges et al. 2005). In univariate analysis, the Guillaumin profile allows samples to be compared for each character separately, providing information on the size and symmetry of one group in relation to others. In the present study this analysis revealed clear sexual dimorphism: females from each

habitat being significantly larger than males. According to Dujardin et al. (1998) loss of sexual dimorphism by reduction in female size probably results from competition for food and greater energy expenditure for oviposition, and may be used as a marker for domiciliation. The fact that the present results showed a high sexual dimorphism level may indicate, once more, a low capacity of intradomiciliary colonization in *T. vitticeps*. However, in comparisons between individuals of the same sex and different habitats, none of the differences in size (ACPC) or shape (canonic components) was significant.

RAPD markers have been used in various studies of triatomine population genetics (García et al. 1998, Jaramillo et al. 2001, Dorn et al. 2003, Calderón et al. 2004, Borges et al. 2005, Barbosa et al. 2006). Using analysis of the similarity presented by RAPD profiles, Borges et al. (2005) observed a clear separation of *Triatoma brasiliensis* from the Brazilian state of Ceará into three samples from sylvatic, peridomiciliary and domiciliary habitats. The finding of some specimens with profiles corresponding to another habitat, such as peridomiciliary insects indoors and sylvatic insects in the peridomicile, demonstrated the exchange of triatomines between these habitats, suggesting that the peridomiciliary population acts as a bridge, receiving genes from the sylvatic individuals and passing them on to the domestic ones.

In this study, the UPGMA dendrogram obtained from profiles generated by RAPD showed a unique group including the insects captured in the three environments, randomly distributed without any separation by sex or environment, based on the low genetic distance values found. Formation of a homogeneous group was not evident even in the peridomicile, where colonization occurred, reinforcing the idea of interchange of insects between environments. In Guatemala, Dorn et al. (2003) and Calderón et al. (2004) observed high levels of genetic variability in *Triatoma dimidiata* populations, with  $k$  values of 79.3-100%, and  $H$  of 0.283-0.352. In the present study, we observed much lower values for  $k = 37.71-45.24\%$  and  $H = 0.13-0.15$ , demonstrating a small genetic difference between insects from different habitats. These results coincide with the environmental conditions of Itanhomi, characterized by proximity of the three habitats (intra, peridomestic and sylvatic), absence of domestic bug colonies and reports by the local population of daily household invasions by triatomines.

Isoenzymes may be important population markers for some species of triatomines. Dujardin and Tibayrenc (1985) found three patterns for the enzyme PGM in *Triatoma infestans*, allowing sylvatic and domiciliary populations to be characterized. Pires (1995), comparing populations of *T. infestans* from Bolivia and Brazil, found two patterns for this enzyme among insects from Cochabamba and only one for the Brazilian populations, supporting the hypothesis of genetic simplification as a consequence of passive dispersal in this species, resulting in the selection of extremely homogeneous individuals. Also using isoenzymes, Barbosa et al. (2003) proposed that the hypothetical centre of origin of *Panstrongylus megistus* be expanded to include Minas Gerais and Bahia, based on the assumption that triatomines should present the great-

est variability of habitats. However, in other triatomine population studies based on RAPD and morphometrics, the isoenzymes did not show differences (Dujardin et al. 1987, 1997, 1998, Soares et al. 1999, Borges et al. 2000). In the present study, this marker showed itself to be extremely homogeneous for the three samples studied, in concordance with previous findings.

This is the first report of a *T. vitticeps* population dynamics study involving taxonomic tools. The similarity of RAPD patterns, absence of differences in size and form, clear sexual dimorphism by morphometry and isoenzymatic monomorphism among the individuals of the three habitats together suggest intense movement of the triatomines between them. This species appears unable to establish intradomiciliary colonies, even though it is frequently captured indoors in Itanhomi with high infection rate.

The population dynamics between different environments defines the natural history of the triatomines and the Chagas disease. According to classic epidemiological patterns, artificial environments are usually colonized by wild triatomines (Forattini 1980). The concept of colonization (presence of immature nymphs) is directly related to the ability of different species to adapt to artificial environments, forming close associations with domestic and peridomestic animals as well as to humans (Pereira et al. 2006). In the case of *T. vitticeps*, we are facing a species with unique characteristics, whose contact with man does not seem to be related to the occurrence of intradomiciliary colonies but rather to repeated invasions of dwellings from surrounding areas. Apparently this contact does not result in transmission of *T. cruzi* to man, since the prevalence of Chagas disease in Itanhomi is very low (Camargo et al. 1984). It may be a consequence of the prolonged interval between feeding and defecation in this species (Diotaiuti et al. 1987, Gonçalves et al. 1988, Santos et al. 2006). However one cannot ignore the incursion of this triatomine in houses and thus the importance of epidemiological vigilance, in anticipation of possible behavioural changes in *T. vitticeps* that could increase the risk of *T. cruzi* transmission to the human population.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Nicolas Jaramillo for the comments on the morphometric analysis and to Bruce Alexander for translating the manuscript to English. To Dr Ricardo Lourenço-de-Oliveira for the revision of the text. To the staff of Fundação Nacional de Saúde for helping in collecting the insects, especially Mrs Aloisio Carlos Dias and Clévio Moreira da Silva.

#### REFERENCES

- Abderrazak SB, Guerrini F, Mathieu-Daudé F, Truc P, Neubauer K, Lewika K, Barnabé C, Tibayrenc M 1993. Isoenzyme eletroforese for parasite characterization. In E. Jónh (ed.), *Methods in Molecular Biology. Protocols in Molecular Parasitology*, Hyde Co. Humana Press, Totowa, p. 361-381.
- Apostol BL, Black IV WC, Reiter P, Miller BR 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325-334.
- Barbosa SE 2004. *Biosistemática e Biogeografia de populações de Panstrongylus megistus (Burmeister, 1835) no Brasil*, PhD Thesis,

- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 147pp.
- Barbosa SE, Belisário CJ, Souza RCM, Paula ASP, Linardi PM, Romanha AJ, Diotaiuti L 2006. Biogeography of Brazilian populations of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae) based on molecular marker and paleo-vegetational data. *Acta Trop* 99: 144-154.
- Barbosa SE, Dujardin JP, Soares RPP, Pires HHR, Margonari C, Romanha AJ, Panzera F, Linardi PM, Duque-de-Melo M, Pimenta PFP, Pereira MH, Diotaiuti L 2003. Interpopulation variability among *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) from Brazil. *J Med Entomol* 40: 144-420.
- Barros G, Mayrink W, Salgado AA, Barros RC, Sessa PA 1975. Contribuição para o conhecimento da doença de Chagas autóctone no estado do Espírito Santo. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 17: 319-329.
- Bérenger JM, Blanchet D 2007. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera: Reduviidae; Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 733-736.
- Borges EC, Dujardin JP, Romanha AJ, Diotaiuti L 2000. Genetic variability of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) populations. *J Med Entomol* 37: 872-877.
- Borges EC, Dujardin JP, Schofield CJ, Romanha AJ, Diotaiuti L 2005. Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceará State, Northeastern Brazil. *Acta Trop* 93: 119-126.
- Calderón CI, Dorn PL, Melgar S, Chávez JJ, Rodas A, Rosales R, Monroy CM 2004. A preliminary assessment of genetic differentiation of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) in Guatemala by Random Amplification of Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. *J Med Entomol* 41: 882-887.
- Camargo ME, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC 1984. Inquérito sorológico da prevalência da infecção chagásica no Brasil, 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 26: 192-204.
- Costa JM, Argolo AM, Felix M 2006. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1385: 47-52.
- Costa JM, Felix M 2007. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.
- Costa JM, Freitas-Sibajev MGR, Marchon-Silva V, Pires MQ, Pacheco RS 1997. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 459-464.
- Dias JCP, Feitosa VR, Ferras Filho A, Rodrigues VLC, Alencar SA, Sessa PA 1989. Fonte alimentar e potencial vetorial do *Triatoma vitticeps* com relação a doença de Chagas Humana no estado do Espírito Santo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 165-173.
- Dice LR 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Diotaiuti L, Bronfen E, Perillo MM, Machado GBM, Lioioli CF 1987. Aspectos do comportamento biológico do *Triatoma vitticeps* na transmissão da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 87.
- Dorn PL, Melgar S, Rouzier V, Gutierrez A, Combe C, Rosales R, Rodas A, Kott S, Salvia D, Monroy CM 2003. The Chagas vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is panmictic within and among adjacent villages in Guatemala. *J Med Entomol* 40: 436-440.
- Dujardin JP, Bermudez H, Casini C, Schofield CJ, Tibayrenc M 1997. Metric differences between sylvatic and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol* 34: 544-551.
- Dujardin JP, Schofield CJ, Tibayrenc M 1998. Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Med Vet Entomol* 12: 20-29.
- Dujardin JP, Tibayrenc M 1985. Etudes isoenzymatiques du vecteur principal de la maladie de Chagas: *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Ann Soc Belg Med Trop* 65 (Suppl. 1): 165-169.
- Dujardin JP, Tibayrenc M, Venegas E, Maldonado L, Desjeux P, Ayala FJ 1987. Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J Med Entomol* 24: 40-45.
- Ferreira E, Souza PSA, Filho MF, Rocha I 1986. Nota sobre a distribuição geográfica do *Triatoma vitticeps* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Mal D Trop* 38: 11-14.
- Forattini OP 1980. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Rev Saúde Públ* 14: 265-299.
- Galvão C, Ângulo VM 2006. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander, Colômbia. *Zootaxa* 1241: 61-68.
- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jubert J 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- García AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Stothard JR, Frame IA, Valente SAS, Miles MA 1998. Random Amplification of Polymorphic DNA as a tool for taxonomic studies of triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol* 35: 38-45.
- Gonçalves TCM, Oliveira E, Dias LS, Almeida MD, Nogueira WO, Pires FDA 1998. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*, in the locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 711-717.
- Gonçalves TCM, Victório VMN, Jurberg J, Cunha V 1988. Biologia de *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera: Triatominae). I. Ciclo Evolutivo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 519-523.
- Guillaumin M 1972. Étude biométrique des populations naturelles de *P. carlivae* Rbr et *P. ciasi* Rbr (Lep. Hesperidae). I. Estimation du taux de chevauchement des distributions statistiques de deux populations en relation avec la notion de distance taxonomique. *Arch Zool Exp Gen* 115: 505-548.
- Jaramilho C, Montana MF, Castro LR, Vallejo GA, Guhl F 2001. Differentiation and genetic analysis of *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius colombiensis* by rDNA and RAPD amplification. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1043-1048.
- Jaramilho NO, Castillo D, Wolf ME 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 667-673.
- Kumar S, Tamura K, Nei M 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163.
- Martínez E, Chávez T, Sossa D, Aranda R, Vargas B, Vidaurre P 2007. *Triatoma boliviana* sp. n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål, 1859. *Bol Inst Invest Salud Desar* 3: 1-11.
- Nei M 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Noireau F, Flores R, Gutierrez T, Vargas K 1999. Triatomi em Bolívia: Importancia actual de los vectores. *La Enfermedad de Chagas en*

- Bolivia. *Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002)*, Ministerio de Salud y Previsión Social, La Paz, Bolivia, 259 pp.
- Pereira MH, Gontijo NF, Guarneri AA, Sant'Anna MRV, Diotaiuti L. 2006. Competitive displacement in Triatominae: the *Triatoma infestans* success. *Trends Parasitol* 22: 516-520.
- Pinto AFS, Santos UM, Murad V, Lima FEP, Zaganelli FL, Almeida AZ. 1969. Doença de Chagas no Estado do Espírito Santo. V – Primeiro caso de Chagas diagnosticado no Município de Alfredo Chaves, E.S. *Rev Soc Bras Med Tropical* 3: 53.
- Pinto AFS, Vieira NER, Milanez MC, Lima Pereira FE, Sessa PA. 1986. Doença de Chagas autóctone no Espírito Santo: relato de caso agudo em gestante com transmissão para o feto. *Rev Soc Bras Med Tropical* 19 (Suppl): 78.
- Pires HHR. 1995. *Estudos comparativos entre duas populações distintas de Triatoma infestans (Klug, 1834)*, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 100pp.
- Romanha AJ. 1982. *Heterogeneidade isoenzimática em Trypanosoma cruzi*, PhD Thesis, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 110pp.
- Sandoval CM, Pabón E, Jurberg J, Galvão C. 2007. *Belminus ferroae* n.sp. from the Colombian north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa* 1443: 55-64.
- Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GEM, Rodrigues AAF, Falqueto A. 2005. Peridomiciliary colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 471-473.
- Santos CB, Leite GR, Sessa PA, Falqueto A. 2006. Dynamics of feeding and defecation in *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) and its potential in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 543-546.
- Santos UM, Pinto, AFS, Zaganelli, FL, Almeida, AZ, Martins A, Carancho PV, Vieira HJ. 1969a. Doença de Chagas no Estado do Espírito Santo. II – Inquérito sorológico. *Rev Soc Bras Med Trop* 3: 51.
- Santos UM, Pinto, AFS, Zaganelli FL, Almeida AZ, Martins A, Carancho PV, Vieira HJ. 1969b. Doença de Chagas no Estado do Espírito Santo. III – Vetores do tripanosoma. *Rev Soc Bras Med Trop* 3: 51-52.
- Santos UM, Pinto AFS, Zaganelli FL, Almeida AZ, Martins A, Carancho PV, Vieira HJ. 1969c. Doença de Chagas no Estado do Espírito Santo. IV – primeiro caso de Chagas diagnosticado no município de Rio Novo do Sul, ES. *Rev Soc Bras Med Trop* 3: 52-53.
- Sessa PA, Carias VDR. 1986. Infecção natural de triatomíneos do Espírito Santo por Flagelados morfológicamente semelhantes ao *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 19: 99-100.
- Soares RPP, Barbosa SE, Borges EC, Melo Júnior TA, Romanha AJ, Dujardin JP, Schofield CJ, Diotaiuti L. 2001. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, morphometry, isoenzymes, and random amplified polymorphic DNA. *Biochem Genet* 39: 1-13.
- Soares RPP, Barbosa SE, Dujardin JP, Schofield CJ, Siqueira AM, Diotaiuti L. 1999. Characterization of *Rhodnius neglectus* from two regions of Brazil using isoenzymes, genitalia morphology, and morphometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 161-166.
- Takahata N, Nei M. 1984.  $F_n$  and  $G_n$  statistics in the finite island model. *Genetics* 107: 501-504.
- Wilks SS. 1932. Certain generalizations in the analysis of variance. *Biometrics* 24: 471.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)