

**Universidade Estadual Paulista “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara**

André Luiz Rodrigues Menezes

**Identificação e caracterização de espécies de triatomíneos e de tripanossomatídeos
coletados em região de fronteira (Brasil – Bolívia)**

**Araraquara – SP
2023**

ANDRÉ LUIZ RODRIGUES MENEZES

Identificação e caracterização de espécies de triatomíneos e de tripanossomatídeos coletados em região de fronteira (Brasil – Bolívia)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Coorientador: Dr. Jader de Oliveira

**Araraquara – SP
2023**

M543i Menezes, André Luiz Rodrigues.
Identificação e caracterização de espécies de triatomíneos e de tripanossomatídeos coletados em região de fronteira (Brasil – Bolívia) / André Luiz Rodrigues Menezes. – Araraquara: [s.n.], 2023.
106 f. : il.

Orientador: João Aristeu da Rosa.
Coorientador: Jader de Oliveira.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa: Parasitologia.

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. *Trypanosoma rangeli*. 4. *Rhodnius*. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Oliveira, Jader de, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Caracterização de espécies de triatomíneos e de tripanossomatídeos coletados em região de fronteira (Brasil – Bolívia)

AUTOR: ANDRÉ LUIZ RODRIGUES MENEZES

ORIENTADOR: JOAO ARISTEU DA ROSA

COORIENTADOR: JADER DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. KAIO CESAR CHABOLI ALEVI (Participação Virtual)
Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu da Unesp

Prof. Dr. CLEBER GALVÃO FERREIRA (Participação Virtual)
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. DIONATAS ULISES DE OLIVEIRA MENEGUETTI (Participação Virtual)
Universidade Federal do Acre (UFAC)

Araraquara, 30 de novembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha família pelo sustento e apoio.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Unesp/Araraquara, juntamente com os professores João Aristeu da Rosa e Jader de Oliveira, por proporcionarem a possibilidade de obter novos conhecimentos, acerca dos vetores e do agente etiológico da doença de Chagas.

Ao Instituto Federal de Rondônia – IFRO, por conceder meu afastamento, para o aprimoramento dos meus conhecimentos e por todo o apoio na etapa de trabalho de campo e laboratorial.

Aos companheiros do laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Unesp/Araraquara, pela paciência em ensinar a rotina laboratorial.

À professora Dra. Marta Maria Geraldês Teixeira, por abrir a porta do seu laboratório e possibilitar a ampliação das análises do projeto realizadas no Laboratório de Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos, Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP.

Aos colegas Gabriel, Evaristo Junior, Leticia e as técnicas Marta Campaner e Carmem Takata do Laboratório de Taxonomia e Filogenia de Tripanossomatídeos, Instituto de Ciências Biomédicas II– ICB/USP, pelos ensinamentos, paciência e as horas de bom humor.

Às minhas amigas Cícera Costa Rocha e Kally Sousa, por serem minhas terapeutas nas horas de desesperos.

Ao professor Dr. Gabriel Cestari Vilardi da Fundação Universidade Federal de Rondônia do Câmpus de Guajará-Mirim, pelo apoio nessa trajetória e ajuda nas coletas.

A Mariane Ribeiro da Universidade Federal do Acre – UFAC por ser suporte essencial nas etapas de análises dos triatomíneos e tripanossomatídeos, parceria de longas datas. “Ah, se as madrugadas no laboratório falassem...”

Gostaria de agradecer a todos e a todas, que colaboraram de forma direta e indireta com o processo de doutoramento em Araraquara.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de doutorado concedida durante o estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Em 1909, o pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas identificou e descreveu o ciclo completo da doença de Chagas (DC). Essa enfermidade, que leva seu nome, é uma doença negligenciada e confinada, principalmente, aos países latinos – que, de forma geral, são considerados endêmicos. Os triatomíneos são insetos hematófagos vetores da DC e a maioria das espécies ocorre nas Américas. Esses insetos foram notificados, pela primeira vez, no século 15. Atualmente, existem 160 espécies descritas (agrupadas em 18 gêneros), das quais, cerca de 65 espécies foram notificadas no Brasil e 32 na Amazônia brasileira. O agente etiológico da DC é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Neste estudo, foi realizada a identificação e caracterização de espécies de triatomíneos e de tripanossomatídeos coletados em região de fronteira (Brasil – Bolívia). Coletas de triatomíneos foram realizadas em seis regiões do município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil e Guayaramerín, Beni, Bolívia. As coletas foram feitas por buscas ativas em palmeiras, assim como, por meio de armadilhas luminosas e capturas de insetos que invadiram ambientes considerados domiciliares. Para identificação das espécies, utilizou-se de caracteres morfológicos, por intermédio de chaves dicotômicas. A identificação de tripanossomatídeos foi efetuada em microscopia ótica (MO) e por biologia molecular, pelo método *Fluorescent Fragment Length Barcoding* (FFLB). Foram capturados 1.232 espécimes de triatomíneos, dos seguintes estágios evolutivos: NI- 72; NII-94; NIII-128; NIV-146; NV-190 e adultos (602), para isso utilizamos chaves ditocômicas. Os triatomíneos coletados em palmeiras encontravam-se, predominantemente, em *Attalea speciosa*, embora, também em *A. maripa* e *Oenocarpus bataua*. Após as coletas, os triatomíneos foram examinados por MO, para investigar a presença de tripanossomatídeos. Posteriormente, foi extraído o DNA, para as análises moleculares. As espécies capturadas foram *P. lignarius*, *P. geniculatus*, *R. montenegrensis*, *R. pictipes*, *R. robustus* e *R. stali*. Por MO, cerca de 13% foram positivos à presença de tripanossomatídeos. No entanto, a taxa de infecção para tripanossomatídeos, por meio de PCR foi de 58,29% (549 insetos adultos examinados). Desses, 45% estavam infectados, somente por *T. cruzi* e 39,81% com infecção mista com *T. rangeli*. Com relação à genotipagem, 32,81% foram positivos para TcI, 21,25% para infecção mista (TrA+TcI), 15,63% para TrA e 15% para infecção mista (TrA+TcI+TcIV). O estudo possibilitou detalhar as distribuições dos triatomíneos e tripanossomatídeos em regiões de fronteira (Brasil – Bolívia), o que poderá subsidiar ações de vigilância na região estudada.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Rondônia; *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma rangeli*; *Rhodnius*.

ABSTRACT

In 1909, researcher Carlos Ribeiro Justiniano Chagas identified and described the cycle of Chagas Disease (CD). This disease, which bears his name, is a neglected disease confined mainly to Latin countries that are considered endemic. Triatomines are insect vectors of CD and most species occur in the Americas, but some appear on other continents. These insects, were reported for the first time in the 15th century. Currently, there are around 160 described species (grouped into 18 genera), with around 65 species reported in Brazil and 32 in the Brazilian Amazon. The etiological agent of CD is the flagellated protozoan known as *Trypanosoma cruzi*. The main objective of the study was to identify and characterize species of triatomines and trypanosomatids collected in the border region (Brazil – Bolivia). Triatomine collections were carried out in six regions of the municipality of Guajará-Mirim, Rondônia and included Guayaramerín, Beni, Bolivia. Collections were carried out by active searches in palm trees, as well as by means of light traps and capture of insects that invaded environments considered domestic. To identify the species we used morphological characters based on dichotomous keys. The identification for analysis of trypanosomatids was performed by optical microscopy and for molecular biology the FFLB method. Were captured 1,232 specimens of triatomines, of the following evolutionary stages: NI-72; NII-94; NIII-128; NIV-146; NV-190 and adults (602). The triatomines collected from palm trees were predominantly installed on *Attalea speciosa*, although specimens were also collected on *A. maripa* and *Oenocarpus bataua*. After collection, the triatomines were examined by light microscopy, to investigate the presence of trypanosomatids and their DNA was subsequently extracted to carry out molecular analyses. The species captured were *P. lignarius*, *P. geniculatus* and *R. montenegrensis*, *R. pictipes*, *R. robustus*, *R. stali*. For optical microscopy 13% were positive for the presence of trypanosomatids. The infection rate for trypanosomatids by means of PCR was 58.29% (549 adult insects analysed). Of these, 45% were infected only with *Trypanosoma cruzi* and 39.81% with mixed infection. Regarding genotyping, 32.81% were positive for TcI, 21.25% for mixed infection (TrA+TcI), 15.63% for TrA, and 15% for mixed infection (TrA+TcI+TcIV). The study made it possible to detail the distributions of triatomines and trypanosomatids. The results obtained corroborate preliminary studies carried out in nearby municipalities. This study may support surveillance actions in the region studied.

Keywords: Chagas disease; Rondônia; *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma rangeli*; *Rhodnius*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> (simplificado).....	19
Figura 2. Localidades de coleta no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil.....	23
Figura 3. Coletas de triatomíneos de diferentes localidades do município de Guajará-Mirim, RO.....	29
Figura 4. Coletas de triatomíneos de diferentes localidades de fronteira – Brasil/Bolivia	30
Figura 5. Coletas de triatomíneos com armadilhas luminosas	31
Figura 6. Análise microscópica das fezes e glândula salivar dos triatomíneos.....	33
Figura 7. Análise molecular dos tripanossomatídeos nos triatomíneos	34
Figura 8. Estádios de desenvolvimentos dos triatomíneos do gênero <i>Rhodnius</i>	39
Figura 9. Triatomíneos do gênero <i>Panstrongylus</i> e <i>Rhodnius</i>	40
Figura 10. Palmeiras dissecadas nas áreas coletas do estudo em Guajará-Mirim, Rondônia	40
Figura 11. Espécies de triatomíneos capturadas no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.....	45
Figure 12. Distribuição dos <i>T. cruzi</i> (DTU's) e <i>T. rangeli</i> (linhagens) de acordo com os locais de coleta dos triatomíneos no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reações de amplificação, os oligonucleótidos, os perfis térmicos e tamanhos das bandas esperadas para cada gene.....	36
Tabela 2. Métodos de coleta e número de triatomíneos capturados, no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	38
Tabela 3. Número e percentual de palmeiras dissecadas e triatomíneos coletados, no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	41
Tabela 4. Número e percentual de triatomíneos, em relação aos locais de coletas no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	41
Tabela 5. Número e percentual de espécies de <i>Rhodnius</i> e <i>Panstrongylus</i> coletados no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	42
Tabela 6. Número e percentual de espécies de <i>Rhodnius</i> e <i>Panstrongylus</i> coletados no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	42
Tabela 7. Número absoluto e percentual de triatomíneos coletados de acordo com o estágio ninfal por sexo, espécies de palmeiras e análise microscópica para tripanossomatídeos, no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	43
Tabela 8. Número e percentual das espécies de <i>Rhodnius</i> e <i>Panstrongylus</i> , analisados por microscopia óptica para busca de tripanossomatídeos, no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	44
Tabela 9. Número e percentual de triatomíneos por estágio, sexo e localidade no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	46
Tabela 10. Taxa de positividade para tripanossomatídeos por microscopia óptica de espécies de triatomíneos por localidade no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.....	46
Tabela 11. Número e percentual de positividade com especificação da genotipagem para <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> por espécies de triatomíneos no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.....	48
Tabela 12. Número e percentual de positividade com especificação da genotipagem para <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> por localidade no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.....	49
Tabela 13. Comparação das amostras de triatomíneos adultos analisadas em Microscopia Óptica e Análise Molecular no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.	51

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – TESE DE DOUTORADO	8
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 DOENÇA DE CHAGAS.....	9
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA DC	11
1.3 TRIATOMÍNEOS	13
1.4 TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	17
2 OBJETIVOS	22
2.1 GERAL.....	22
2.2 ESPECÍFICOS	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 LOCAL DE ESTUDO.....	23
3.1.1 Área Urbana.....	23
3.1.2 Comissão de Aeroportos da Região Amazônica - Comara.....	24
3.1.3 Distrito Iata	24
3.1.4 Reserva Extrativista Rio Ouro Preto - Resex Rop	25
3.1.5 Reserva Extrativista do Rio Pacaás Novos – Resex Rio Pacaás Novos	25
3.1.6 Reserva Extrativista Federal Rio Cautário – Resex Rio Cautário.....	26
3.2 COLETAS E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	28
3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA E ISOLAMENTO DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS.	32
3.4 ANÁLISES MOLECULARES	35
3.4.1 Extração de DNA.....	35
3.4.2 <i>Fluorescent Fragment Length Barcoding (FFLB)</i>	35
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
3.6 ASPECTOS ÉTICOS PESQUISAS.....	37
4 RESULTADOS	38
4.1 COLETA DE TRIATOMÍNEOS	38
4.2 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	48
5 DISCUSSÃO	52
5.1 ESPÉCIES DE PALMEIRAS E SUA INFESTAÇÃO.....	52
5.2 ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS	52
5.3 INFECÇÃO DE TRIATOMÍNEOS POR <i>TRYPANOSOMA</i>	59
6 CONCLUSÃO.....	63

7 REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 2 - ARTIGOS PUBLICADO E ACEITO	89
ARTIGO 1 - FIRST REPORT OF <i>RHODNIUS MONTENEGRENSIS</i> (HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE) IN BOLIVIA	90
ARTIGO 2 – FIRST REPORT OF <i>RHODNIUS STALI</i> LENT, JURBERG & GALVÃO, 1993 (HEMIPTERA: REDUVIIDAE: TRIATOMINAE), VECTOR OF <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> (TCI) AND <i>TRYPANOSOMA RANGELI</i> (TRA), IN RONDÔNIA, SOUTHWESTERN BRAZILIAN AMAZONIA	95

CAPÍTULO 1 – TESE DE DOUTORADO

Caracterização de espécies de triatomíneos e de tripanossomatídeos coletados em região de fronteira (Brasil – Bolívia)

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A tripanossomíase americana (TA) ou doença de Chagas (DC), ao longo do tempo atingiu diversas partes do mundo, porém as regiões endêmicas concentram-se nos países pertencentes ao continente da América do Sul e Central (WHO, 2010; Stanaway; Roth, 2015; Pérez-Molina; Molina, 2018; Mendes *et al.*, 2022).

Por conseguinte, a DC foi descrita pelo pesquisador Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, em 1909 (Chagas, 1909). Ao se deslocar para Lassance, interior de Minas Gerais, com o intuito de reduzir o número de pessoas, que trabalhavam na construção da estrada de ferro Central do Brasil e, que estavam acometidas por malária, assim foi possível caracterizar e identificar a nova doença e descrever todo o seu ciclo (Coura, 1997; Galvão, 2014).

Essa enfermidade dispõe como seu agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastea: Trypanosomatida) e o seu principal vetor é um inseto conhecido popularmente como barbeiro, pertencente à subfamília Triatominae (Gorla *et al.*, 2021; Medeiros *et al.*, 2022; Costa-Oliveira *et al.*, 2023).

Nesse contexto, o *T. cruzi* é um protozoário com capacidade de infectar e se instalar em vários organismos, podendo ser patogênico ou não aos seus hospedeiros, assim sua transmissão pode ocorrer de formas variadas como a vetorial, transfusão de sangue, transplantes de órgãos, acidentes de laboratório, bem como oral (dependente e independente dos triatomíneos) e congênita (Rassi Junior *et al.*, 2012; WHO, 2020; Martins-Melo *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2022; Costa-Oliveira *et al.*, 2023).

A transmissão vetorial ainda é uma das principais vias de transmissão da DC nos países considerados endêmicos (WHO, 2020). Nessa forma de transmissão, o triatomíneo infectado libera o protozoário pelas fezes/urina na superfície do seu hospedeiro (uma vez que esses insetos têm o hábito de defecar/urinar durante ou após o repasto sanguíneo), o que pode resultar na entrada do agente etiológico na corrente sanguínea e ocasionar a infecção do vertebrado (Medeiros *et al.*, 2020).

Além da vetorial, outra forma de transmissão, que merece destaque é a vertical (congênita), a infecção ocorre da mãe para o feto no período gestacional. A transmissão acontece, quando a mãe, uma vez contrai a DC e não é tratada, ainda que seja, durante a gestação, aumenta as chances do *T. cruzi* entrar em contato com o feto, assim a criança poderá nascer DC (WHO, 2020). Essa transmissão é a principal forma de propagação da DC nos países considerados não endêmicos (Sanchez *et al.*, 2014; Connors *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2020).

A transfusão ou transplante, por muito tempo, contribuíram efetivamente para o aumento da disseminação da DC, mas, com a implementação de medidas de controle realizadas antes de administrar os fluidos ou órgãos em outra pessoa, favoreceu para a redução dessas vias de infecção (WHO, 2020; Gorla *et al.*, 2022; Mendes *et al.*, 2022; Shikanai-Yasuda, 2022; Hochberg; Montgomery, 2023).

A infecção oral é outra forma bastante comum no Brasil, principalmente na região amazônica (Shikanai-Yasuda, 2012; Magalhães-Santos, 2014; Vergara-Meza *et al.*, 2021). A transmissão pela via oral acontece basicamente do contato humano com alimentos contaminados por *T. cruzi*. A contaminação pode ocorrer de várias formas, desde animais silvestres, que são reservatórios e o manejo inadequado no momento da despolpa das frutas. Assim o homem ao consumir esse alimento possibilita a entrada do agente etiológico da DC no organismo, em que podem levar ao desenvolvimento da doença (Pinto *et al.*, 2009; Magalhães-Santos; Hernández *et al.*, 2020; López-García; Gilabert, 2023).

Além das bebidas, a infecção por *T. cruzi* pode ocorrer pelo consumo de carnes cruas de caças (animais silvestres), prática comum entre os povos originários da América do Sul (Recine; Radaelli, 2015). Atualmente, essa atividade, ainda é realizada, principalmente, pela população da zona rural, pois, em alguns casos os moradores utilizam, como modo de subsistência e, em outros casos vem da necessidade pessoal de se alimentar dos animais silvestres (Sampaio, 2011; Ribeiro; Corção, 2013; Recine; Radaelli, 2015; Sangenis *et al.*, 2015; López-García; Gilabert, 2023).

Dessa maneira, o indivíduo, quando infectado com a DC, seja, por qualquer fonte de infecção poderá desenvolver sintomas ou não, independentemente, em que fase o paciente se encontra. A DC é classificada em duas fases: aguda e crônica (Oliveira *et al.*, 2008; Abreu-Pedra *et al.*, 2017; Dias *et al.*, 2015; Pérez-Molina; Molina, 2018; Perez *et al.*, 2022). A fase aguda é o período, no qual se visualiza com facilidade *T. cruzi* no sangue periférico (Prata, 1990). Quando apresenta sintomas, eles surgem nos primeiros dias ou meses de infecção (Pérez-Molina; Molina, 2018; Sousa *et al.*, 2023). A porta de entrada de *T. cruzi* no organismo humano pode ser visualizada pelo sinal de Romanã, que é o edema bipalpebral, ou o chagoma de inoculação, porém não são tão frequentes e, em alguns casos, com o surgimento de linfadenopatia (WHO, 2010; Brasil, 2019).

Nessa perspectiva, entre as sintomatologias específicas, tem-se a miocardite difusa com vários graus de gravidade, sinais de pericardite, derrame pericárdico, tamponamento cardíaco; manifestações sindrômicas de insuficiência cardíaca, derrame pleural; edema de face,

de membros inferiores ou generalizado; tosse, dispneia, dor torácica, palpitações, arritmias; hepatomegalia e/ou esplenomegalia, de leve a moderada intensidade (Brasil, 2019).

Existem, também casos com surgimentos de sintomas inespecíficos, como dor de cabeça, palidez, dor muscular, dificuldade de respiração, dor abdominal, tosse, erupções de pele, nódulos dolorosos, vômito, diarreia; também podem ocorrer, meningite (principalmente em imunodeprimidos e crianças com menos de dois anos) (WHO, 2010). E, às vezes, por não apresentar sintomas específicos, pois na sua maioria, as pessoas infectadas não procuram o serviço de saúde ou o profissional de saúde desconhece sobre a DC e, consequentemente, a sintomatologia que acomete ao indivíduo (Prata, 1990; Pinto *et al.*, 2004; Chadalawada *et al.*, 2020).

Dessa maneira, a doença tende a se tornar crônica, após dois a quatro meses, assim, o indivíduo perpassa da fase aguda, para a fase crônica (Prata, 1990), caracterizada pela escassez de *T. cruzi* na corrente sanguínea, que se aloja em tecidos, nos quais o parasito possui afinidade: cardíaco, digestivo e neurológico (Marin-Neto *et al.*, 2022). Ainda nessa fase, o indivíduo tem a possibilidade de apresentar algumas formas clínicas, como indeterminadas ou assintomáticas, cardíaca, digestiva e mista (Basqueira *et al.*, 2003; Rassi; Marin-Neto, 2010; Chadalawada *et al.*, 2020; WHO, 2020).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Diante da repercussão da doença e com mais de 100 anos de sua descrição, a DC, ainda é considerada um problema de saúde pública mundial, que precisa ser resolvido, pois estudos apontam que existem, cerca de cinco a 18 milhões de humanos acometidos por essa enfermidade, nos quais podem evoluir a óbito, além disso, cerca de 10 mil pessoas são infectadas anualmente (Stanaway; Roth, 2015; Ciapponi *et al.*, 2020).

Dessa forma, a expansão da doença deve-se, principalmente, pelo fluxo migratório, seja regional (deslocamento do interior do país, para os grandes centros urbanos do próprio país) ou continental (principalmente nos países considerados subdesenvolvidos, como os latinos, para os demais continentes desenvolvidos) (Gorla *et al.*, 2022). A chegada desses imigrantes oriundos de países como Bolívia, Argentina ou Brasil, em países não endêmicos para DC, que não apresentam controle epidemiológico, para essa enfermidade, pois possibilita a transmissão nesses países, por meio de transplante, doação sanguínea e/ou congênita (Gorla *et al.*, 2022; Medeiros, 2022). Nesse contexto, alguns desses países, como Estados Unidos,

possuem regulamentos, nos quais auxiliam na triagem da população, para a doença de Chagas, principalmente os imigrantes (Gorla *et al.*, 2022).

Portanto, acredita-se que os fatos apresentados acima reforçam a necessidade de os indivíduos infectados terem o diagnóstico correto, em tempo de realizar uma farmacoterapia e que leve a cura ou evite as manifestações graves da doença, principalmente nos países pobres (Marin-Neto *et al.*, 2022).

Nesse cenário, dados apontam que, entre os países considerados endêmicos, o Brasil ocupa o terceiro lugar com a maior taxa de incidência para DC (WHO, 2021; Gorla *et al.*, 2022; Medeiros, 2022). Cerca de mais de um a quatro milhões de brasileiros estão infectados com a parasitose e mais de seis mil óbitos anuais (Brasil, 2019; Santana *et al.*, 2021; Martins-Melo *et al.*, 2022; Gorla *et al.*, 2022). Entre as regiões brasileiras pode-se destacar as regiões Norte e Nordeste, que nas últimas décadas apresentaram maior incidência da DC, porém a transmissão vetorial prevalece em todo país (Andrade *et al.*, 2011; Brasil, 2019; Martins-Melo *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2021; Medeiros, 2022).

Os dados epidemiológicos apresentados acima, podem estar subestimados, devido, principalmente, pela dificuldade do diagnóstico correto. Pois, sabe-se que existem projeções, nas quais apontam um número bem maior de pessoas infectadas com *T. cruzi*, assim como essas e outras ações podem contribuir para diminuir o número de subnotificações, além de tratar os casos, diminuindo as morbidades da doença e contribuindo, para a redução do impacto social e econômico, assim como incentivar o surgimento de novas pesquisas, que envolvam a DC (Ramos-Junior; Sousa, 2017; WHO, 2022; Ramos *et al.*, 2022).

Para contribuir com a melhora dos dados registrados da DC, pesquisadores instituíram o Dia Mundial das pessoas afetadas pela doença de Chagas, com intuito de dar maior visibilidade da DC ao mundo e visibilidade dos impactos, que a enfermidade causa ao seus acometidos (Dias *et al.*, 2016; Kropf; Lima, 2020; Ramos *et al.*, 2022). Assim, foi estabelecido pela 72ª Assembleia Mundial da Saúde, em maio de 2019 o dia mundial da doença de Chagas, que ocorreu em 19 de abril (WHO, 2019).

Os dados levantados, sobre a região Norte do Brasil compreende sete estados: Acre (AC), Amazonas (AM), Amapá (AP), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR) e Tocantins (TO). Com base nos dados do período de 2009 a 2019, obtidos no Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - DATASUS, essa região apresenta o registro 2.353 casos de DC e esse valor é considerado elevado, quando comparado com o somatório das demais regiões, que não chega a atingir 5% do total dos casos registrados (Moraes *et al.*, 2021).

Os dados levantados, acerca da DC na região Norte, a maioria desses casos aconteceram no estado do Pará, seguido pelo Amapá, ambos ocorreram pelo consumo da bebida da fruta açaí contaminada com *T. cruzi* (Moraes *et al.*, 2021). No estado de Rondônia, a partir do levantamento nota-se, que em 22 anos (2001 a 2021), há o registro de apenas 41 casos da doença de Chagas Aguda - DCA (Brasil, 2023) e outro estudo realizado em 2011 na região rural do município de Monte Negro aponta, que das 344 amostras de soros dos participantes, que foram analisadas, apenas quatro apresentaram positividade para *T. cruzi* na fase crônica e as pessoas acometidas eram oriundas de outros estados brasileiros tidos como endêmicos, faixa etária de 24 a 57 anos (Carvalho *et al.*, 2011; Brasil, 2020). Pode-se inferir, que ao compor os dados epidemiológicos, sobre a transmissão via oral, o Brasil é apontado como o país com maior número de casos relatados, para essa via de infecção (López-García; Gilabert, 2023).

Os números sobre a DC, apresentados até o momento indicam, que não há nenhum relato de chagásico na microrregião de Guajará-Mirim no estado de Rondônia, o que não quer dizer, que não há pessoas acometidas com a doença na região, já que se tem dados preliminares, que apontam a presença de triatomíneos contaminados por tripanossomatídeos. Outro fato é a proximidade da região com a cidade *Guayaramerín*, Bolívia, em que há registro de micro surtos com 14 pessoas infectadas pelo consumo de suco de patauí (jugo de majo), extraído do fruto da palmeira *Oenocarpus bataua*, que estava contaminado com *T. cruzi* (Santalla *et al.*, 2011; Rojas-Cortez *et al.*, 2016; Depickère *et al.*, 2022).

1.3 TRIATOMÍNEOS

Os triatomíneos pertencem ao reino Animal, filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Rocha, 2016; Alevi *et al.*, 2021; Mwangi *et al.*, 2022). Atualmente, há 160 espécies descritas no mundo, sendo três delas fósseis, divididas em cinco tribos (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini) e 18 gêneros, sendo eles: *Alberprosenia*, *Belminus*, *Bolboderia*, *Microtriatoma*, *Parabelminus*, *Cavernicola*, *Psammolestes*, *Rhodnius*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Hermanlenticia*, *Linshcosteus*, *Mepraia*, *Nesotriatoma*, *Panstrongylus*, *Paratriatoma*, *Triatoma* e *Paleotriatoma* (Gil-Santana *et al.*, 2022; Menezes *et al.*, 2022; Alevi *et al.*, 2021; Dale *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023).

Os triatomíneos estão amplamente disseminados nas Américas, principalmente, entre a América Central e Sul, porém há espécies que ocorrem na América do Norte, Oceania, Europa, Ásia e África (Dujardin *et al.*, 2015; Eberhard *et al.*, 2020).

Em relação, ao desenvolvimento os triatomíneos possuem ciclo de reprodutivo incompleto e classificados como hemimetábolos (ovo-ninfas-adulto). Após a deposição dos ovos pela fêmea, a incubação ocorre de 10 a 40 dias, sofrendo variações, por conta da temperatura, do ambiente e das espécies (Barata, 1981; Catalá *et al.*, 2017; Mwangi *et al.*, 2022). Com a eclosão dos ovos, têm-se as ninfas no estágio I e, conforme ocorre a alimentação sanguínea se desenvolvem, até atingir a fase adulta (Ponair, 2005; Catalá *et al.*, 2017; Alejandre-Aguilar *et al.*, 2023). Todos os cinco estádios ninfais, assim como adultos, fêmeas e machos podem transmitir o *T. cruzi*, exceto pelos ovos (Alejandre-Aguilar *et al.*, 2023).

Por conseguinte, os triatomíneos, possuem a capacidade de se dispersar por uma variedade de ambientes. Assim sua dispersão é classificada como passiva e ativa, na passiva ocorre o transporte de estádios imaturos, como a aderência de ovos em aves ou, até mesmo, em objetos humanos, já a dispersão ativa ocorre por voos (adultos) e caminhada do próprio triatomíneo, quando atraídos, seja, pela luz e/ou fonte de alimento (Forattini, 1997; Galvão *et al.*, 2001; Catalá *et al.*, 2017).

Desse modo, os triatomíneos naturalmente vivem em ambiente silvestres, como afloramentos rochosos, tocas, ninhos, troncos caídos e ocos de árvores, entre raízes expostas e sob cascas soltas, em folhagens de palmeiras e em bromélias epífitas e nesses ambientes tem-se a presença constante de animais silvestres homeotérmicos, como marsupiais, edentados, roedores, carnívoros, morcegos e aves que servem de fonte alimentar. Porém com a degradação do meio ambiente e o avanço das populações humanas, algumas espécies de triatomíneos se adaptaram a viver em ambientes domésticos (Galvão; Justi, 2015; Madeira *et al.*, 2020).

Dessa forma, para a vigilância epidemiológica, a atenção deveria ser voltada, para os triatomíneos, que se apresentam em habitações humanas, principalmente, as choupanas ou casas de pau-a-pique, cobertura como palha ou telhados, tão comuns na América Latina (Sanmartino; Crocco, 2000; Briceño-León, 2009; Lima *et al.*, 2012; Galvão, 2014; Gorla; Noireau, 2017; Araújo, 2018; Crocco *et al.*, 2019).

A disseminação dos triatomíneos possibilita o surgimento de casos da DC, já que todas as espécies descritas, em potencial, podem veicular o *T. cruzi* (Garcia *et al.*, 2010; Castillo-Neyra *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2023). E pela capacidade de adaptação ao local, em que colonizam e proporcionam a sua reproduzibilidade em três principais ambientes: domésticos, peridomiciliares e silvestres (Deane, 1964; Guhl; Vallejo, 2003). Dentre os 18 gêneros,

Triatoma, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, são considerados de maior importância epidemiológica na América Latina (Cavassin *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2018).

Dentre os três gêneros com maior diversidade, há relatos da presença desses vetores em ambientes domésticos e peridomésticos, conforme descritos por pesquisadores da área. Há também triatomíneos, que possuem a capacidade de domiciliação, como acontece com *R. stali* na Bolívia e *R. prolixus* na Venezuela (Dias, 1953; Schofield, 1989; Matias *et al.*, 2003; Schofield; Galvão, 2009 Hashimoto; Schofield, 2012). A constatação de espécies de *Rhodnius*, em ambiente não silvestre (buscando locais domésticos/peridomésticos), elevam o risco de transmissão da enfermidade chagásica (Gurgel- Gonçalves *et al.*, 2008; Abad-Franch *et al.*, 2009; Mosquera; Lorenzo, 2020).

A identificação dos triatomíneos é feita, a partir das observações dos caracteres morfológicos, observados na cabeça e pronoto, especialmente, contribuem, para a distinção imediata, entre os gêneros e as espécies descritas (Lent; Wygodzinsky, 1979). Além disso, o uso de órgãos reprodutores, têm sido uns dos caracteres utilizados, pois apresentam grande eficácia no processo identificatório, porque são órgãos altamente variáveis o que possibilita a distinção, entre as espécies com mais precisão (Galvão, 2020). A revisão realizada por Lent & Wygodzinsky (1979), com a descrição das genitálias do macho e da fêmea enfatiza a validade dos órgãos reprodutores dos machos. Por muito tempo, os caracteres da genitália feminina foram ignorados taxonomicamente, somente em 2010, o estudo detalhado das genitálias de fêmeas comprovou que essa estrutura pode ser utilizada, para a identificação específica com precisão (Rosa *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2014; Rosa *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018; Galvão, 2020). Outras técnicas podem ser implementadas, como a citogenética, morfométrica ou biologia molecular, que contribuem, sobretudo, na elucidação de novas espécies, espécies semelhantes ou subespécies, as quais necessitam de estudos aprofundados, até sua real identificação, evitando registros equivocados e/ou errôneos (Galvão, 2020; Ravazi *et al.*, 2020).

O gênero *Rhodnius*, desde a sua descrição apresenta importância epidemiológica, o que justifica, em ser um dos gêneros mais estudados, outro motivo é a dificuldade da diferenciação, entre as espécies que compõem o grupo (Lent; Jurberg, 1969; Lent; Wygodzinsky, 1979; Galvão *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2020). *Rhodnius* de maneira geral apresenta as seguintes características, comprimento total entre 11-26 mm, cabeça delgada e alongada, duas ou três vezes mais longa que a largura da cabeça e, em muitos, mais longa que o pronoto, sua coloração varia entre o pardo-amarelado e, em alguns casos apresenta a coloração negra, com manchas castanhas escuras ou pardo-negras, os tubérculos anteníferos

são curtos e inseridos na porção anterior do clipeo (Lent; Wygodzinsky, 1979). Sua preferência por palmáceas, contribui fortemente, para sua disseminação na região amazônica brasileira, em que há uma vasta variedade e abundância de palmeiras (Miles *et al.*, 1983; Gaunt; Miles, 2000; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2014; Julião *et al.*, 2021)

Outro gênero que se faz presente na região amazônica é *Panstrongylus*, no qual apresenta uma ampla distribuição na América Latina, e com elevada plasticidade morfológica, dando-lhe capacidade adaptativa a diversos ambientes silvestres, domiciliares e peridomiciliares. Assim, por essa habilidade atrai atenção dos entomólogos (Schofield; Galvão, 2009; Patterson *et al.*, 2009). Além do mais, relatos apontam associações das espécies desse gênero com mamíferos e aves (Santos *et al.*, 2003). Contudo, suas principais características é o tamanho total de 19 a 39 mm, corpo glabro, ou com pelos curtos e achatados; cabeça, incluindo os olhos, pouco mais longa do que larga, pouco alongada à frente dos olhos; ocelos situados em nítidas saliências do disco na região pós-ocular da cabeça; antenas inseridas junto aos olhos, afastadas do ápice da cabeça (Lent; Wygodzinsky, 1979; Juberg *et al.*, 2014).

Nessa perspectiva, o gênero *Eratyrus*, apesar de não ser considerado de importância epidemiológica, merece atenção, por sua atração por luz artificial, como relatado em estudos realizados no Amazonas e em Rondônia (Castro *et al.*, 2010; Meneguetti *et al.*, 2011). Além da atração pela luz, há outro fato, que se mostra relevante, são os relatos da presença de colônias de *Eratyrus* infectadas com o *T. cruzi* em ambientes domésticos e/ou peridomiciliar, em países que fazem fronteira com o Brasil: como Bolívia, Peru, Venezuela e Colômbia. Há registros de invasões esporádicas em ambientes domiciliares (Noireau *et al.*, 1995; Guhl 2007; Rojas *et al.*, 2008; Torres; Cabrera 2010; Depickère *et al.*, 2012; Obara *et al.*, 2013; Monte *et al.*, 2014). Entender a biologia e a dispersão desse gênero é fundamental, para resguardar a população de um possível surto, seja vetorial ou com alimento contaminado, dada a sua presença em vários estados da região norte do Brasil (Obara *et al.*, 2013; Jesus *et al.*, 2021).

Observa-se a dispersão de triatomíneos na região Amazônica brasileira (Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima, Pará e Tocantins), área que absorvem grande parte do território brasileiro, um levantamento recente relatou a presença de 31 espécies descritas, divididas em nove gêneros (Madeira, 2022). Em Rondônia, foi observada a presença de nove espécies, a saber, *Rhodnius montenegrensis* Rosa *et al.*, 2012, *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão, and Jurberg, 2001, *R. robustus* Larrousse, 1927, *R. pictipes* Stål, 1872, *Eratyrus mucronatus* Stål, 1859, *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), *P. lignarius* (Walker, 1873), *P. megistus* (Burmeister, 1835) e *P. rufotuberculatus* (Champion, 1899). *Rhodnius* é o mais

abundante na região Norte e no estado de Rondônia (Oliveira; Alevi, 2017; Lima-Cordón *et al.*, 2019; Poinar Júnior, 2019; Nascimento *et al.*, 2019).

1.4 TRIPANOSSOMATÍDEOS

A família Trypanosomatidae é constituída por organismos unicelulares e eucariontes (Brenner, 1997; Souza; Barrias, 2020). *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, pertencente à família Trypanosomatidae (Abegg *et al.*, 2017; Ramírez *et al.*, 2018; Moretti *et al.*, 2020). A célula desse parasita compõe-se de várias organelas, entre as quais uma única membrana, assim como uma organela rica em DNA (kDNA), localizada na mitocôndria denominada de cinetoplasto, que concentra todo DNA mitocondrial. O cinetoplasto, além de sua função na célula contribui, para a identificação e diferenciação entre os tripanossomatídeos (Souza; Barrias, 2020).

Em seu processo de desenvolvimento, *T. cruzi* envolve basicamente dois hospedeiros: vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos) (Chagas, 1909). O ciclo de transmissão ocorre no ambiente doméstico, peridoméstico e silvestre, em que o silvestre mantém a relação, entre os triatomíneos e os animais silvestres, relação que há indícios de ocorrer há milhares de anos, é o que denominamos de ciclo enzoótico (Guhlet *et al.*, 1999; Afderheide *et al.*, 2004). O peridoméstico é um ciclo entre o vetor e os animais domésticos e, eventualmente, ocorre com animais silvestres presentes nos arredores do ambiente doméstico (Deane *et al.*, 1984; Coura; Dias, 2009; Coura; Junqueira, 2015).

Nesse contexto, o ambiente doméstico é marcado pela presença dos triatomíneos, em contato com animais domésticos e/ou humanos, a hipótese mais aceitável da presença dos triatomíneos em habitações humanas, se deve pelas alterações ambientais (desmatamento, atividade agrícola e pecuária) e, ao longo do tempo, o vetor precisa se adaptar a esses locais, para conseguir sobreviver. A transmissão, até então, classificada como zoonótica (triatomíneos para animais silvestres), pode ser considerada zooantroponótica, que em linhas gerais é a transmissão do humano, para os animais domésticos, que posteriormente transmite para os animais silvestres (Aguilar *et al.*, 2007; Coura *et al.*, 2007; Coura 2008; Argolo *et al.*, 2008; Coura; Dias, 2009).

Dessa forma, *Trypanosoma cruzi* pode se apresentar fundamentalmente sob quatro formas: epimastigota, tripomastigota, tripomastigota metacíclica e amastigota (Fig. 1). A forma epimastigota é a forma reprodutiva, que ocorre no intestino médio dos triatomíneos, oriunda das formas infectantes tripomastigota metacíclicas e obtidas no momento da

alimentação em fontes infectadas com *T. cruzi*. Assim, a forma epimastigota perpassa por etapas, até retornar novamente a fase tripomastigota metacíclica (Goldenberg; Atilar, 2011; Oliveira *et al.*, 2017).

Dessa maneira, as formas evolutivas de *T. cruzi* podem ser diferenciadas ao examinar a relação núcleo/flagelo. Na forma tripomastigota, o cinetoplasto situa-se na parte posterior do flagelado, em posição terminal ou subterminal, e o flagelo emerge da chamada bolsa flagelar, localizada próxima ao cinetoplasto; nos epimastigotas (formas de multiplicação do parasita no vetor ou em cultura), o cinetoplasto e a bolsa flagelar estão em posição anterior ao núcleo; por fim, as amastigotas (estágios evolutivos que se multiplicam dentro das células hospedeiras) são organismos arredondados, que apresentam flagelos interiorizados (Brenner, 2017; Oliveira, 2017; Souza; Barrias, 2020).

Por meio de estudos moleculares, pesquisadores agruparam as espécies de *Trypanosoma* descritas e semelhantes, em grupos conhecidos com clados, sendo eles aquáticos e terrestres (Stevens *et al.*, 2001; Tibayrenc; Ayala, 2022).

Nessa conjuntura, o clado aquático é composto por tripanossomatídeos observados em anuros, peixes, quelônios, sanguessugas aquáticas e no clado terrestre tem-se tripanossomatídeos de aves, cobras, crocodilianos, lagartos e inúmeras ordens de mamíferos (Viola *et al.*, 2008, 2009; Fermino *et al.*, 2013). Posteriormente, houve o surgimento dos subclados terrestres (Clado crocodiliano, aves, lagartos e serpentes, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*,? *Trypanosoma lewisi*, *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma cyclops*) (Viola *et al.*, 2008, 2009; Fermino *et al.*, 2013).

O clado *T. cruzi* é considerado heterogêneo constituído por uma diversidade de hospedeiros, como algumas espécies de morcegos, triatomíneos e os cimiúdeos (blacklock, 1914; Freitas *et al.*, 1946; Forattini *et al.*, 1990; Salazar *et al.*, 2015; Peterson *et al.*, 2018, Kamani *et al.*, 2022; Lima *et al.*, 2012; Sierra-Rosales *et al.*, 2023). No subgênero *Schizotrypanum* estão inseridas as espécies de *T. cruzi*, *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii* e *T. erneyi* (Marinkelle, 1976; Hoare, 1972; Molyneux, 1991; Marcili *et al.*, 2009; Cavazzana *et al.*, 2010; Hamilton *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012).

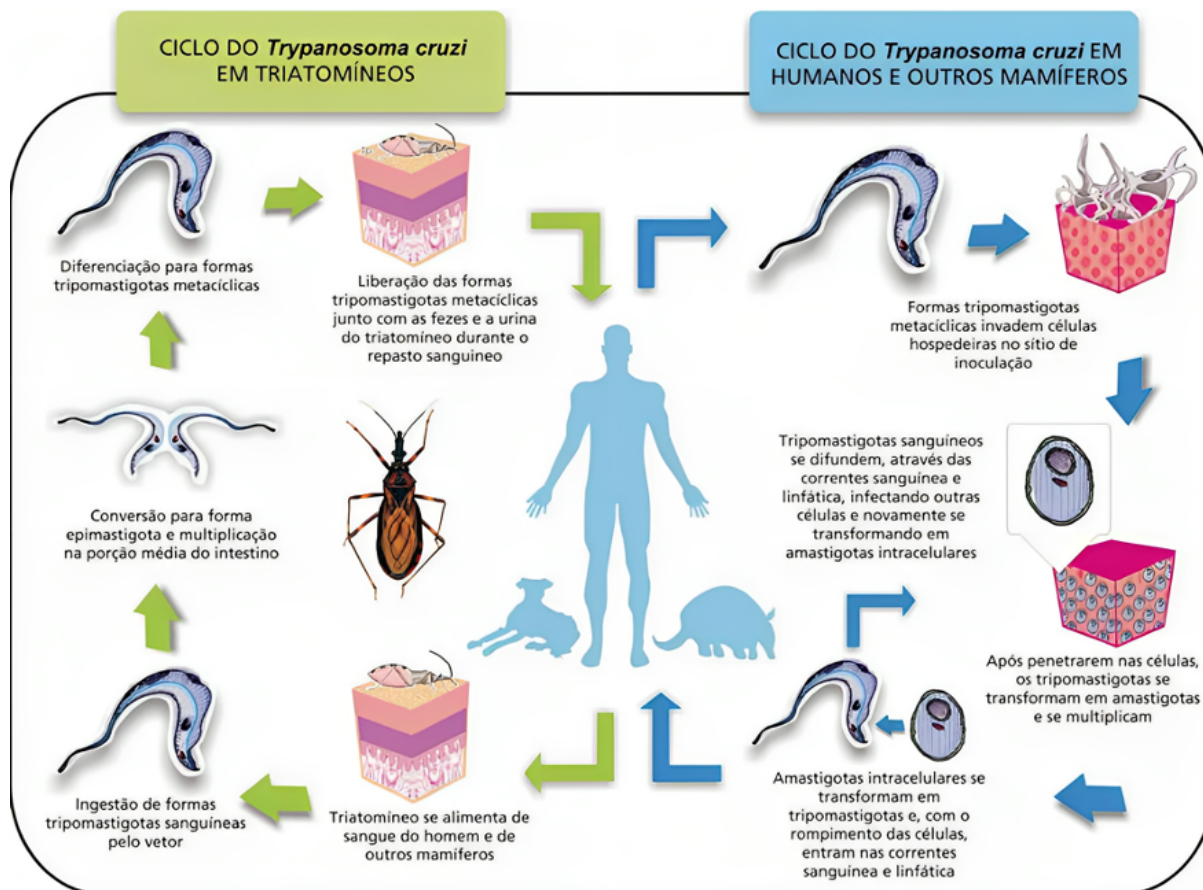


Figura 1. Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz. Fonte: Argolo *et al.*, 2008.

O pesquisador Carlos Justiniano Chagas (1909), em seu primeiro relato apontava uma diversidade fenotípica de *T. cruzi*, em seu processo de desenvolvimento e, posteriormente validada, por outros pesquisadores (Chagas, 1909; Tibayrenc; Ayala, 2002; Andam *et al.*, 2017; Souza; Barrias, 2020). Nesse sentido, é a diversidade genética, que contribui para a disseminação em diferentes hospedeiros (Brenner; Andrade, 1979; Zingales; Bartholomeu, 2022).

Nessa perspectiva, a etapa de reprodução de *T. cruzi* acontece pelo processo de fissão binária, que alguns pesquisadores acreditavam, que não ocorreria trocas de informações genéticas e/ou aconteciam de forma esporádicas, mas estudos atuais apresentam, que esse contato com materiais genéticos diferentes do que lhe compõe, dá abertura, para o surgimento de novas variedades de *T. cruzi* com diferenças genotípicas (Salyers; Shoemaker, 1997; Cabezon *et al.*, 2015; Picon *et al.*, 2023).

Para tanto, *Trypanosoma cruzi* apresenta uma excelente estrutura populacional, que influenciada pelo processo evolutivo (recombinação, mutação, deriva genética, história

demográfica e seleção natural) permite sua perpetuação, até os dias atuais e apresenta inúmeras variedades cepas e capacidade de resistências a fármacos, além de impactar em suas características epidemiológicas (Tibayrenc; Ayala *et al.*, 2002; Gaunt *et al.*, 2003; Lewis *et al.*, 2009; Zingales; Bartholomeu, 2022).

Em 1999, o agrupamento das cepas de *T. cruzi* baseados nas características bioquímicas e moleculares foi feita em dois grupos, quais sejam: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II e, em outro momento, um grupo de pesquisadores discutiu, como iria classificar as cepas consideradas híbridas, pautando-se em novas evidências (Zingales *et al.*, 1999).

No ano de 2009, o mesmo grupo definiu, que as cepas nativas e híbridas de *T. cruzi* deveriam ser agrupadas em Unidades de Tipagem Discreta (DTUs), classificadas em TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI (Tibayrenc, 1998; Zingales *et al.*, 2009; Zingales; Bartholomeu, 2022). Lembrando que *T. cruzi* I passou a corresponder a TcI e TcII agrupou as demais, além do reconhecimento das cepas híbridas (TcV e TcVI) (Zingales *et al.*, 2012, 2018; Freitas *et al.*, 2023). O alinhamento sobre as nomenclaturas da DTUs e o processo de hibridização, entre os genótipos de *T. cruzi*, ainda é objeto de discussões entre seus estudiosos (Zingales; Bartholomeu, 2022).

No mesmo ano de 2009, Marcili e colaboradores em seus experimentos com *Trypanosoma*, que tem como hospedeiro os morcegos, identificaram uma cepa, que se diferencia das demais já descritas (Marcili, 2008). Assim, para confirmação de novas espécies foi necessário utilizar marcadores moleculares como 24Sα rRNA que apresentou 140 pb diferente das linhagens *T. cruzi* I e II (Souto *et al.*, 1996). Lima (2015), em seu estudo permitiu estabelecer a proximidade entre a nova espécie (TcBat) com a DTU TcI. Essa observação é oriunda de morcegos brasileiros, após o relato da cepa TcBat outros estudos realizados em países da América do Sul, detectaram a presença da cepa TcBat nos morcegos da região e em múmias latinas (Chile e Colômbia) (Marcili *et al.*, 2009; Guhl *et al.*, 2014; Ramírez *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015). Pelo exposto tem-se, que, atualmente, (2023) *T. cruzi* pode ser classificado em sete grupos: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI e TcBat (Zingales; Bartholomeu, 2022)

Na região Norte do Brasil, estudos recentes apontam, que ocorre a circulação das DTUs TcI e TcIV em humanos com casos de infecção mista, entre os dois genótipos (Vergara-Meza *et al.*, 2022). Em triatomíneo, também ocorre TcI e TcIV (*R. robustus* e *R. montenegrensis*), com casos de infecção mista e há registros de TcIII, TcIV, TcV em *P. geniculatus* (Julião *et al.*, 2022a; Julião *et al.*, 2022b; Vergara-Meza *et al.*, 2022). Há casos de outros mamíferos com infecção por *Trypanosoma* como cães (*Trypanosoma rangeli*),

morcegos (TcI) e marsupiais (*T. rangeli*) e primatas não-humanos (TcI, TcIV e *T. rangeli*) (Julião *et al.*, 2022; Vergara-Meza *et al.*, 2022).

Na Bolívia, em especial a região do Departamento do Beni (Guayaramerín), que possui laços fronteiriços, como a região de Guajará-Mirim, foi encontrada a presença de TcI e/ou infecção mista de TcI e TcIV, em espécimes do gênero *Rhodnius* (Depickère *et al.*, 2022).

Diante de exposição, ao longo do texto, sobre a doença de Chagas, dos triatomíneos e dos tripanossomatídeos, houve a necessidade de aprofundar os estudos, em relação ao tema na região de fronteira entre Brasil e Bolívia, município de Guajará-Mirim, Rondônia. Os dados, acerca da doença de Chagas, em Guajará Mirim, Rondônia são praticamente inexistentes, ou seja, a população desconhece a realidade da DC no município e Estado.

Por ser uma região fronteira com a Bolívia, em que há relatos de micro-surtos, por infecção oral de bebida contaminada (Santalla *et al.*, 2011) pode favorecer a transmissão da doença, por meio da migração de pessoas infectadas e pela sua proximidade geográfica (devido ao ciclo de vida completo). Além desses fatos, tem-se abundância do principal ecótopo natural de triatomíneos (palmeiras) e a possibilidade, também da transmissão oral com o consumo do açaí e de carne de caça. Desse modo, o aumento das chances da ocorrência da doença, justifica o estudo, com intuito de caracterizar e identificar as espécies de triatomíneos e tripanossomatídeos na região de Guajará Mirim, Rondônia, Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar e identificar as espécies de triatomíneos e de tripanossomatídeos coletados em região de fronteira (Brasil – Bolívia).

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Coletar triatomíneos no município de Guajará-Mirim, Rondônia;
- b) Relatar as ocorrências de triatomíneos na região estudada;
- c) Determinar as taxas de infestação das palmeiras por triatomíneos na área estudada;
- d) Identificar as espécies de triatomíneos coletados na região de fronteira Brasil-Bolívia, por meio de estudos fenotípicos e genotípicos;
- e) Analisar a positividade de infecção dos triatomíneos por tripanossomatídeos;
- f) Identificar as cepas de *Trypanosoma cruzi* e *T. rangeli*, coletadas na área de estudo;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO

3.1.1 Área urbana

O município de Guajará-Mirim, que em tupi-guarani significa cachoeira pequena, tem sua história, intimamente ligada à construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré (TJRO, 2023). Após o tratado de Petrópolis (17 de novembro de 1903), foi construída a estrada de ferro Madeira-Mamoré, dando continuidade ao ciclo da borracha. Guajará-Mirim possui área total de 24.850 km² e faz divisa com a cidade boliviana Guayaramerín do distrito de Beni. Também conta com uma população de aproximadamente 39.400 mil habitantes (IBGE, 2022). Sua população é mais ampla é na região urbana do município e a economia local se baseia em agropecuária, comercial e o funcionalismo público (IBGE, 2022).

Em 13 de setembro de 1943, pelo Decreto-Lei nº 5.812, o município de Guajará-Mirim passou a integrar o Território Federal do Guaporé, criado nessa data. No dia 21 de setembro do mesmo ano, pelo Decreto-Lei nº 5.839, a sua área territorial, somada a uma parte da área territorial do município de Mato Grosso - MT (ex-Vila Bela da Santíssima Trindade) passou a compor o novo município de Guajará-Mirim (Figura 2).

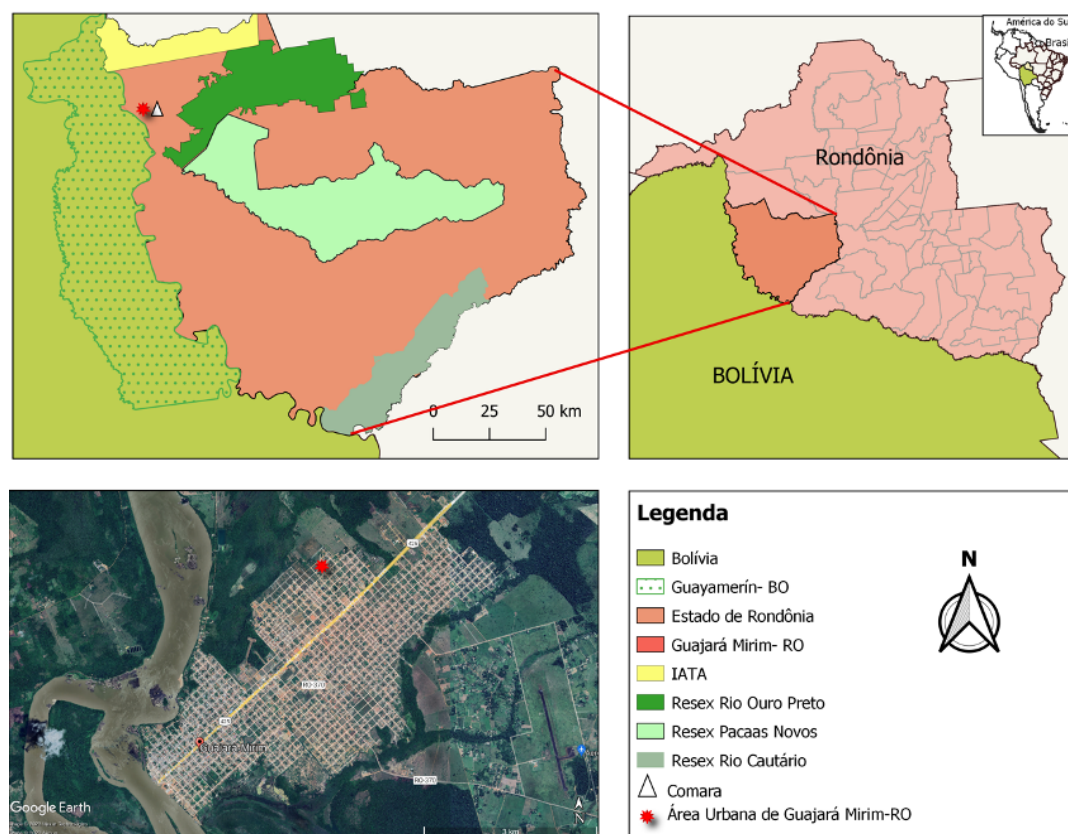


Figura 2. Localidades de coleta no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil.
Fonte: Autor

3.1.2 Comissão de Aeroportos da Região Amazônica - Comara

A região da Comara surgiu de um projeto governamental, para fortalecer as estratégias de defesa e segurança da população das localidades amazônicas, em que o acesso é remoto e/ou de difícil acesso. Além disso Comara, também atua em outras localidades da região amazônica, visando à melhoria da infraestrutura aeroportuária como um todo. A organização desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na integração da região, possibilitando o acesso a áreas remotas e contribuindo para o transporte de pessoas e cargas, estando sob a responsabilidade da Força Aérea Brasileira - FAB (Machado, 2018; FAB, 2023).

Em Guajará-Mirim, parte do território destinado a Comara sofreu movimentos de invasão, desde sua implantação, os invasores são moradores, que já existiam na localidade e moradores Guajará-mirenses em busca de moradia no campo, em consequência essa atividade irregular se intensificou. Hoje parte do território, que inicialmente era pertencente às Forças Armadas, foi destinado aos moradores, pelo processo de legalização via Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária – INCRA, cadastrando e regularizando as terras pelo programa Terra Legal (Governo do Estado de Rondônia, 2015).

A localidade conta, com cerca de 200 moradores em uma área de 1.400 hectares, sendo divididos em Comara I e II. Compete, ainda com a Associação dos Mini-Agricultores da Comunidade Nova Esperança, cuja economia se baseia, principalmente na agricultura familiar e de subsistência com plantações de tubérculos e plantas frutíferas (G1 Globo, 2023).

3.1.3 Distrito Iata

O distrito que atualmente é pertencente ao município de Guajará-Mirim, possui cerca de 12 linhas (estradas rurais) e o centro histórico, seu surgimento se deu, a partir da construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré – EFMM e comunidades agrícolas. Somente, em 1998 pela lei municipal nº 671 houve a criação do distrito, que recebeu o nome, em homenagem ao rio Iata da Bolívia. O povoado fica, cerca de 23 km do município de Guajará-Mirim, acesso pela BR-425 e há várias estradas vicinais, que facilitam o acesso ao município sede e outros municípios do estado de Rondônia. Registra-se, cerca de 500 habitantes, que vivem basicamente da agricultura e da pecuária e sua produção abastece o município sede e o município de Nova Mamoré (Emrondonia, 2022).

3.1.4 Reserva Extrativista Rio Ouro Preto - Resex ROP

A RESEX do Rio Ouro Preto, criada pelo Decreto nº 99.166 de 13/03/1990, está localizada no Estado de Rondônia, nos municípios de Guajará-Mirim e Nova Mamoré. A partir de Guajará-Mirim, chega-se à Reserva pelos rios Mamoré e Ouro Preto ou por estrada, por intermédio de um ramal de 40 Km, no qual leva até o "Lago do Pompeu" às margens do rio Ouro Preto. Com uma área aproximada de 204.631,55 hectares, a RESEX do Rio Ouro Preto limita-se ao Norte com a Terra Indígena Lage e o Parque Estadual de Guajará-Mirim; a Leste com a Terra Indígena Uru-eu-wau-wau; a Sul e Oeste com a Reserva Biológica Estadual do Rio Ouro Preto e a Floresta Estadual Extrativista do Pacaás Novos (ICMbio, 2014; IBGE, 2022).

De acordo com esse cenário, a Resex Rio Ouro Preto possui flora e fauna diversificadas, como é encontrada no bioma da Amazônia. A reserva, ainda conta com pelo menos 100 famílias residentes, que vivem da agricultura familiar e o extrativismo, como forma de economia (ICMbio, 2014; Silva Alves *et al.*, 2018). Nas habitações da reserva, observa-se a presença de estruturas semelhantes a palafitas, que são construídas com o objetivo de proteção contra a subida das águas e de impedir a entrada de animais nas residências. Tais moradias possuem paredes e assoalhos confeccionados, com base na palmeira paxiúba (*Socratea exorrhiza*), sendo cobertos por palhas de inajá (*Attalea maripa*) ou babaçu (*Attalea speciosa*) (Philips, 2001; UCS, 2023).

3.1.5 Reserva Extrativista do Rio Pacaás Novos – Resex Rio Pacaás Novos

Reserva criada pelo Decreto Estadual nº 6953, de 14 de julho de 1995, com uma área de 342.904 hectares ao sudoeste de Rondônia com acesso intercalado entre terrestre e fluvial. Por estrada o acesso acontece pelas rodovias BR-364 (Sentido Acre) e RO-425 (Sentido Guajará-Mirim), por fluvial o acesso se dá pelos rios Mamoré e Rio Pacaás Novos, no entanto nos períodos do inverno amazônico o acesso é mais fácil do que no período de estiagem, devido à baixa dos rios. Seu território possui fronteira com o Departamento de Beni na Bolívia.

Nesse contexto, Resex conta com as localidades: comunidades de Extrema, Rio Novo, Margarida e Encrenca, totalizando cerca de 155 pessoas residentes, distribuídas em 60 colocações, termo este utilizado por seringueiros para descrever uma unidade produtiva formada por pequena clareira aberta na floresta onde vivem, pois praticam extrativismo e

agricultura de subsistência (BNDES, 2006). A faixa etária é de 0 a 64 anos, sendo predominada pelas crianças (0 a 7 anos) e o sexo masculino predomina frente ao feminino.

A localidade possui a Associação dos Seringueiros da Resex Pacaás Novos – Primavera, essa organização funciona com assessoramento, para o uso racional dos recursos naturais da reserva. Ainda contam com o apoio da Organização dos Seringueiros de Rondônia (OSR), do Conselho Nacional de Seringueiros (CNS), da Comissão de Proteção da Resex e da Secretaria de Estado do Desenvolvimento Ambiental de Rondônia (SEDAM).

Nessa conjuntura, a população que reside em Resex possui habitações consideradas precárias construídas com madeiras rústicas e, em sua maioria (cerca de 87%), coberta com palhas oriundas de palmeiras abundantes no perímetro doméstico. Utilizam a floresta, como meio econômico, mediante a produção da agricultura de subsistência e familiar, como, por exemplo, a extração da castanha. A pesca e a caça são outras atividades de sobrevivência dos moradores (Santana, 2007).

Dessa maneira, pela sua diversidade e grande densidade de fauna e flora, existem planos de manejo florestal com rendimento sustentado, para a exploração florestal madeireira e não-madeireira. Podem ser incluídos outros potenciais, que a área possui, como o ecoturismo e o desenvolvimento biotecnológico.

3.1.6 Reserva Extrativista Federal Rio Cautário – Resex Rio Cautário

A reserva é dividida entre federal e estadual, sendo que a unidade sob jurisdição federal se encontra em Guajará-Mirim e a outra parte, que está no município de Costa Marques, tendo como responsável a Secretaria do Estado de Desenvolvimento Ambiental – SEDAM.

Conforme relatório da organização não governamental Índia, em 1994, a reserva tinha uma população de 282 pessoas. No levantamento mais recente realizado pela Associação de Seringueiros de Machadinho D'Oeste - ASM/ASRMT em 2000, foi registrada a presença de 42 famílias. A reserva conta com duas escolas, dois postos de saúde, um rádio amador, duas máquinas de beneficiamento de arroz, uma embarcação comunitária chamada chata, barcos de alumínio, um trator, um caminhão e uma serraria comunitária, responsável pelo processamento da madeira extraída no projeto de manejo (Governo do Estado de Rondônia, 2002).

Nesse ambiente, na área em questão, está sendo executado um projeto de manejo florestal conduzido pela Organização dos Seringueiros de Rondônia - OSR, ASM e Ação Ecológica do Vale do Guaporé - Ecoporé. Devido à presença de posseiros, os limites da reserva foram alterados, resultando em uma redução de 42.000 hectares, em relação à proposta inicial.

A área perdida atualmente é ocupada por 15 famílias de posseiros e três latifundiários. Aproximadamente 6,5% da reserva apresenta modificações, devido à atividade humana (Governo do Estado de Rondônia, 2002).

De acordo com o Diagnóstico das Unidades de Conservação de 2002 (Governo do Estado de Rondônia, 2002) a área, onde foi criada a Reserva Extrativista do Rio Cautário - Resex Rio Cautário existe há cerca de 100 anos, de acordo com a memória coletiva. São cinco seringais, que são explorados de forma sustentável, para a extração de látex e castanha, além do cultivo de açaí, agricultura de subsistência e criação de pequenos animais. Em 1998, a população de Rio Cautário reivindicou a área, para a formação da reserva extrativista, durante o I Encontro de Índios e Seringueiros de Rondônia, realizado em Costa Marques. A justificativa para essa reivindicação foi a presença da população tradicional agroextrativista e a oferta de recursos naturais renováveis.

Em relação aos planos de manejo florestal, estão suspensos em todas as reservas, exceto nessa. Outra peculiaridade da reserva é que a Associação Aguapé é a única entre as associações de extrativistas em Rondônia, que não possui contrato assinado com empresas madeireiras (Diagnóstico, 2005). Em 2004, estima-se que a reserva contasse com 55 famílias, aproximadamente 280 indivíduos (Doria, 2004).

Segundo uma Carta Aberta da OSR e Associações de Seringueiros, a área total dessa reserva seria de 134 mil hectares. Os principais problemas enfrentados são causados pelo fato de que, durante sua criação, algumas pessoas que não eram seringueiros extrativistas permaneceram na área, resultando em questões relacionadas à grilagem de terras, roubo de madeira e peixes, desmatamento ilegal e ameaças contra a vida dos seringueiros (Governo do Estado de Rondônia, 2005).

Nesse cenário, a Resex Federal Rio Cautário foi estabelecida, por meio de um Decreto Presidencial em sete (07) de agosto de 2001 e está sob a gestão do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Localizada na região sudoeste do estado de Rondônia, na fronteira com a Bolívia, abrange uma área de 73.817 hectares e está situada na Microrregião de Guajará-Mirim e na Mesorregião conhecida como Madeira-Guaporé, que inclui os municípios de Guajará-Mirim, Costa Marques e São Francisco do Guaporé (ICMBio, 2017).

Nesse cenário, antes de se tornar uma Resex, o território em questão pertencia ao domínio do Exército Brasileiro. A criação da Resex Rio Cautário Federal ocorreu, principalmente, devido ao engajamento dos seringueiros organizados em associações, especialmente, por intermédio do Conselho Nacional dos Seringueiros (CNS), da Organização

dos Seringueiros de Rondônia (OSR) e da Associação dos Seringueiros do Vale do Guaporé (AGUAPÉ).

No entanto, não se pode separar a Resex Federal do Rio Cautário do contexto de interação extremamente orgânica com a Resex Estadual do Rio Cautário, pois, apesar de serem áreas protegidas gerenciadas por jurisdições diferentes, sua dinâmica, tanto do ponto de vista ambiental, quanto social, não se distingue.

O Decreto Estadual nº 7.028 de 08 de agosto de 1995, possibilitou o surgimento e a concretização da Resex Estadual do Rio Cautário, com área de 146.000 hectares, advinda da luta das associações seringalistas e pressão de instituições estrangeiras, que são financiadoras das atividades de proteção na região. Localizada no limite entre o distrito de Surpresa (pertencente ao município de Guajará-Mirim), Parque Nacional da Serra da Cutia e o município de Costa Marques, que, curiosamente possui um segmento da maior parte da reserva extrativista, porém possui jurisdição diferente, ficando a cargo do governo estadual e não federal. O acesso a reserva é pela área estadual, podendo ser acessada, também por transporte fluvial com pequenas embarcações.

Nesse contexto, o rio que divide a reserva é o rio Cautário, como todo rio Amazônico sofre influência das chuvas e da sazonalidade da região. A economia local era pautada na produção de borracha, mas, atualmente temos o extrativismo como principal atividade econômica. Além da criação de animais, pesca, caça e as plantações para subsistência familiar (ICMBio, 2017).

3.2 Coletas e identificação morfológica

As buscas por triatomíneos foram desenvolvidas em diferentes ecótopos, naturais e artificiais, já conhecidos como habitat desses vetores (Lent; Wygodzinsky 1979; Gaunt; Miles, 2000).

Os métodos envolveram buscas ativas em ecótopos naturais: mata primária e secundária, ocos e bases de árvores de grande porte, copas de palmeiras, árvores caídas, tocas de animais, abrigos de animais, entre outros (Fig. 3 e 4). Para as buscas passivas foram utilizadas armadilhas luminosas (Fig. 5), isto é, pano branco estendido e lâmpada de 250w, instalados por 08 (oito) horas nas florestas dos locais selecionados.

As coletas ocorreram em forma de campanhas nos anos 2019 (julho e dezembro), 2020 (janeiro, julho, agosto, setembro), 2021 (junho e julho) e 2022 (janeiro, fevereiro). As palmeiras foram selecionadas, de acordo com o tamanho (mínimo 10 metros de altura), que

não fosse queimada, com grande abundância de material orgânico nas copas. As derrubadas tiveram autorização dos órgãos de fiscalização (Secretaria Estadual do Meio Ambiente – Sedam, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio e Secretaria Municipal de Meio Ambiente – Semma).

Após a derrubada da palmeira com o auxílio de uma motosserra, observavou-se as brácteas, para verificar se ocorria ou não a saída dos triatomíneos e outros vertebrados. Posteriormente retirou-se uma a uma as brácteas na busca pelos insetos (coleta, armazenamento e transporte de Reduviídeos autorizadas pelo ICMBio) (Figura 3 e 4).



Figura 3. Coletas de triatomíneos de diferentes localidades do município de Guajará-Mirim, RO. Legenda: A, B, C, D - Derrubada, dissecação de palmeira e captura de triatomíneos em território brasileiro. **Fonte:** Autor

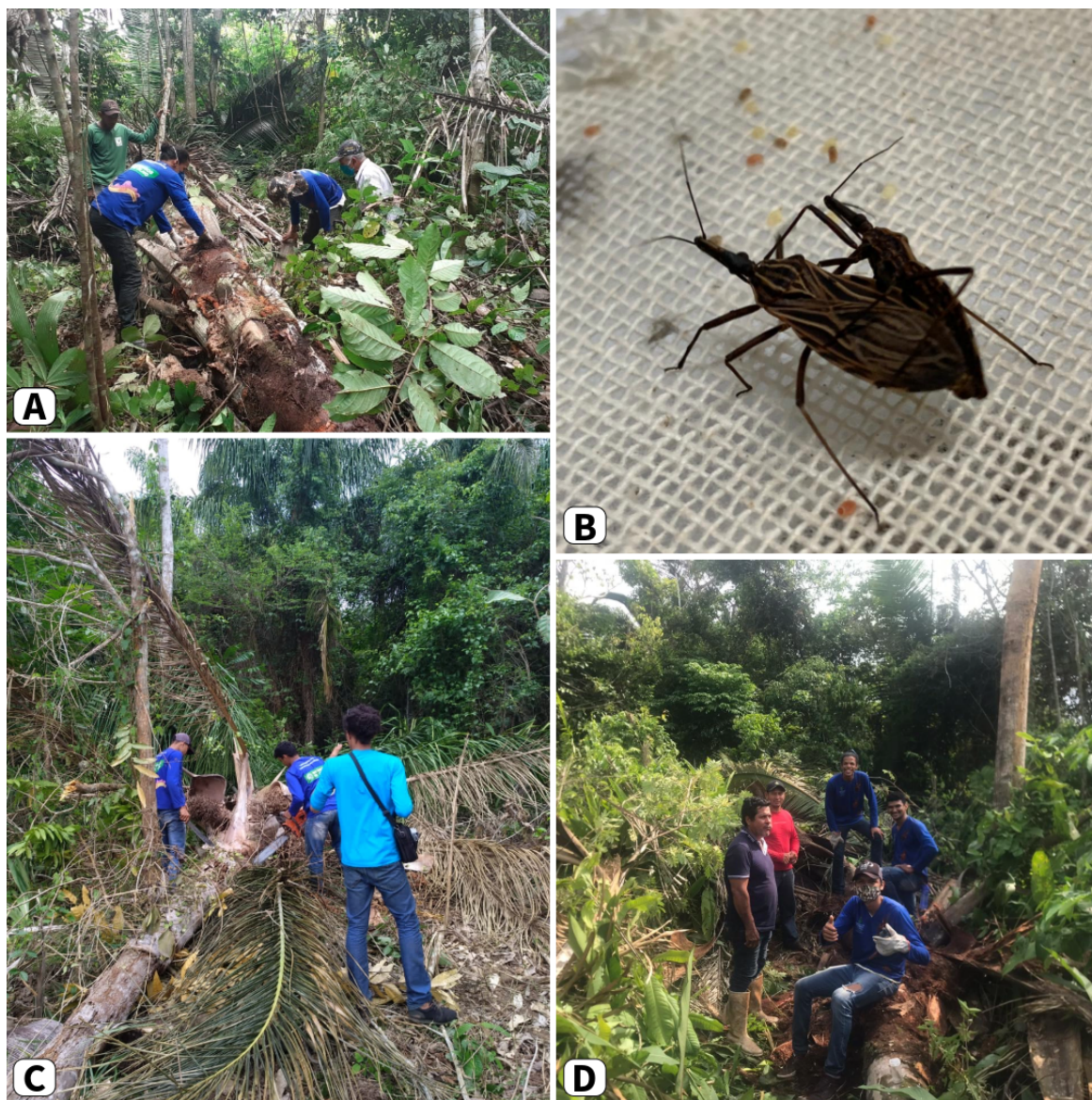


Figura 4. Coletas de triatomíneos de diferentes localidades de fronteira – Brasil/Bolívia
Legenda: A, C - Derrubada, dissecação e captura de triatomíneos em palmeiras em território brasileiro. B – Cópula dos triatomíneos após captura. C -Derrubada, dissecação e captura de triatomíneos na Bolívia. **Fonte:** Autor

As armadilhas luminosas eram instaladas por volta das 17:30 até às 01:00 da madrugada, ficava-se observando o pano estendido, para possível pouso do inseto e, consequentemente captura do espécime. Outra forma de coleta passiva é a intrusão de insetos em ambientes residenciais e comerciais, que foram entregues pela população local (Figura 4).



Figura 5. Coletas de triatomíneos com armadilhas luminosas. Legenda: A- Equipe da coleta na montagem de armadilhas. B, C e D - Armadilhas instaladas e em funcionamento. **Fonte:** Autor

Os triatomíneos coletados, ainda no campo eram armazenados em potes plásticos com telas para a aeração, em seguida eram identificados com as informações da coleta. A localização de todos os ecótopos investigados foi determinada com o auxílio de aparelho receptor do sistema de posicionamento global (*GPS*). Os triatomíneos capturados foram levados ao laboratório de Ciências do Instituto Federal de Rondônia – IFRO campus Guajará-Mirim, para identificação preliminar, estágio ninfal e alimentação dos insetos por ratos da espécie *Rattus norvegicus* (CEUA\IFRO N°009/2019). Os insetos vivos ou mantidos em álcool absoluto, eram transportados ao laboratório de Parasitologia do Departamento de Ciências

Biológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, campus Araraquara – São Paulo.

No laboratório de Parasitologia realizou-se a confirmação das espécies, reafirmando os estágios de desenvolvimento, sexagem de ninfas e adultos, para tanto utilizou-se chaves dicotômicas e publicações (Lent; Wygodzinsky, 1979; Abad-Franch *et al.*, 2013; Jurberg *et al.*, 2014; Rosa *et al.* 2012; Souza *et al.*, 2016). Os insetos foram mantidos vivos com a alimentação em camundongos *Mus musculus* da raça *Swiss*.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS PALMEIRAS

As palmeiras selecionadas foram identificadas, preliminarmente, utilizando chaves de identificação descritas por Lorenzo e colaboradores (1996). Nesse processo foi considerado caule, copa, frutos, formação das folhas das palmeiras dissecadas no estudo. Posteriormente os itens de cada palmeira foram enviados ao herbário da Fundação Universidade Federal de Rondônia do Câmpus de Porto Velho, para a confirmação específica das palmeiras.

3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA E ISOLAMENTO DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS.

Para análises microscópicas gotejou-se de 2 ou 3 gotas de fezes em lâminas com solução salina 0,9% e lamínula, sendo visualizados primeiramente no microscópio Zeiss, modelo Primo, Star iluminação de LED em objetiva de 10x e posteriormente na objetiva de 40x, para confirmação de tripanossomatídeos (Figura 6). Não foi possível observar todos os espécimes coletados, por falta de conteúdo intestinal. Em caso de positivo diluiu-se a amostra em 100 ul de solução salina e em um tubo de ensaio com rosca, adicionou-se 4 ml de meio de cultura *liver infusion tryptos* - LIT (Camargo, 1964) e a solução diluída, incubados na estufa de Demanda Bioquímica do Oxigênio - BOD em 28° C.

Os tubos eram avaliados diariamente nos primeiros 20 dias e após, se a cultura se mostrasse positiva, realizava-se o repique das culturas pela retirada de 1 ml para repique em tubo com 4 ml de meio LIT novo. A seguir incubava-se novamente e examinava-se a cada 15 dias. Repetiu-se esse último processo, até a eliminação dos contaminantes e isolamento do tripanossomatídeos para caracterização e identificação.

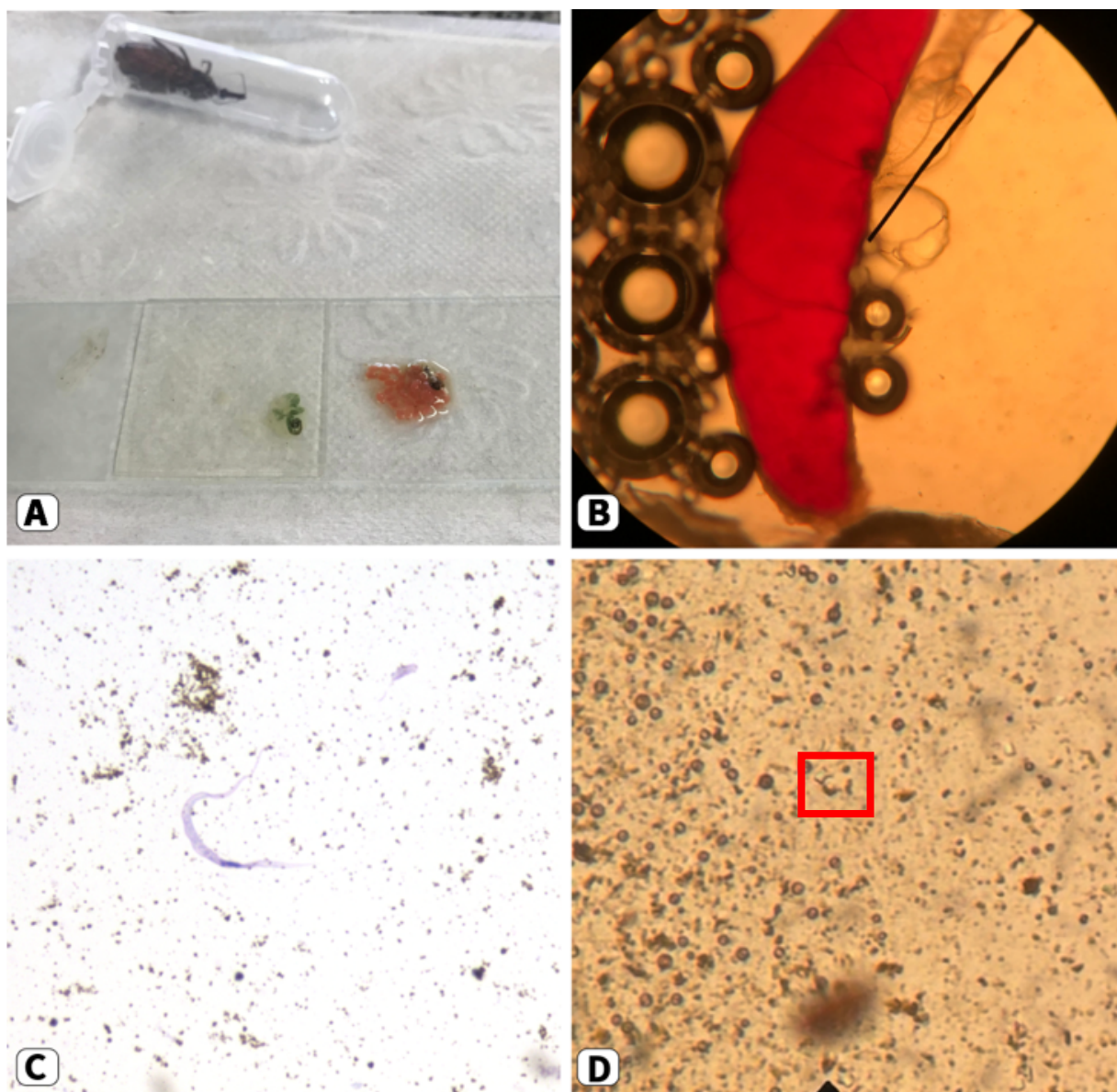


Figura 6. Análise microscópica das fezes e glândula salivar dos triatomíneos. A - Lâmina com parte do trato digestivo do triatomíneo e ovos. B - Glândula salivar do triatomíneo, para busca de *T. rangeli*. C - Forma epimastigota em fezes do triatomíneo, sugestivo para *T. rangeli*. D - Formas tripomastigota em fezes de triatomíneos. **Fonte:** Autor

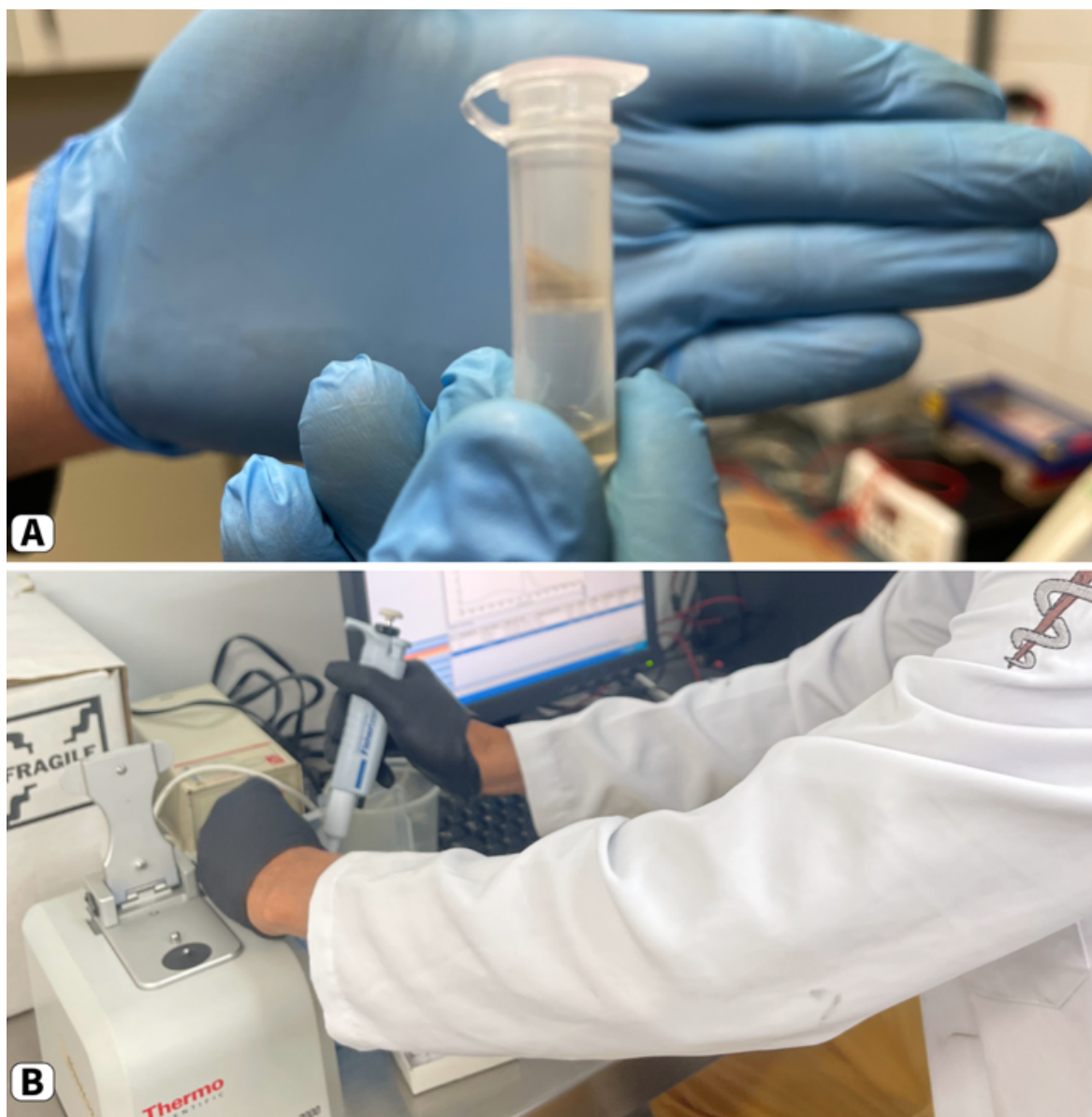


Figura 7. Análise molecular dos tripanossomatídeos nos triatomíneos. A - Extração de DNA total para análise molecular. B- Pureza e concentração do DNA no Nanodrop. **Fonte:** Autor

3.4 ANÁLISES MOLECULARES

Com a finalidade de análise molecular dos insetos, para identificação dos tripanossomatídeos, separou-se os triatomíneos, de acordo com as áreas de coleta. Nesse sentido dividiu-se os espécimes em seis (06) grandes áreas de coletas com um total de 600 indivíduos adultos.

3.4.1 Extração de DNA

Os insetos mantidos em álcool absoluto a -20 °C, foram secos com papel toalha e com o auxílio de pinças esterilizadas, retirava-se o abdômen dos insetos e raspava-se as vísceras. O material retirado do inseto (fezes, tubo digestivo e/ou sangue), era colocado nos microtúbulos de 2.0 ml, em que era adicionado 300 uL da solução Digsol Buffer, fazendo a maceração e adicionando a proteinase k (10 mg/ml). Após essa etapa incubava-se overnight (12 a 14 horas a 37 °C). Finalizando essa etapa seguia-se para segunda etapa, que envolvia adição de 400 µl de acetato de amônia 4 M, homogeneizando-se os tubos em vórtex, durante 15 minutos e fazendo pausas, nesse período. Passando a etapa de agitação, centrifugava-se (15 min, 14.000 rpm), o sobrenadante foi precipitado em etanol absoluto e depois lavado em etanol 70% (Fig 7). Após secagem a temperatura ambiente, os pellets foram ressuspensos em 20-40 µl de água estéril e estocados a -20 °C até o seu uso.

3.4.2 FFLB (*Fluorescent Fragment Length Barcoding*)

Os DNA extraídos foram inicialmente analisados pela técnica FFLB, que se baseia na amplificação de quatro regiões variáveis dos genes 18S e 28Sα rRNA, que identificam ou discriminam espécies de *Trypanosoma* pelo polimorfismo observado (Hamilton *et al.*, 2008). As reações de PCR foram realizadas de forma individual e, em cada uma delas, apenas um *primer* foi marcado com fluorocromo específico. A descrição dos *primers* utilizados e o protocolo das reações no termociclador constam da Tabela 1.

Desse modo, finalizadas as amplificações por PCR, por gel de agarose 2%, visualizava-se, o produto da reação molecular, para verificar se o processo ocorreu de forma correta. Em caso de resultado positivo as amostras foram analisadas pelo sequenciamento do instrumento ABI 3500 (*Applied Biosystems*). Os dados advindos do sequenciador, possibilitam avaliar os tamanhos dos fragmentos de cada uma das quatro regiões, visualizadas pelo

software GeneMapper v. 4.0 (*Applied Biosystems*), no qual cada fragmento possui perfis específicos, para cada espécie de *Trypanosoma*, assim pode-se identificar com bastante confiança os resultados. Esses padrões são comparados com espécies de referência ou respectivos genótipos, para determinar com precisão a identidade das amostras analisadas (Tabela 1).

Tabela 1. Reações de amplificação, os oligonucleótidos, os perfis térmicos e tamanhos das bandas esperadas para cada gene.

Reação de amplificação	Primers	Perfil de amplificação	Tamanho esperado
FFLB	18S1(Azul)		
	18S-1f: 5' ACCGWTTTCGGCTTTTGTGTTGG 3'	95°C 90 seg	
	18S-2r: 5' CGGTCTAAGAATTTACCTC 3'	95°C 30 seg	Variável
		62°C 30 seg	depende da
	18S3(Verde)	30 ciclos	espécie alvo
	18S-3f: 5' GACCRTTGTAGTCCACACTG 3'	72°C 60 seg	
	18S-4r: 5' CCCCCTGAGACTGTAACCTC 3'		
	28S1(Azul)		
	28S-1f: 5' GAAAGAGAGTGACATAGAAC 3'		
	28S-2r: 5' TGTTTCAAGACGGGTGGGGGC 3'		
	28S3(Negro)		
	28S-2f: 5' CCCCCACCCGTCTTGAAACA 3'		
	28S-3r: 5' GGGTCCAAACAGGCACACTC 3'		

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados coletados foram integrados a uma planilha de Excel, contendo as seguintes informações: data, localidade, local encontrado (palmeira/armadilha/intra/peridomicílio), exemplares (adulto/ninfa), quantidade de exemplares, gênero, espécie, positividade para tripanossomatídeos e coordenadas geográficas.

Nesse enquadramento, para a análise descritiva, foi usado número absoluto e relativo. Para índice de infecção natural por tripanossomatídeos, foi utilizada a seguinte fórmula: o número de triatomíneos infectados dividido pelo número de triatomíneos examinados por 100.

3.6 ASPECTOS ÉTICOS PESQUISAS

A pesquisa realizada seguiu todas as etapas do projeto, conforme solicita as resoluções vigentes, para coletas dos triatomíneos, juntamente com a autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - Sisbio Número: 75216-1 e Secretária Municipal do Meio Ambiente de Guajará-Mirim - Semma (Ofício nº 36/SEMMA/GM/2020).

4 RESULTADOS

4.1 COLETA DE TRIATOMÍNEOS

Foram coletados 1.232 espécimes oriundas das seis (06) coletas realizadas no município de Guajará-Mirim, nas localidades da Colônia Agrícola do Iata, Comissão de Aeroportos da Região Amazônica - COMARA, Reservas Extrativistas do Rio Ouro Preto - ROP, Reservas Extrativistas do Pacaás, além disso incluímos a área rural de *Guayaramerin* (Bolívia), invasões dos triatomíneos em ambientes com presença humana, assim como no perímetro urbano. As coletas ocorreram por campanhas no período de 2019 até 2022, em localidades com acesso principal às estradas vicinais e transportes fluviais.

Foram usadas as informações dos populares que habitavam as localidades para direcionar a equipe, para a busca dos locais de coleta. Investigou-se cerca de 173 palmeiras dos gêneros *Attalea* e *Oenocarpus* em cinco (05) localidades, com a captura de 1.232 insetos. A investigação foi executada, a partir de buscas ativas nas palmeiras e utilizando armadilhas luminosas em áreas, que não era possível realizar a dissecação das palmeiras (Tabela 2).

Tabela 2. Métodos de coleta e número de triatomíneos capturados, no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Modo de coleta	N.º de triatomíneos coletados	(%) de triatomíneos coletados
Palmeiras	1.206	97,89
Armadilhas	23	1,87
Invasão domiciliar	3	0,24
Total	1.232	100

Legenda: % - porcentagem.

Assim, essa totalidade de espécimes coletados é resultado da participação da comunidade e de muito esforço dos participantes do projeto, pois as principais coletas deveriam ocorrer no ano de 2020, porém o planeta se deparava com a pandemia causada pela Covid-19, o que dificultou a permissão para o acesso às comunidades isoladas, para que não se fosse exposto ao vírus causador da doença. No entanto, apesar dos contratempos, foi possível obter um quantitativo de espécimes bem expressivo.

Nesse panorama, os espécimes coletados foram examinados minuciosamente pelos pesquisadores e foram divididos entre fêmeas, machos e ninfas dos cinco estádios (Figura 8).

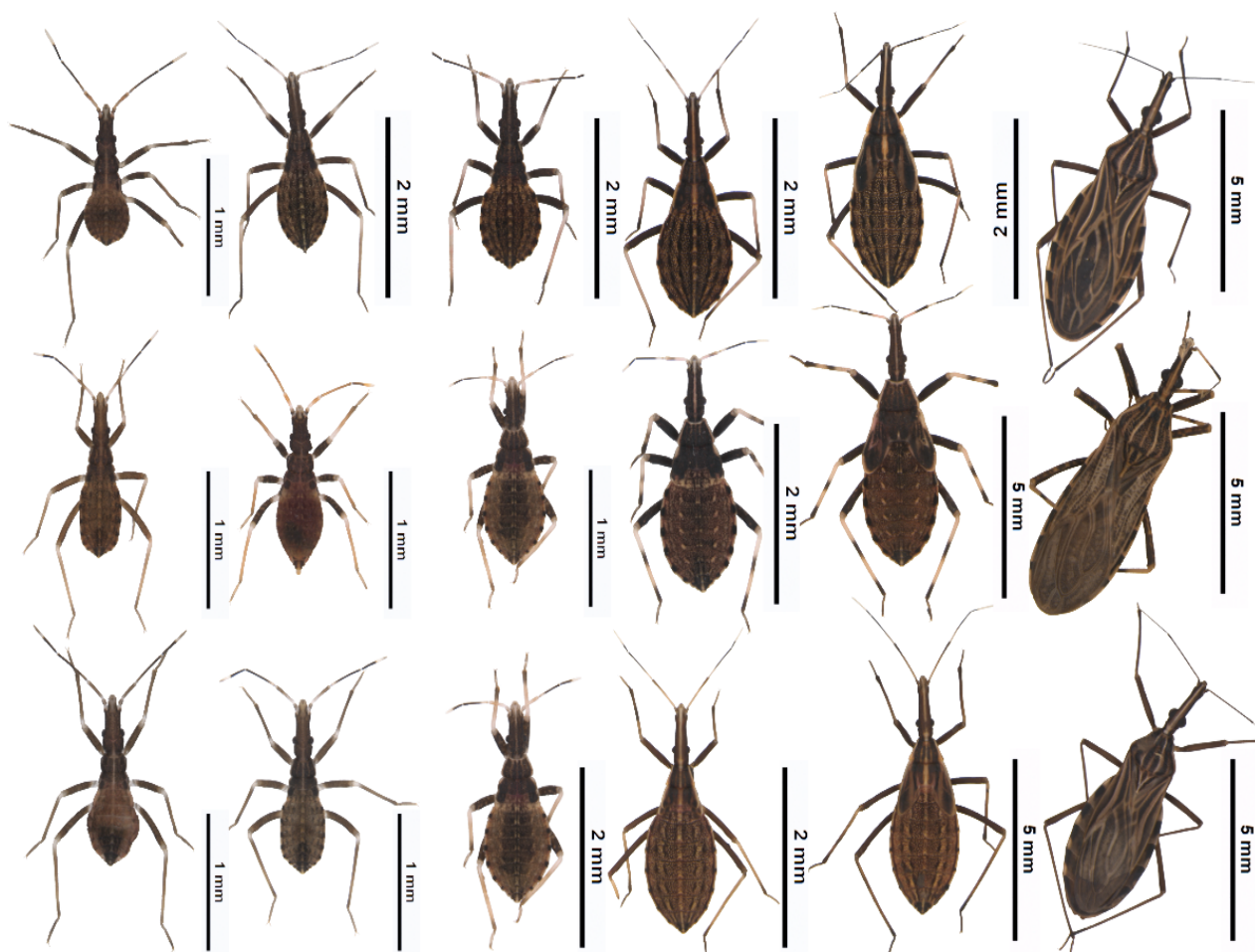


Figura 8. Estádios de desenvolvimentos dos triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Legenda: Espécimes capturados no município de Guajará-Mirim. A – Espécies de *R. montenegrensis*: A1- NI, A2-NII, A3-NIII, A4-NIV, A5 – NV e A6-Adulto. B – *R. robustus*: B1- NI, B2-NII, B3-NIII, B4-NV e B6- Adulto. C – *R. pictipes*; C1-NI, C2-NII, C3-NIII, C4-NIV, C5-NV e C6-Adulto. **Fonte:** Autor

As espécies capturadas foram dos gêneros *Rhodnius* (fig. 8 e 9A) e *Panstrongylus* (fig. 9B1 e 9B2), coletadas principalmente em palmeiras da família Arecaceae/Palmae, e das espécies *Attalea maripa*, *Attalea speciosa* e *Oenocarpus bataua* (Fig. 10).

Dentre as três espécies de palmeiras, *Attalea speciosa*, popularmente conhecida como babaçu, teve a maior quantidade observada, cerca de 80% do total. As outras duas espécies de palmeiras examinadas foram *Attalea maripa* e *Oenocarpus bataua* (Tabela 3).

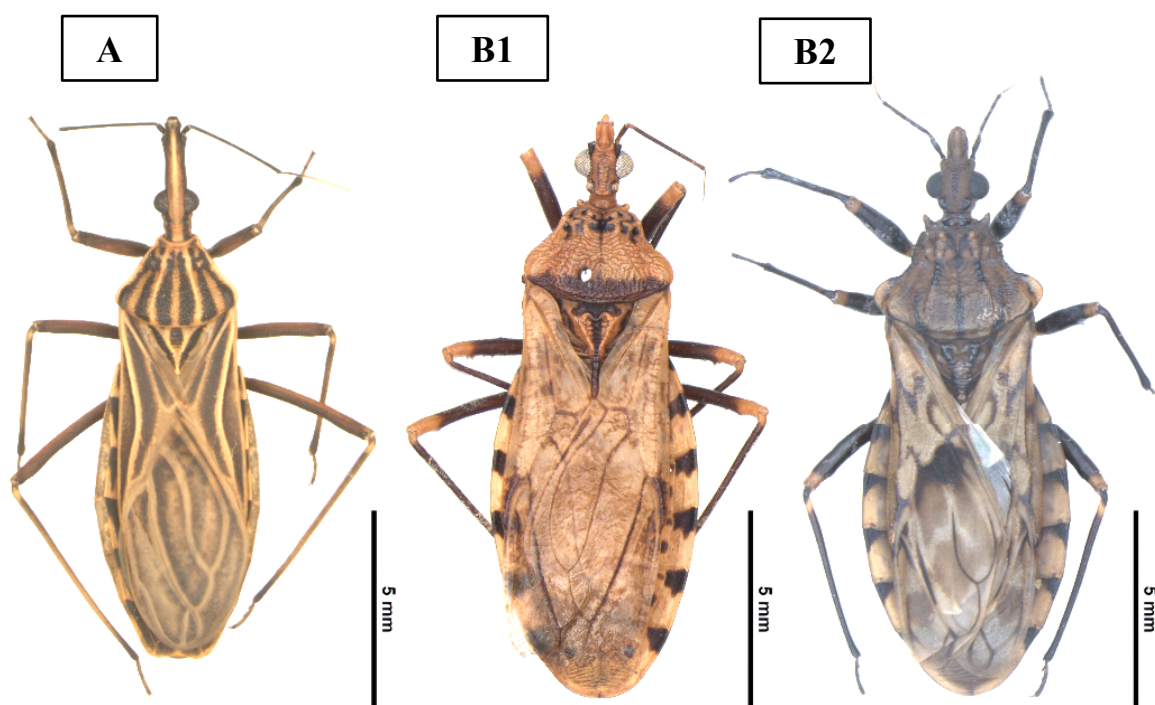


Figura 9. Triatomíneos do gênero *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Legenda: A – *Rhodnius montenegrensis*; B1 – *Panstrongylus geniculatus* (Adulto); B2 – *Panstrongylus lignarius* (Adulto). **Fonte:** Autor

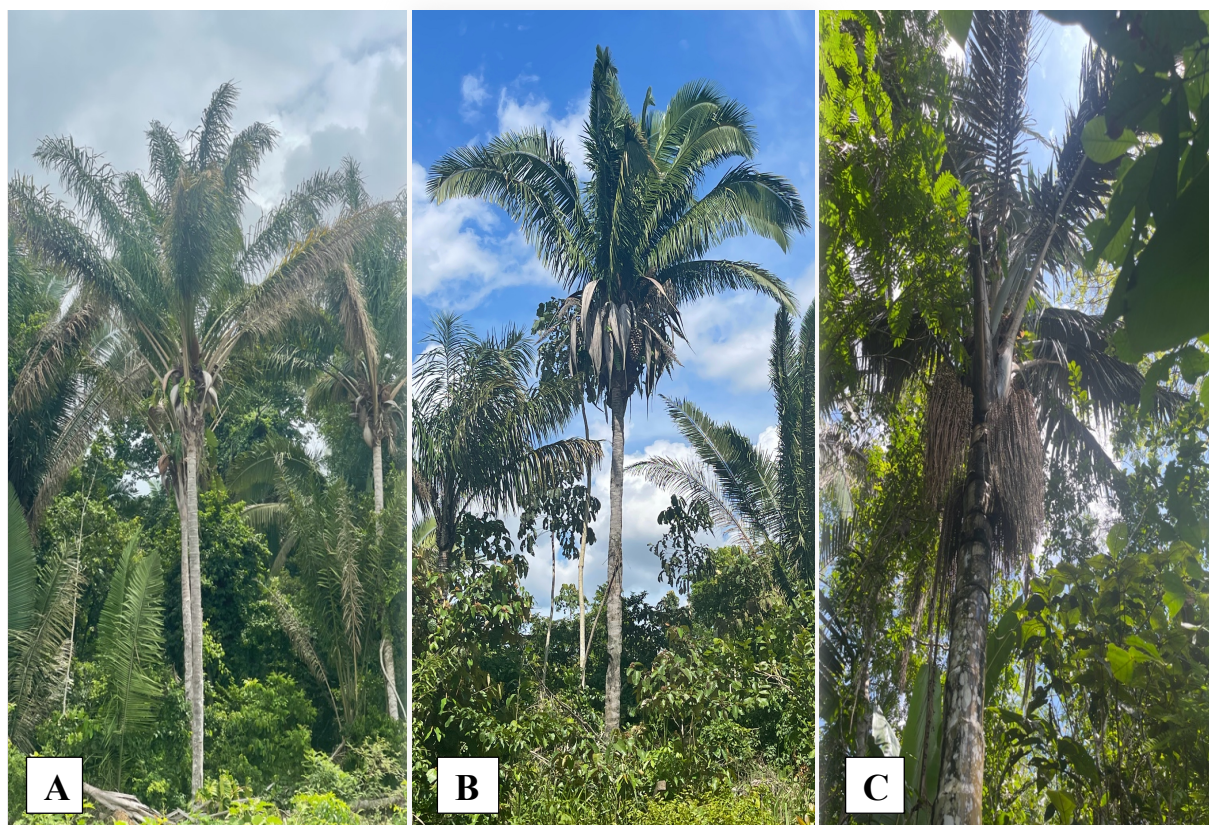


Figura 10. Palmeiras dissecadas nas áreas coletas do estudo em Guajará-Mirim, Rondônia. Legenda: A – *A. maripa*; B- *A. speciosa*; O. *bataua*. **Fonte:** Autor

Tabela 3. Número e percentual de palmeiras dissecadas e triatomíneos coletados, no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Espécies de palmeiras	N.º de palmeiras dissecadas	N.º de palmeiras dissecadas (%)	N.º de insetos coletados	(%) de insetos coletados
<i>Attalea speciosa</i>	139	80,35	976	80,93
<i>Attalea maripa</i>	25	14,45	76	6,30
<i>Oenocarpus bataua</i>	9	5,20	154	12,77
Total	173	100,00	1.206	100

Legenda: % - porcentagem.

Nas localidades Resex Iata e ROP, obteve-se maior número de triatomíneos, nas coletas conduzidas. Nas áreas urbanas de Guajará-Mirim, foram utilizadas armadilhas luminosas, porém as coletas foram feitas em fragmentos de mata (área do exército e Universidade Federal de Rondônia – UNIR), onde ocorreram invasões em ambientes domiciliares e prédios (Tabela 4).

Tabela 4. Número e percentual de triatomíneos, em relação aos locais de coletas no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Localidade	N.º de insetos coletados	%
Distrito Iata	466	37,82
Resex ROP	375	30,44
Comara	151	12,25
Resex Cautário	111	9,01
Resex Pacaás	75	6,09
Bolívia	28	2,27
Zona Urbana	26	2,11
Total	1.232	100,00

Legenda: % - porcentagem.

As espécies coletadas do gênero *Rhodnius* foram *R. montenegrensis*, *R. pictipes*, *R. robustus*, *R. stali* e as do gênero *Panstrongylus*, *P. geniculatus* e *P. lignarius*. Sendo que as quatro espécies de *Rhodnius* compuseram 98,98% do total de espécies capturadas (Tabela 4).

Panstrongylus foi capturado em número bem menor. Por meio de armadilhas luminosas foram coletadas as espécies *R. pictipes*, *R. montenegrensis*, *P. lignarius* e *P. geniculatus*. Nos ambientes domiciliares e periodomiciliares capturou-se apenas *R. montenegrensis* (Tabela 5).

Tabela 5. Número e percentual de espécies de *Rhodnius* e *Panstrongylus* coletados no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Espécies identificadas	N.º de insetos coletados	%
<i>R. montenegrensis</i>	540	92,15
<i>R. robustus</i>	27	4,61
<i>R. pictipes</i>	11	1,88
<i>P. geniculatus</i>	4	0,68
<i>P. lignarius</i>	2	0,34
<i>R. stali</i>	2	0,34
Total	586	100,00

Legenda: % - porcentagem.

Em relação às espécies de palmeiras, em *A. speciosa* encontrou-se a maior quantidade de triatomíneos, quais sejam: *R. montenegrensis* (77,84%), *R. robustus* (66,67%) (Tabela 5). Em todas as palmeiras foram encontradas ao menos três espécies de *Rhodnius*, conforme referido neste estudo e *R. stali* foi capturado em *A. maripa* e *O. bataua*, exceto em *A. speciosa* essa não encontrada na área, em que se coletou *R. stali* (Tabela 6).

Tabela 6. Número e percentual de espécies de *Rhodnius* e *Panstrongylus* coletados em palmeiras no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Palmeiras/Triatomíneos	<i>R. montenegrensis</i>		<i>R. pictipes</i>		<i>R. robustus</i>		<i>R. stali</i>		Total	%Total
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<i>Attalea speciosa</i>	425	77,84	1	25,00	16	66,67	0	0,00	442	76,74
<i>Oenocarpus bataua</i>	81	14,84	2	50,00	0	0,00	1	50,00	84	14,58
<i>Attalea maripa</i>	40	7,33	1	25,00	8	33,33	1	50,00	50	8,68
Total	546	100,00	4	100,00	24	100,00	2	100,00	576	100,00

Legenda: N (número absoluto). %(percentual).

Nesse contexto, as fêmeas foram coletadas em maior quantidade do que os machos (754/ 61,20%). Dos espécimes capturados e ninfas de 1º a 5º estágio, juntamente com os adultos foram coletados na maioria em *A. speciosa* (976/80,93%). Os exames das fezes/urina, para observação de infecção por tripanossomatídeos, por meio de microscopia óptica foram feitos em 574 espécimes. Dessa maneira, foram considerados positivos os espécimes, que apresentaram ao menos uma forma de tripanossomatídeo. Dos demais 658 não foi possível realizar os exames, para verificar a infecção. Entre ninfas e adultos obteve-se 155 (27%) positivos (N3- 4, N5- 20 e Adultos- 131) e 419 (73%) não apresentaram formas flageladas (Tabela 7).

Tabela 7. Número absoluto e percentual de triatomíneos coletados de acordo com o estágio ninfal por sexo, espécies de palmeiras e análise microscópica para tripanossomatídeos, no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Sexo	Estádio Ninfal													
	N1	%N1	N2	%N2	N3	%N3	N4	%N4	N5	%N5	Adulto	%Adulto	Total	%Total
Fêmea	31	4,11	78	10,34	101	13,40	87	11,54	118	15,65	339	44,96	754	61,20
Macho	41	8,58	16	3,35	27	5,65	59	12,34	72	15,06	263	55,02	478	38,80
Total	72	5,84	94	7,63	128	10,39	146	11,85	190	15,42	602	48,86	1.232	100,00

Espécie de palmeira	Estádio Ninfal													
	N1	%N1	N2	%N2	N3	%N3	N4	%N4	N5	%N5	Adulto	%Adulto	Total	%Total
<i>Attalea speciosa</i>	66	6,76	80	8,20	111	11,37	117	11,99	160	16,39	442	45,29	976	80,93
<i>Oenocarpus bataua</i>	6	3,90	7	4,55	14	9,09	25	16,23	18	11,69	84	54,55	154	12,77
<i>Attalea maripa</i>	0	0,00	7	9,21	3	3,95	4	5,26	12	15,79	50	65,79	76	6,30
Total	72	5,97	94	7,79	128	10,61	146	12,11	190	15,75	576	47,76	1.206	100,00

Análise para tripanossomatídeos**	Estádio Ninfal													
	N1	%N1	N2	%N2	N3	%N3	N4	%N4	N5	%N5	Adulto	%Adulto	Total	%Total

Não Analisado	65	9,88	73	11,09	91	13,83	88	13,37	85	12,92	256	38,91	658	53,41
Negativos	7	1,67	21	5,01	33	7,88	58	13,84	85	20,29	215	51,31	419	34,01
Positivos	0	0,00	0	0,00	4	2,58	0	0,00	20	12,90	131	84,52	155	12,58
Total	72	5,84	94	7,63	128	10,39	146	11,85	190	15,42	602	48,86	1.232	100,00

Legenda: %(porcentagem); N1(Ninfa 1); N2(Ninfa 2); N3(Ninfa 3); N4(Ninfa 4); N5(Ninfa 5). **Análise microscopia óptica para positividade de tripanossomatídeos

Sob tal perspectiva, *Rhodnius montenegrensis* foi a mais frequente, em relação às demais espécies, assim como apresentou a maior positividade para tripanossomatídeos nas análises microscópicas. Os espécimes de *Panstrongylus* não foram examinados por microscopia óptica, pois estavam secos, o que inviabilizou a verificação do trato digestivo dos insetos, para constatar a presença do protozoário flagelado.

Contudo, *Rhodnius montenegrensis* (90), *R. robustus* (12) e *R. pictipes* (04), são as espécies, em que se detectou a presença de protozoários flagelados, as demais não foram examinadas microscopicamente, conforme a tabela 8.

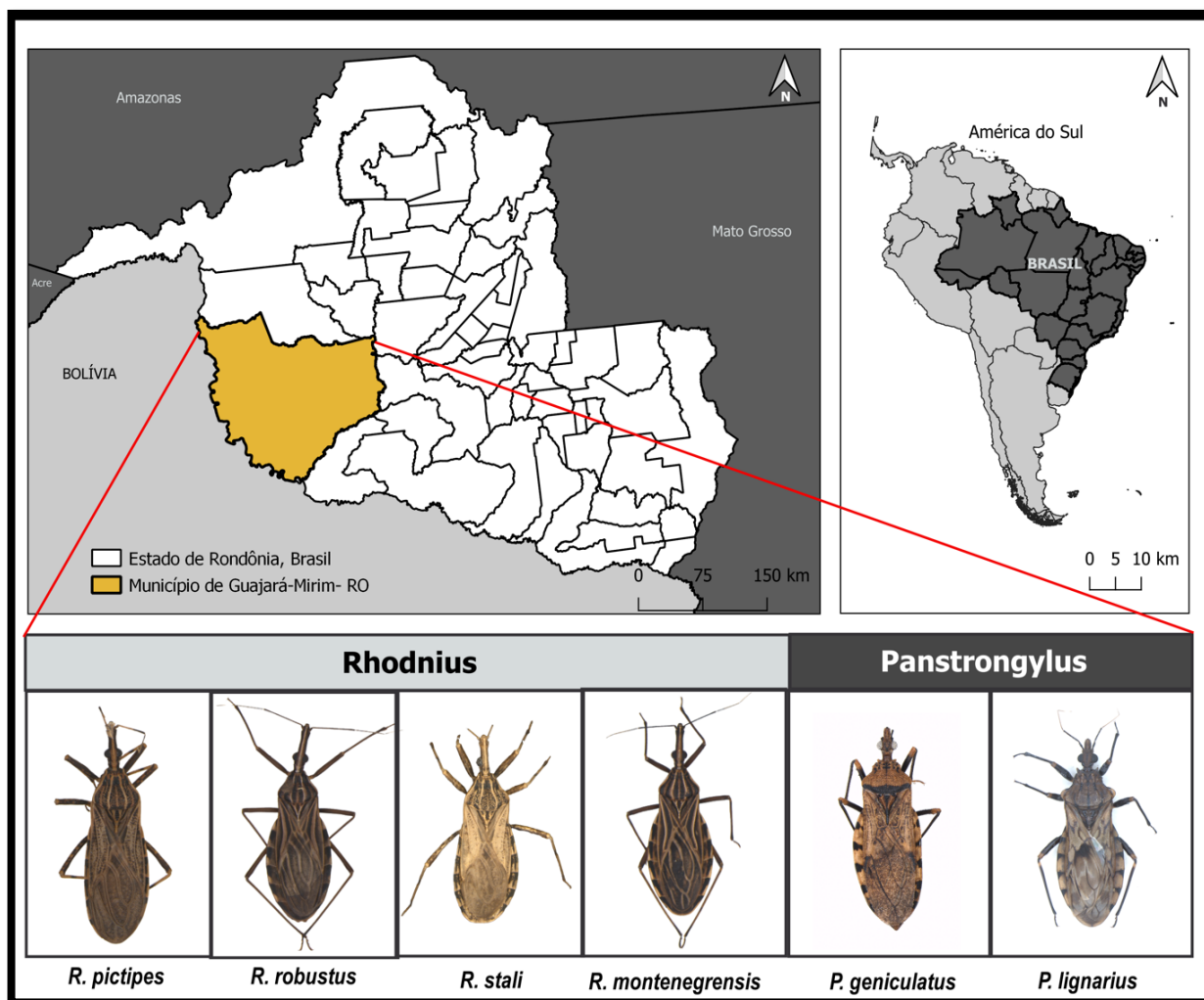
Tabela 8. Número e percentual das espécies de *Rhodnius* e *Panstrongylus*, examinados por microscopia óptica para busca de tripanossomatídeos, no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Espécies identificadas	Número de insetos positivo	Taxa de infecção de positividade para tripanosomatídeos*
<i>P. geniculatus</i>	0	0,00
<i>P. lignarius</i>	0	0,00
<i>R. montenegrensis</i>	90	27,03
<i>R. pictipes</i>	4	44,44
<i>R. robustus</i>	12	66,67
<i>R. stali</i>	0	0,00
Total	106	28,96

Estágio ninfal	Número de insetos positivos	Taxa de infecção de positividade para tripanosomatídeos*
N1	0	0
N2	0	0
N3	4	10,81
N4	0	0
N5	20	19,05
Adulto	131	37,86
Total	155	27,00

Legenda: %(percentual). N1(Ninfa 1); N2(Ninfa 2); N3(Ninfa 3); N4(Ninfa 4); N5(Ninfa 5). A taxa de infecção de positividade para tripanossomatídeos é o número de insetos positivos dividido por número de insetos examinados multiplicado por 100.

A localização do município de Guajará-Mirim e todas as espécies de triatomíneos coletadas no período de 2019 a 2022: *Rhodnius pictipes*, *R. robustus*, *R. montenegrensis*, *R. stali*, *Panstrongylus geniculatus* e *P. lignarius*; estão referidas na figura 11.



Fonte: IBGE (2022)

Figura 11. Espécies de triatomíneos capturadas no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022. **Fonte:** Autor

De acordo com os dados, no distrito de Iata foi coletada a maior quantidade de triatomíneos (N2; N3, N4, N5 e fêmeas), seguindo por Resex ROP (N1; N2, fêmeas e machos) e Comara (N1 e machos). Nas demais localidades ocorreram variações no quantitativo, entres ninfas e adultos, porém em números menores (Tabela 9).

Tabela 9. Número e percentual de triatomíneos por estágio, sexo e localidade no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Localidade	N1				N2				N3				N4				N5				Adulto				Total				Total
	♂	%♂	♀	%♀	♂	%♂	♀	%♀	♂	%♂	♀	%♀	♂	%♂	♀	%♀	♂	%♂	♀	%♀	♂	%♂	♀	%♀	♂	%♂	♀	%♀	
Resex ROP	11	27,50	12	37,50	8	50,00	26	33,33	3	11,11	28	27,72	15	25,42	10	11,49	14	19,44	24	20,34	88	33,46	136	40,12	139	29,14	236	31,26	375
Resex Cautário	0	0,00	0	0,00	0	0,00	9	11,54	5	18,52	6	5,94	1	1,69	5	5,75	6	8,33	12	10,17	29	11,03	38	11,21	41	8,60	70	9,27	111
Resex Pacaás	0	0,00	0	0,00	1	6,25	3	3,85	1	3,70	2	1,98	4	6,78	19	21,84	6	8,33	5	4,24	19	7,22	15	4,42	31	6,50	44	5,83	75
Distrito Iata	2	5,00	6	18,75	4	25,00	34	43,59	12	44,44	54	53,47	31	52,54	41	47,13	43	59,72	61	51,69	83	31,56	95	28,02	175	36,69	291	38,54	466
Comara	23	57,50	11	34,38	3	18,75	5	6,41	4	14,81	10	9,90	8	13,56	12	13,79	3	4,17	15	12,71	27	10,27	30	8,85	68	14,26	83	10,99	151
Zona Urbana	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	11	4,18	15	4,42	11	2,31	15	1,99	26
Bolívia	4	10,00	3	9,38	0	0,00	1	1,28	2	7,41	1	0,99	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	0,85	6	2,28	10	2,95	12	2,52	16	2,12	28
Total	40	100,00	32	100,00	16	100,00	78	100,00	27	100,00	101	100,00	59	100,00	87	100,00	72	100,00	118	100,00	263	100,00	339	100,00	477	100,00	755	100,00	1232

Legenda: %(porcentagem). N1(Ninfa 1); N2(Ninfa 2); N3(Ninfa 3); N4(Ninfa 4); N5(Ninfa 5). ♂ (Macho). ♀ (Fêmea).

Tabela 10. Taxa de positividade para tripanossomatídeos por microscopia óptica de espécies de triatomíneos por localidade no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Espécies identificadas	Resex ROP				Resex Cautário				Resex Pakaas				Distrito Iata				Comara				Zona Urbana				Total			
	N	Posit	T. Ex.	Taxa (%)*	N	Posit	T. Ex.	Taxa (%)*	N	Posit	T. Ex.	Taxa (%)*	N	Posit	T. Ex.	Taxa (%)*	N	Posit	T. Ex.	Taxa (%)*	N	Posit	T. Ex.	Taxa (%)*	N	Posit	T. Ex.	Taxa (%)*
<i>P. geniculatus</i>	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	4	0	4	0	4	0	4	0,00
<i>P. lignarius</i>	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	2	0	2	0	2	0	2	0,00
<i>R. montenegrensis</i>	207	50	117	42,74	55	14	33	42,42	34	3	17	17,65	177	10	109	9,17	57	13	47	27,66	10	0	10	0	540	90	333	27,03
<i>R. pictipes</i>	2	1	2	50,00	2	2	2	100	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	7	1	5	20,00	11	4	9	44,44
<i>R. robustus</i>	15	10	11	90,91	8	1	3	33,33	0	NSA	NSA	NSA	1	1	1	100	0	NSA	NSA	NSA	3	0	3	0	27	12	18	66,67
<i>R. stali</i>	0	NSA	NSA	NSA	2	0	0	0,00	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	0	NSA	NSA	NSA	2	0	0	0,00
Total	224	61	130	46,92	67	17	38	44,74	34	3	17	17,65	178	11	110	10,00	57	13	47	27,66	26	1	24	4,17	586	106	366	28,96

Legenda: T. Ex. (Triatomíneo Examinado). % (percentual). Posit (Insetos Positivos). Taxa* (Taxa de infecção de positividade para tripanossomatídeos é o número de insetos positivos dividido pelo número de insetos examinados multiplicado por 100).

Nesse cenário, em Resex ROP, a maior quantidade coletada foi de *R. montenegrensis*, porém *R. robustus* apresentou a maior taxa de infecção por tripanossomatídeos, cerca de 91%, entretanto o número de espécimes examinados foi muito baixo. Os dados obtidos mostraram, que dentre os espécimes coletados de *R. montenegrensis* 42,7% foram positivos para os tripanossomatídeos. Dados semelhantes foram encontrados em Resex Cautário (42,42%) e nas demais localidades, como Resex Pacaás (17,65%), Comara (27,66%) as taxas foram menores, mas em ambas *R. montenegrensis* foi a espécie que obteve o maior quantitativo de espécimes examinadas para tripanossomatídeos (Tabela 10).

Dessa forma, observando as taxas de positividade na Resex Rio Cautário, *R. pictipes* se destaca, pois é a espécie que apresenta 100% de positividade para *Trypanosoma*, seguido por *R. montenegrensis* (42,2%), *R. robustus* (33,3%). Assim, ressalta-se que o quantitativo analisado do *R. pictipes* foi apenas dois (02), seguido por *R. montenegrensis* (33) e *R. robustus* (03). Na Resex do Pakaas, *R. montenegrensis* foi a única espécie examinada 34 espécimes, três (03) estavam positivos, obtendo a taxa de 17,65% (Tabela 10).

Nesta mesma perspectiva, Resex Rio Cautário e a comunidade de Iata, foram examinados *R. montenegrensis* (177) e *R. robustus* (1), registrando a taxa de 9,17% e 100%, respectivamente. Na zona urbana de Guajará-Mirim, foi onde se encontrou a maior diversidade, dentre as espécies, apesar do quantitativo ser inferior às demais áreas de estudos (Tabela 10).

Nas duas espécies do gênero *Panstrongylus* não foram encontradas em suas fezes formas flageladas. *R. montenegrensis* e *R. robustus*, tampouco foi possível visualizar a presença de tripanossomatídeos em suas fezes, diferentemente do que ocorre nas demais localidades. Apenas *R. pictipes* se encontrava infectada, com taxa de 20% dentre sete (07) espécimes examinados, conforme a tabela 10.

Em síntese, as espécies de triatomíneos, em que se conseguiu realizar a pesquisa por tripanossomatídeos nas fezes/urina foram 366 adultos nas áreas do município de Guajará-Mirim com total de positividade de aproximadamente 29%, para o protozoário flagelado nas fezes. O destaque é *R. robustus* com 66,7% de positividade na sequência *R. montenegrensis* com 44,4% e *R. pictipes* 27% (Tabela 10).

4.2 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Para identificação genética de tripanossomatídeos, foram utilizados todos os insetos adultos coletados, no período de 2019 a 2020, quais sejam, 600 triatomíneos (fezes, trato digestivo). Por análise em espectrofotômetro, apenas 549 espécimes estavam com concentração e purezas mínimas, para as demais etapas. Dos triatomíneos submetidos aos FFLB, 320 (58,29%) apresentaram positividade, para *Trypanosoma*, ou seja, *T. cruzi* e *T. rangeli*. Dentre as espécies de triatomíneos positivos com maior frequência foram *R. montenegrensis* 290 (90,63%) seguido do *R. robustus* 17 (5,31%). Com relação a genotipagem, 32,81% foram positivos para TcI, 21,25% infecção mista (TrA+TcI), 15,63% de TrA e 15% infecção mista (TrA+TcI+TcIV) (Tabela 11).

Tabela 11. Número e percentual de positividade com especificação da genotipagem para *T. cruzi* e *T. rangeli* por espécies de triatomíneos no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Triatomíneos		Tripanossomatídeos							
Espécies	Número de insetos Analisados (%)	TcI	TcIV	TcI + TcIV	TrA	TrA + TcI	TrA+ TcIV	TrA + Tc (I+IV)	Total (P/%)
<i>R. montenegrensis</i>	504 (91,80%)*	91	19	17	50	60	10	43	290 (90,6%)* **
<i>R. robustus</i>	27 (4,92%)*	07	01	0	0	05	0	04	17 (5,31%)* **
<i>R. stali</i>	02 (0,36%)*	0	0	0	0	02	0	0	02 (0,63%)* **
<i>R. pictipes</i>	11 (2%)*	07	0	0	0	01	0	01	09 (2,81%)* **
<i>P. lignarius</i>	02 (0,36%)*	0	01	0	0	0	0	0	01 (0,31%)* **
<i>P. geniculatus</i>	04 (0,73%)*	0	01	0	0	0	0	0	01 (0,31%)* **
Total	549	105 (32,81%)* **	22 (6,88%)* **	17 (5,31%)* **	50 (15,63%)* **	68 (21,25%)* **	10 (3,13%)* **	48 (15,00%)* **	320 (58,29%)* **

Legenda: DTU's: TcI - *Trypanosoma cruzi* I; TcIV - *Trypanosoma cruzi* IV. TrA: Linhagem de *Trypanosoma rangeli* Tipo A. A - Quantitativo de amostras analisadas para FFLB. P- Quantitativo de amostras positivas para FFLB. % - porcentagem. *Cálculo: Número de insetos sequenciados dividido pelo total (549) multiplicado por 100. **Cálculo: Número de insetos positivos para respectivas genotipagem dividido pelo total de amostra positivas (320) multiplicado por 100.

As localidades que apresentaram maior frequência, com relação a positividade para tripanossomatídeos foram Resex ROP, Distrito Iata e Resex Cautário, respectivamente, 43,13%, 28,75% e 13,75% (Tabela 12).

Tabela 12. Número e percentual de positividade com especificação da genotipagem para *T. cruzi* e *T. rangeli* por localidade no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

	TcI	TcIV	TcI + TcIV	TrA	TrA + TcI	TrA+ TcIV	TrA + Tc (I+IV)	Total
Distrito Iata	43	02	02	13	20	02	10	92 (28,75%)
Resex ROP	40	13	06	24	24	06	25	138 (43,13%)
Resex Cautário	6	03	05	05	16	01	08	44 (13,75%)
Resex Pacaás	4	02	0	04	02	01	01	14 (4,38%)
Bolívia	1	0	02	01	03	0	03	10 (3,13%)
Zona Urbana	05	0	0	0	0	0	0	05 (1,56%)
Comara	08	0	2	03	03	0	01	17 (5,31%)
Total	107 (33,44)	20 (6,25%)	17 (5,31%)	50 (15,63)	68 (21,68)	10 (3,13%)	48 (15%)	320

Legenda: DTU's: TcI - *Trypanosoma cruzi* I; TcIV - *Trypanosoma cruzi* IV. TrA: Linhagem de *Trypanosoma rangeli* Tipo A. A - Quantitativo de amostras analisadas para FFLB. P- Quantitativo de amostras positivas para FFLB. % - porcentagem. Cálculo: Número de insetos positivos para respectivas genotipagem por localidade dividido pelo total de amostra positivas (320) multiplicado por 100.

Em relação a figura 12 abaixo, apresenta-se a distribuição dos *T. cruzi* (DTU's) e *T. rangeli* (Linhagens), conforme os locais de coleta dos triatomíneos no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

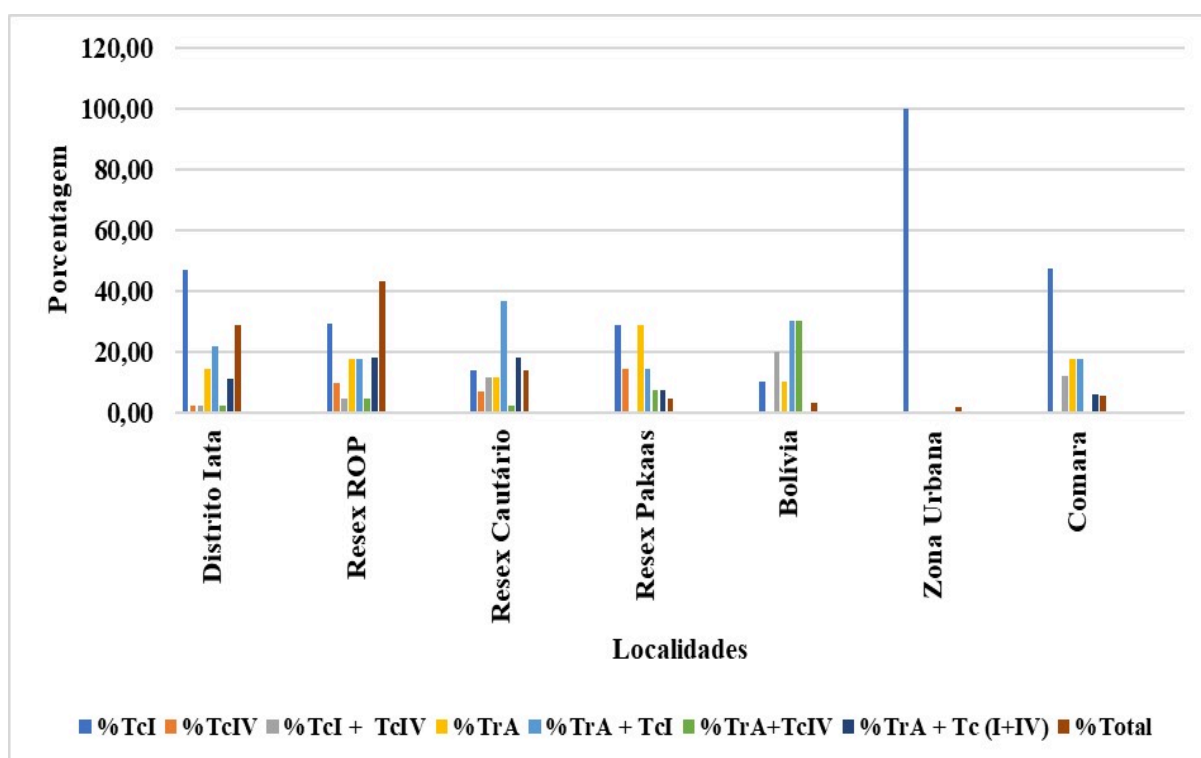


Figure 12. Distribuição dos *T. cruzi* (DTU's) e *T. rangeli* (linhagens) de acordo com os locais de coleta dos triatomíneos no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022. **Fonte:** Autor

Na perspectiva dos 223 (40,61%) triatomíneos não examinados por microscopia óptica, em 115 (51,56%) foram confirmadas positividade para tripanossomatídeos por biologia molecular. Vale ressaltar que os insetos positivos, para tripanossomatídeos por microscopia óptica e por biologia molecular obtiveram valores bem semelhantes (Tabela 13).

Tabela 13. Comparação das amostras de triatomíneos adultos analisadas em Microscopia Óptica e Análise Molecular no município de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil, no período de 2019 a 2022.

Genótipos	MO	BM	MO	BM	MO	BM
	P*/ P*		N**/P*		NA***/P*	
TcI	131 / 55		195 / 18		223 / 32	
TcIV	131 / 08		195 / 03		223 / 11	
TcI + TcIV	131 / 07		195 / 05		223 / 05	
TrA	131 / 08		195 / 22		223 / 20	
TrA + TcI	131 / 13		195 / 29		223 / 26	
TrA+TcIV	131 / 04		195 / 01		223 / 05	
TrA+ TcI+TcIV	131 / 15		195 / 17		223 / 16	
Total	131 / 110		195 / 95		223 / 115	

Legenda: MO- Microscopia Óptica. BM- Biologia Molecular (FFLB). P*(Positivos para tripanossomatídeos); N**(Negativo para tripanossomatídeos); NA***(Triatomíneos não analisados).

Destaca-se os números de positivos por microscopia óptica que se mostrou maior que a identificação por biologia molecular (Tabela 13). Isso pode ser justificado, hipoteticamente pela baixa quantidade de parasita presente nas fezes e intestino dos triatomíneos analisados, pois primeiramente realizava-se os exames microscópicos e na sequência armazenava- as amostras (fezes/intestino) em álcool absoluto.

Os exames por MO, somente eram considerados positivos aqueles que nas leituras laminares apresentassem ao menos uma forma celular flagelada, o que atestaria a positividade para tripanossomatídeos dos espécimes. Assim essa baixa parasitemia nas investigações por MO, podem ter contribuído para baixa concentração de DNA extraído dos triatomíneos positivos, que permitiu resultados negativos para a presença de *Trypanosoma* sp. em 21 amostras consideradas positivas.

5 DISCUSSÃO

5.1 ESPÉCIES DE PALMEIRAS E SUA INFESTAÇÃO

A doença de Chagas continua sendo um problema de saúde pública em toda a América Latina (OMS, 2022). Compreender a dinâmica, que envolve o ciclo de transmissão da DC é fundamental, para criar estratégias de controle da disseminação do parasita.

Essas estratégias podem contribuir para o controle e expansão continental da DC, mas antes deve-se compreender os fatores que contribuem para a disseminação da DC, como, por exemplo, a associação dos triatomíneos com palmeiras. Os povos amazônicos, ainda utilizam essas plantas para a cobertura de casas, como parte do ambiente de convivência, para fazer artesanatos e, até mesmo, para consumo dos frutos ou extração de óleos vegetais, para uso ou venda. Além disso, as palmeiras podem ser preservadas nas proximidades das residências, com o intuito de proporcionar sombra (Dias, 2012; Gregório, 2019; Da Silva *et al.*, 2020; Gutierrez, 2020; Ferreira *et al.*, 2021; Depickère *et al.*, 2022). Suas características tornam as palmeiras um local de abrigo e/ou fonte de alimentos, para os animais, que habitam o ambiente selvagem (Depickère *et al.*, 2022).

Nessa conjuntura, as palmeiras têm sido ecótopos, em que observa-se a presença marcante de triatomíneos, especialmente *Rhodnius* spp., essa afinidade com as palmeiras é algo relatado há tempos por alguns pesquisadores na região (Miles *et al.*, 1983; Monteiro *et al.*, 1999; Junior *et al.*, 2006; Abad-Franch *et al.*, 2010; Abad-Franch *et al.*, 2015; Abad-Franch *et al.*, 2021). Vale ressaltar que a diversidade de ecótopos, onde *Rhodnius* spp. pode ser encontrado vai, desde a floresta tropical, até o cerrado e não se limita, apenas às palmeiras (Dias *et al.*, 2008, Lima *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2010).

No que se refere, a infestação de palmeiras da família Arecaceae é amplamente documentada em estudos realizados na região amazônica (Queiroz; Bianco *et al.*, 2009). Nesse contexto, o gênero *Attalea* forma ecótopos naturais, para a manutenção de algumas espécies de

Rhodnius (Coura, 2002). A presença predominante do gênero *Attalea* na região amazônica pode ser um indicador ecológico potencial em locais, onde existe risco de transmissão de *T. cruzi*, uma vez que oferece abrigo, tanto para os vetores, quanto para os hospedeiros, que participam do ciclo de transmissão silvestre dessa espécie de protozoário (Romaña, 2007).

Dessa maneira, outro gênero que merece atenção é o *Oenocarpus*, que, assim como o *Attalea*, é uma palmeira abundante na região Norte do Brasil (Queiroz; Bianco *et al.*, 2009; Montúfar *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010; Hidalgo *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2023). Ela pode atingir alturas que variam de 12 a 25 metros, é unicaule e possui várias raízes expostas em sua base. Suas brácteas apresentam formas e tamanhos variados, e suas inflorescências são exuberantes e chamativas, atraindo insetos polinizadores (Villachica *et al.*, 1996; Lorenzi *et al.*, 2004; Dransfield *et al.*, 2008; Núñez-Avellaneda; Rojas-Robles, 2008; Oliveira *et al.*, 2022). Além disso, essa palmeira pode servir de abrigo, para pequenos roedores e outros mamíferos (Coura *et al.*, 2002; Jurberg *et al.*, 2014; Coura, 2015; Mendes-Oliveira; Miranda, 2015; Sampaio *et al.*, 2022).

Nesse sentido, a espécie *Oenocarpus bataua* possui brácteas com estruturas semelhantes a pelos, chamadas de ráqui, com coloração preta. Entre essas estruturas emaranhadas, é possível encontrar ninfas e adultos de *Rhodnius* spp.. Além disso, o fruto dessa palmeira é usado, para extrair o suco conhecido, como patauá (na Bolívia, é chamado de jugo de majo) (Santalla *et al.*, 2014). Nessa conjuntura, a abundância dessas palmeiras, que se sabe ser o ecótopo preferido de *Rhodnius* spp, juntamente com a sua proximidade com a população, pode contribuir para a disseminação de *T. cruzi* em humanos, bem como de *T. rangeli*. Além disso, observou-se, que em palmeiras com vestígios de queimadas, devido ao processo de renovação de pasto nas localidades estudadas, era possível encontrar os vetores da doença de Chagas, mesmo que em quantidades reduzidas (Dias-Filho, 2015).

A relação existente entre triatomíneose palmeiras, é demonstrada no estudo realizado por Abad-Franch e colaboradores (2021), que aponta para a possibilidade de resistência dos triatomíneos, em migrar para outros ambientes, quando as palmeiras sofrem algum tipo de estresse. Em alguns casos, a presença desses triatomíneos em casas pode ser, devido à escassez de alimentos ou a estímulos, ainda não totalmente esclarecidos. Essa hipótese levantada pode justificar a presença de triatomíneos em palmeiras com sinais de queimadas e a ausência desses insetos, em ambientes domiciliares nas áreas rurais (Abad-Franch *et al.*, 2010).

Para tanto, o microclima que se forma na estrutura das palmeiras, juntamente com fatores, como alimentação e proteção, pode ser as variáveis que justificam as quantidades encontradas nas palmeiras investigadas (Dias *et al.*, 2008; Calderón; González, 2020). As três

espécies de palmeiras examinadas mostraram variação nos números de espécimes de triatomíneos coletados, com destaque para a *Attalea speciosa*.

Observou-se em locais de coleta a predominância de determinadas espécies de palmeiras, em áreas específicas do município de Guajará-Mirim. A vasta extensão territorial do município, juntamente com a diversidade na composição, explica as diferentes formações de solo e, conseqüentemente, a diversidade de vegetação, incluindo as palmeiras.

Dessa forma, na localidade Resex Rio Cautário, verificou-se a predominância de *A. maripa* e *O. bataua*, com ausência de *A. speciosa*. É importante ressaltar que essa reserva está localizada a aproximadamente 800 km em linha reta da área urbana de Guajará-Mirim. Na Resex Pakaas, situada a 250 km do centro urbano do município, também se observou a predominância de *A. maripa* e *O. bataua*, embora tenha-se encontrado *A. speciosa*, mas em menor número. Em ambas as reservas, tentou-se coletar triatomíneos com armadilhas luminosas, sem sucesso, no entanto, encontrou-se os vetores pela dissecação das palmeiras.

No que diz respeito à *A. speciosa*, quando se compara essa espécie com as outras palmeiras examinadas, ela se mostrou predominante, principalmente, nas localidades de Resex ROP, Distrito Iata e Comara. Esses resultados corroboram com os relatos e associações, entre as palmeiras e os triatomíneos, o que propicia a perpetuação das espécies de triatomíneos que circulam na região.

Observou-se os números, que indicam a sobreposição da *A. speciosa* com as demais palmeiras (*A. maripa* e *O. bataua*) (Tabela 3). Nas coletas na região rural de *Guayaramerín* (Bolívia), *O. bataua* predominou. Nesse contexto, estudos indicam que os triatomíneos mostram associações com habitats específicos, que oferecem abrigo e alimento. Essa associação pode ser específica, para um tipo de habitat, como ocorre com as três espécies de *Psammolestes*, que vivem em ninhos de aves, ou podem colonizar vários habitats, como *Triatoma sordida*, que pode ser encontrado em pilhas de rochas, árvores ocas e habitações humanas (Gaunt; Miles, 2000; Calderón; González, 2020).

Nessa compreensão, nas Américas, as palmeiras estão distribuídas desde o sul dos EUA ao norte da Argentina e ao centro do Chile (Galeano; Bernal, 2010; Calderón; González, 2020). Das 550 espécies de palmeiras, que existem naturalmente nas Américas, 19 foram relatadas como infestadas por *Rhodnius* spp. As espécies de *Rhodnius* estão distribuídas na América Central e América do Sul, sendo a região amazônica aquela que apresenta o maior número de espécies (Gorla; Noireau, 2017). Algumas espécies de *Rhodnius*, como *R. pictipes* e *R. robustus*, têm distribuições geográficas muito amplas, incluindo vários países, enquanto

outras, como *R. ecuadoriensis* e *R. colombiensis*, são restritas a regiões específicas em um ou dois países (Carcavallo *et al.*, 1999).

Além disso, palmeiras infestadas por *Rhodnius* spp. foram observadas e relatadas em inúmeras áreas da América Central e do Sul, sugerindo que as distribuições silvestres de *Rhodnius* spp. coincidem amplamente com as distribuições desse vegetal (Dias *et al.*, 2008; Abad-Franch *et al.*, 2015). No entanto, o papel da presença da palmeira, como variável determinante nas distribuições de *Rhodnius* spp. não foi explicitamente avaliado.

Por consequência, em todas as 173 palmeiras examinadas, foram encontrados espécimes de triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Essa capacidade de abrigar espécies desse gênero pode ser uma informação relevante, para a gestão da vigilância epidemiológica, auxiliando na questão do monitoramento entomológico dos vetores da doença de Chagas (Abad-Franch *et al.*, 2010; Abad-Franch *et al.*, 2021).

Nesse sentido, o monitoramento da infestação de palmeiras por triatomíneos pode ser uma importante metodologia para o controle da doença de Chagas na região amazônica, que nos últimos anos vem sofrendo com a transmissão pela via oral, quando se consome alimentos oriundos da floresta sem realizar a devida higienização e/ou cozimento de animais que são reservatórios de tripanossomatídeos. Outra forma, que pode auxiliar no controle é informar a população suscetível, acerca das medidas de profilaxia, para evitar a presença dos triatomíneos nos ambientes, em que ocorre a manipulação desses alimentos (Souza *et al.*, 2023).

Sob condições normais de reprodução e dispersão, prevê-se que uma espécie esteja presente em uma região geográfica, que é diretamente congruente com a distribuição de seu nicho Grinnelliano (James *et al.*, 1984). Essa interpretação do nicho se concentra nas condições necessárias, para a existência da espécie e tem sido amplamente utilizada em estudos de estimativa do nicho e análises de distribuição de espécies. Para Peterson (2011), as espécies de *Rhodnius* e as palmeiras ocupariam regiões geográficas semelhantes se seus nichos Grinnellianos fossem semelhantes. Além disso, os locais com condições adequadas para as espécies de *Rhodnius* e palmeiras podem ser considerados, como zonas potenciais de ocorrência de *Rhodnius* (Peterson *et al.*, 2011; Ceccarelli *et al.*, 2018).

Nessa perspectiva, com o avanço da doença de Chagas na região Amazônica, há um risco para a população que aí reside, que também está associado às interações biológicas e aos determinantes sociais (Aguilar *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a presença marcante dos triatomíneos em palmeiras nas áreas rurais, em que se realizou as buscas desses vetores da DC, em especial as reservas extrativistas, ocorre risco marcante de transmissão de *T. cruzi*, pois as pessoas têm contato direto com as palmeiras

e as utilizam para atividades de subsistência (fonte de alimento e cobertura vegetal) e econômica (produção de polpas de frutas). Isso torna esses moradores, ainda mais suscetíveis a se infectar com *T. cruzi*, como acontece com os extrativistas das palmeiras *Leopoldinia piassaba* que é habitat de *R. brethesi* (Coura *et al.*, 1994; Coura *et al.*, 1999; Santos-Mallet *et al.*, 2005; Brum-Soares *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2008; Abad-Franch *et al.*, 2015; Coura; Junqueira, 2015).

Nesse sentido, este estudo aponta apenas três (03) espécies de palmeiras (*Attalea maripa*, *Attalea speciosa*, *Oenocarpus bataua*), presentes na região (Tabela 3), mas há ocorrência de triatomíneos do gênero *Rhodnius* e *Panstrongylus* em outras espécies de palmeiras, como *Attalea butyracea*, *Attalea phalerata*, *Acrocomia aculeata*, *Astrocaryum aculeatum*, *Astrocaryum murumuru*, *Astrocaryum* spp, *Phytelephas tenuicaulis*, *Elaeis guineenses*, *Copernicia alba*, *Mauritia Carana*, *Phytelephas tenuicaulis*, *Elaeis guineenses*, *Astrocaryum* spp, *Cocos nucifera* (*R. prolixus* e *R. pallescens*), *Cocos prunifera* (*R. neglectus*/*R. milesi*), *Cocos tectorum* (*R. prolixus*, *R. neivai*, *R. pallescens*), *Copernicia* spp (*P. geniculatus*), *Leopoldinia piassaba* (*R. brethesi* e *P. geniculatus*), *Oenocarpus distichus* (*R. neglectus*/*R. milesi* e *R. marabaensis*), *Phytelephas aequatorialis* (*R. ecuadoriensis*), *Sabal mauritiiformis* (*R. prolixus*), *Syagrus oleracea* (*R. neglectus*/*R. milesi*, *R. nasutus*), *Syagrus romanzoffiana* (*R. neglectus*/*R. milesi*), *Syagrus schizophylla* (*P. megistus*), *Livistona australis* (*R. neglectus*/*R. milesi*), *Roystonea borinquena* (*R. neglectus*/*R. milesi*), *Roystonea oleracea* (*R. neglectus*/*R. milesi*) (Abad-Franch *et al.*, 2015).

Assim, pode-se notar que é razoável supor que, em meio à diversidade de palmeiras existentes, e dado que muitas dessas palmeiras estão presentes no estado de Rondônia, elas podem servir de abrigo para a colonização de triatomíneos.

5.2 ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS COLETADOS

Os primeiros estudos que abordam *Rhodnius* spp., apontam suas tendências arborícolas, assim como *Panstrongylus*, geralmente estão ligados a tocas e ocos de árvores (Gaunt; Miles, 2000; Peixoto *et al.*, 2020). Nas coletas realizadas neste estudo foram identificadas as seguintes espécies: *Rhodnius montenegrensis* Rosa *et al.*, 2012, *R. robustus* Larrousse, 1927, *R. pictipes* Stål, 1872, *R. stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993, *Panstrongylus lignarius* (Walker, 1873) e *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811).

A partir desse cenário, as espécies da subfamília Triatominae citadas acima, são amplamente difundidas na região amazônica e em outras regiões do Brasil. Essa ampla distribuição é uma das explicações para a quantidade encontrada na região de Guajará-Mirim, representada por seis espécies. Além disso, a região está inserida em reservas florestais e extrativistas, que são ricas em variedade e quantidade de palmeiras, com uma grande diversidade de animais, que podem servir de fonte de alimentação sanguínea para o vetor (Bilheiro *et al.*, 2022).

Dessa maneira, a alimentação sanguínea dos triatomíneos é um fator importante para a presença dos triatomíneos, pois algumas palmeiras podem abrigar animais vertebrados. Desse modo, as espécies pertencentes ao gênero *Rhodnius* foram encontradas em estreita associação com palmeiras em seu ciclo silvestre (Lent; Wygodzinsky, 1979; Calderón; González, 2020). Algumas estão relacionadas a um tipo particular de palmeira, como *Rhodnius brethesi* às palmeiras *Leopoldinia piassaba*, enquanto outras, como *R. robustus*, estão associadas a várias espécies de palmeiras (Dias *et al.*, 2008; Abad-Franch *et al.*, 2015). As copas de palmeiras foram sugeridas como habitat adequado para *Rhodnius* spp., devido à sua estabilidade microclimática interna e disponibilidade de alimentos (Calderón; González, 2020).

Dessa forma, a estabilidade microclimática da palmeira, provavelmente resulta da inserção de folhas, criando um ambiente altamente protegido com temperatura e umidade estáveis, enquanto as fontes de sangue para os insetos *Rhodnius* são fornecidos animais, que visitam ou habitam a palmeira (Dias *et al.*, 2008; Calderón; González, 2020).

Desse modo, *Rhodnius montenegrensis* é a espécie, que mais foi coletada neste estudo. O que se esperava era encontrar alguns espécimes nas áreas de coleta, uma vez que o seu primeiro registro foi no estado de Rondônia, em Monte Negro (Rosa *et al.*, 2012), município este, que se encontra, a cerca de 260 km de Guajará-Mirim e da cidade boliviana de *Guayaramerín*, onde relatou-se a presença de *R. montenegrensis* em palmeiras *Oenocarpus bataua*, com positividade para *T. cruzi* (Menezes *et al.*, 2022).

Nesse contexto, estudos recentes na região de Guayaramerín reafirmam a presença de *R. montenegrensis* nessa localidade (Depickère *et al.*, 2022; Menezes *et al.*, 2022). Ainda nesse estudo, as ninfas de triatomíneos capturadas, durante a investigação foram identificadas, usando morfologia e biologia molecular e, como resultado os espécimes foram identificados, como *R. montenegrensis* e *R. stali*. Ou seja, não foram identificados *R. robustus* e *R. prolixus*, o que se assemelha aos nossos achados na região fronteira (Depickère *et al.*, 2022). Além de Rondônia e na Bolívia, há relatos de *Rhodnius montenegrensis* no Acre, Amazonas e Roraima (Meneguetti *et al.*, 2015; Madeira *et al.*, 2020; Gama Neto *et al.*, 2020).

Quando analisou-se o item infestação ou colonização, as espécies *R. montenegrensis*, *R. robustus* e *R. pictipes* (Monteiro *et al.*, 2001; Abad-Franch *et al.*, 2007; Fitzpatrick *et al.*, 2008; Abad-Franch *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2019), não há registros, somente a ocorrência dessas espécies em ambientes domésticos esporadicamente e, somente com a presença de adultos, o que não caracteriza processo de colonização nesses ambientes (Forattini, 1980; Aragão, 1983; Fé *et al.*, 2009; Barreto-Santana *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013). Diferentemente do que ocorre com o *R. prolixus* e *R. stali*, em que há relatos de infestação e colonização em alguns países do continente americano.

Rhodnius stali é uma espécie que, até o momento, tem mostrado pouca dispersão no continente americano, mas sua distribuição se concentra, principalmente na Bolívia, com relatos em todo o território, e no Brasil, onde há registros nos estados de Mato Grosso e Acre (Lent *et al.*, 1993; Meneguetti *et al.*, 2016; Jesus *et al.*, 2021; Depickère *et al.*, 2022).

Na Bolívia, a espécie é frequentemente encontrada como vetor, com índices considerados elevados de domiciliação ou peridomicílio e taxas de contaminação por *T. cruzi* (Matias *et al.*, 2001; Matias *et al.*, 2003; Jesus *et al.*, 2021). Vale ressaltar que, ao contrário dos relatos comuns em trabalhos anteriores, onde a espécie era frequentemente capturada em palmeiras da espécie *Attalea phalerata* e *Copernicia alba* (na Bolívia) e *Attalea butyracea* (no Acre, Brasil) (Brenière *et al.*, 2017; Calderón; González, 2020; Jesus *et al.*, 2021; Depickère *et al.*, 2022), foram encontrados exemplares em palmeiras da espécie *Oenocarpus pataua* (Menezes *et al.*, 2022).

As espécies *P. lignarius* e *P. geniculatus* estão intimamente associadas com uma diversidade de reservatórios, como animais silvestres (roedores e mamíferos), animais domésticos (cães e gatos) e em casos raros animais de estimação (Almeida; Machado, 1971; Galvão, 2014; Souza *et al.*, 2020; Abad-Franch; Gurgel-Gonçalves, 2021; Carcavallo *et al.*, 1999; Tineo-González *et al.*, 2023). Porém, nas coletas realizadas não foram encontrados exemplares, durante as buscas ativas em palmeiras dos gêneros *Attalea* e *Oenocarpus*.

A coleta dessas duas espécies ocorreu em armadilhas luminosas instaladas nas proximidades do prédio da Universidade Federal de Rondônia - UNIR. Pode-se supor que essas espécies tenham sido atraídas pela emissão de luz proveniente da lâmpada mista de 250w, conforme descrito por autores, que apontam a atração dos insetos, em especial os triatomíneos, por essa modalidade de luz (Miles *et al.*, 1981; Minoli; Lazzari, 2006; Fé *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2010; Erazo; Cordovez, 2016). Vetores esses associados com a transmissão via oral, que atraído pelos feixes de luz emitidos pelas lâmpadas, acabam se aproximando dos ambientes, em que ocorre a despolpa artesanal dos frutos oriundos da floresta (Zapparoli *et al.*, 2022).

Lembrando que esses ambientes, por vezes são precários ou sem a estrutura necessária, para boas práticas do manuseio do fruto, seja para comercializar ou para consumo próprio (Bezerra, 2018; Silva-Andrade *et al.*, 2020; Zapparoli *et al.*, 2022)

Nesse contexto, *Panstrongylus lignarius* e *P. geniculatus* estão frequentemente associadas a ninhos de aves e outros mamíferos, que servem como reservatórios do agente etiológico da doença de Chagas. Pesquisas demonstraram a presença dessas espécies em palmeiras das espécies *Mauritia carana* e *Mauritia flexuosa* (em cavidades nas árvores), que são diferentes das palmeiras examinadas nesta pesquisa (Abad-Franch *et al.*, 2015). Além disso, essas espécies, também podem ser encontradas em tocas de tatus (Almeida; Machado, 1971; Galvão, 2014; Souza *et al.*, 2020; Abad-Franch; Gurgel-Gonçalves, 2021; Carcavallo *et al.*, 1999; Tineo-González *et al.*, 2023).

Em consonância com esse panorâma, o fato de que algumas espécies de palmeiras são habitadas por vetores da doença de Chagas é de grande importância, do ponto de vista da saúde pública, uma vez que os triatomíneos, que vivem nas palmeiras podem infestar casas próximas (Fitzpatrick, *et al.*, 2008). A migração de *Rhodnius* das palmeiras, para as residências pode representar uma ameaça aos programas de controle de vetores realizados, durante as iniciativas de combate à doença de Chagas, pois pode resultar na reinfestação de habitações tratadas com inseticidas (Sanchez-Martin *et al.*, 2006).

5.3 INFECÇÃO DE TRIATOMÍNEOS POR *TRYPANOSOMA*

Trypanosoma cruzi apresenta heterogeneidade, que pode ser observada nas mais variadas espécies de reservatórios (vertebrados e invertebrados), por essa característica, vários autores optaram por classificá-lo em Unidades Discretas de Tipagem (DTUs) (Zingales *et al.*, 1999; 2009; 2012; Lima *et al.*, 2015; Zingales *et al.*, 2018; 2022). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com estudos realizados em regiões amazônicas, inclusive estudos no estado de Rondônia (Miles *et al.*, 1983; Maia da Silva *et al.*, 2009; Marcili *et al.*, 2009; Coura *et al.*, 2014; Bilheiro *et al.*, 2018; Julião *et al.*, 2021; Dario *et al.*, 2021; Bilheiro *et al.*, 2022; Depickère *et al.*, 2022; Vergara-Meza *et al.*, 2022).

Quanto ao protozoário *T. cruzi*, é importante investigar a relação desse flagelado com os triatomíneos, sua caracterização e a ocorrência de *T. rangeli*. Vale ressaltar, que a escolha, para realizar a análise molecular dos triatomíneos adultos se baseou no relato de que na região pesquisada não há registro de transmissão da doença e por ser uma região Amazônica considerada não endêmica, para a enfermidade. Portanto, surge a possibilidade de que a

propagação da doença ocorra pela dispersão dos vetores na fase adulta para áreas humanas (Coura *et al.*, 1999).

Apesar do foco ter sido a identificação dos espécimes adultos, este trabalho examinou o conteúdo intestinal de mais de 500 triatomíneos por Reação em Cadeia da Polimerase-PCR. Como resultados das análises obteve-se 52% de positividade, para tripanossomatídeos, *T. cruzi* e *T. rangeli*.

Mas, quando se observa a tabela 13, observa-se que os números de positivos na microscopia óptica se mostrou maior, que a identificação por biologia molecular. Isso pode ser justificado hipoteticamente pela baixa quantidade de parasita presente nas fezes e intestino dos triatomíneos examinados, pois primeiramente realizava-se as análises microscópicas e, então armazenava-se as amostras (fezes/intestino) em álcool absoluto.

Dessa maneira, as investigações por MO, somente eram consideradas positivas aquelas, que nas leituras laminares apresentaram, pelo menos uma forma celular flagelada, o que atestaria a positividade para tripanossomatídeos dos espécimes. Assim essa baixa parasitemia nas investigações por MO, pode ter contribuído, para baixa concentração de DNA extraído dos triatomíneos positivos, fazendo com que apresentassem negatividades em 21 amostras consideradas positivas para MO.

Em Rondônia, um dos primeiros estudos, acerca dos triatomíneos com infecção para tripanossomatídeos apresentou 23,7% de positividade (Massaro *et al.*, 2008). Em 2011, Carvalho e colaboradores descreveram, que na região rural de Monte Negro, RO, os triatomíneos encontrados apresentavam 50% de taxa de infecção para *T. cruzi*. Meneguetti (2012), em Ouro Preto do Oeste, também pertencente a Rondônia foi constatado que os triatomíneos capturados na região apresentaram, cerca de 35% de infecção por tripanossomatídeos (Meneguetti *et al.*, 2012). Outro estudo realizado no estado, analisou 22 espécimes, em que houve 72,7% positivo para *T. cruzi* e 9,1% para *T. rangeli*, houve também infecção mista (9,1%) (Bilheiro *et al.*, 2018).

Outros pesquisadores como Julião e colaboradores (2021) em seu estudo apontou que 51,4% dos 72 triatomíneos analisados e 47,2% positivo para *T. rangeli* e 33% apresentaram infecção mista. Nos municípios (Alvorada do Oeste, Buritis, Costa Marques, Guajará-Mirim e Pimenterias do Oeste), em que foram realizados a captura de triatomíneos foi realizada em palmeiras, como resultado, obtiveram 15 espécimes de *Rhodnius spp* e desses, nenhum apresentou positividade para (*T. cruzi* ou *T. rangeli*) (Julião e al., 2021).

Em outro estudo realizado na Bolívia em Guayaramerín, do departamento de Beni, Bolívia foram realizadas coletas em palmeiras de vários gêneros, inclusive *Attalea* e obtiveram

seis espécimes de *R. robustus* e, apenas uma única ninfa (N5), apresentou positividade para *T. cruzi* (Depickère *et al.*, 2022).

Neste estudo também realizou-se coletas em Guayaramerín, região fronteira com o Brasil, em que se obteve 26 espécimes da *R. montenegrensis*. Esse estudo, objeto desta tese, traz dados inéditos para o Estado de Rondônia e para o município Guajará-Mirim, pois detectou-se a presença de infecções mistas, por meio de análises genotípicas em espécies de *Rhodnius*; dados, até, então desconhecidos na literatura pesquisada (tabela 12 e 13).

Para tanto, este trabalho traz os primeiros registros dos genótipos de *T. cruzi* e a linhagem de *T. rangeli*, para o município e estado de Rondônia em triatomíneo nas espécies *R. montenegrensis*, *R. robustus*, *R. stali*. O estado de Rondônia é alvo de pesquisas, acerca das doenças de Chagas, principalmente, seus vetores e suas infecções pelos tripanossomatídeos (Miles *et al.*, 1983; Coura *et al.*, 2002; Maia da Silva *et al.*, 2007; Aguilar *et al.*, 2007; Massaro *et al.*, 2008; Marcili *et al.*, 2009; Maia da Silva *et al.*, 2009; Julião *et al.*, 2022).

Nesse contexto, as espécies do gênero *Rhodnius*, são apontadas com os principais vetores da DC e rangeliase na região amazônica (Miles *et al.*, 1983a; Coura *et al.*, 2002; Aguilar *et al.*, 2007; Maia da Silva, 2007, 2008, 2009). Essas espécies citadas foram capturadas em Guajará-Mirim, com a positividade para *T. cruzi* e *T. rangeli*.

Neste estudo foram detectados os grupos TcI, TcIV de *T. cruzi* em *Rhodnius* spp. e *Panstrongylus* spp., conforme descrito nos resultados, os quais corroboram para os estudos recentes realizados no estado. Dados, que reafirmam os obtidos por Julião *et al.*, (2021) e Bilheiro *et al.*, (2018), pois foram coletados *Rhodnius* spp. infectados com *T. cruzi*, *T. rangeli* e com infecções mistas. Outro autor aponta, para a presença de DTUs TcI e TcIII em *P. geniculatus* e *R. robustus* infectado com TcI, corroborando com os achados do estudo (Rojas-Cortez *et al.*, 2016; Julião *et al.*, 2022).

Trypanosoma rangeli, apesar de não ser considerado patogênico aos humanos, possui capacidade de infecção. Então entender a dinâmica de dispersão e seus possíveis vetores é fundamental, para entender seu comportamento e hipotetizar formas de controle. Além de contribuir para o entendimento do seu efeito no corpo humano e meios de transmissão (Vallejo *et al.*, 1988; Guhl; Vallejo, 2003; Garcia *et al.*, 2012).

Dessa forma, a linhagem A de *T. rangeli* é apontada com bastante frequência em trabalhos no estado de Rondônia e na região Norte (Aguilar *et al.*, 2007; Maia da Silva, 2007, 2008, 2009; Julião *et al.*, 2022; Vergara- Meza *et al.*, 2022). Nas seis áreas pesquisadas deste projeto *T. rangeli* tipo A foi a única linhagem encontrada em *Rhodnius montenegrensis*, *R. robustus* e *R. stali* e não foi detectada nas duas espécies de *Panstrongylus*.

Destaca-se nos resultados obtidos, que as três espécies de *Rhodnius* referidas anteriormente encontravam-se com infecções mistas, isto é, *T. cruzi* (TcI e TcIV) ou *T. cruzi* com *T. rangeli*. Assim o método FFLB conseguiu distinguir com precisão tripanossomatídeos, que infectavam o sistema digestório de três espécies de *Rhodnius*, conforme já observado por Garcia *et al.*, 2018. Por meio dessa técnica da utilização foi possível detectar em *R. montenegrensis* *T. cruzi* (TcI, TcIV e TcI/TcIV) e *T. rangeli* (TrA e TcI/TcI/TrA) e em *R. stali* (TrA e TcI). Dados semelhantes foram relatados no Acre e em Rondônia, inclusive com infecção mista em humanos (Vergara- Meza *et al.*, 2022).

Assim como, o estudo citado acima destaca a presença de trypanossomatídeos com *T. cruzi* e *T. rangeli*, há relatos desde 1983, registrando a identificação de DTUs TcI e TrA, em regiões amazônicas (Miles *et al.*, 1983; Póvoa *et al.*, 1984; Julião *et al.*, 2022).

Nas seis coletas conduzidas observou-se a presença de roedores, mamíferos, aves, répteis, além de cupins e formigas. Este estudo desenvolvido na região Amazônica mostra as possíveis fontes de alimentação de triatomíneos, que são hematófagos. *Didelphis marsupialis*, que foi uma das espécies de mamíferos identificada com validade epidemiológica, devido à sua facilidade em disseminar formas infectantes de *T. cruzi* (Valente *et al.*, 1998). Diversas regiões do Estado de Rondônia apontam *Tamandua tetradactyla*, *Coendou prehensilis* e *Didelphis marsupialis*, como as principais fontes de alimentação de *Rhodnius* em Rondônia (Bilheiro *et al.*, 2022).

Portanto, em Rondônia, apesar de não haver registros de mini surtos por DCA, as possibilidades estão estabelecidas, como demonstram os resultados obtidos neste trabalho. Além disso, comparar os dados da positividade em Rondônia e na região Norte do Brasil com os dados identificados em outras áreas é essencial, para uma compreensão abrangente da disseminação da doença e sua dinâmica epidemiológica. Isso permitirá avaliar o risco potencial de transmissão da doença de Chagas em áreas anteriormente não endêmicas e implementar medidas de controle apropriadas.

6 CONCLUSÃO

O estudo realizado no município de Guajará-Mirim revela a presença de triatomíneos infectados por tripanossomatídeos uma realidade, que merece atenção. O registro de espécies de triatomíneos em palmeiras e em ambientes humanos na região foi mostrado nesta pesquisa

Na região, a presença abundante de palmeiras é significativa em todo o território do município, com a predominância da espécie de palmeira *Attalea speciosa*, que é um dos habitats preferenciais do vetor da doença de Chagas.

Nesse contexto, os gêneros *Panstrongylus* e *Rhodnius* foram os únicos encontrados no município, com as espécies *P. lignarius*, *P. geniculatus*, *R. montenegrensis*, *R. pictipes*, *R. robustus* e *R. stali*.

Dessa forma, *Panstrongylus lignarius* e *P. geniculatus* foram coletados, apenas, por meio de armadilhas luminosas e invasões em ambientes considerados domésticos, enquanto as espécies de *Rhodnius* estavam presentes em ambientes silvestres (palmeiras) e em ambientes peridomiciliares e domiciliares. *Rhodnius montenegrensis* mostrou ser a espécie predominante entre as relatadas.

Em relação à infecção dos triatomíneos por tripanossomatídeos, foi identificada a ocorrência de espécies de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. O estudo, também identificou a presença de unidades de tipagem discreta (DTUs) TcI e TcIV, com casos de infecção mista (TcI/TcIV). Além disso, foi observada a presença da linhagem A de *T. rangeli*, inclusive em infecções mistas com os genótipos do *T. cruzi*. Isso destaca a importância da vigilância e do controle, para prevenir a transmissão da doença de Chagas e outras infecções relacionadas com tripanossomatídeos na região.

De fato, é evidente que a população do município, tanto na área rural, quanto na urbana, pode estar em risco de infecção por *T. cruzi* e *T. rangeli*, seja, por meio das formas clássicas de transmissão ou pela via oral. A proximidade com a Bolívia, que enfrentou surtos recentes de transmissão via oral aumenta, ainda mais a importância da vigilância e do controle dessa doença na região, devido ao processo migratório entre as cidades-gêmeas Guayaramerín (Distrito de Beni, Bolívia) e Guajará-Mirim (Rondônia, Brasil), pois pode contribuir para a disseminação dos parasitos, entre as populações de ambos os lados da fronteira.

Dessa maneira, o município possui uma grande extensão territorial em reservas extrativistas e áreas indígenas, o que aumenta o risco de infecção para os residentes dessas localidades, uma vez que dependem da floresta para sua subsistência. Portanto, a vigilância epidemiológica desempenha um papel fundamental no processo de controle e monitoramento

dos triatomíneos em ambientes domésticos e peridomiciliares, permitindo a implementação de medidas preventivas e de controle adequados, para proteger a saúde da população.

7 REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F. *et al.* On palms, bugs, and Chagas disease in the Americas. **Acta tropica**, v. 151, p. 126-141, 2015.

ABAD-FRANCH, F. *et al.* Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: a multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). **Acta Tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 159-177, 2009.

ABAD-FRANCH, F.; MONTEIRO, F. A. Biogeography and evolution of Amazonian triatomines (Heteroptera: Reduviidae): implications for Chagas disease surveillance in humid forest ecoregions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 57-70, 2007.

ABAD-FRANCH., F. *et al.* All that glisters is not gold: sampling-process uncertainty in disease-vector surveys with false-negative and false-positive detections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3187, 2014.

ABAD-FRANCH, F.; GURGEL-GONÇALVES, R. Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. e620, 2010.

ABEGG, C. P. *et al.* Polymorphisms of blood forms and in vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. **Experimental Parasitology**, v. 176, p. 8-15, 2017.

ABREU PEDRA, R. *et al.* Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da Doença de Chagas na fase crônica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 13, n. 2, p. 5-9, 2011.

AGUILAR, H. M. *et al.* Chagas disease in the Amazon Region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 47-56, 2007.

ALARCÓN DE NOYA, B. *et al.* Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 9, p. 1308-1315, 2010

ALEJANDRE-AGUILAR, R. *et al.* *Triatoma pallidipennis* (Stål, 1872) (Hemiptera: Reduviidae) and its potential for infestation in Tecozautla, Hidalgo state, Mexico. **Journal of Vector Ecology**, v. 48, n. 1, p. 1-6, 2023.

ALEVI, K. C. C. *et al.* Trends in taxonomy of Chagas disease vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): from Linnaean to integrative taxonomy. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1627, 2021.

ALMEIDA, C. E. *et al.* Dispersion capacity of *Triatoma sherlocki*, *Triatoma juazeirensis* and laboratory-bred hybrids. **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, p. 71-79, 2012.

ALMEIDA, F. B.; MACHADO, P. A. Sobre a infecção do *Panstrongylus geniculatus* pelo *Trypanosoma cruzi* em Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 1, p. 71-75, 1971.

ALVES, C. L. **Caracterização de atividades salivares e intestinais relacionadas ao processo alimentar de *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) sobre hospedeiros invertebrados e vertebrados.** 2011. p. 138. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

ANDAM, C. P. *et al.* Population structure of pathogenic bacteria. In: Tibayrenc M, editor. **Genetics and evolution of infectious diseases.** 2nd ed. Amsterdam: Elsevier. 2017.

ANEZ, N. *et al.* Acute Chagas disease outbreak of possible oral transmission in Merida, Venezuela. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v. 53, n. 1, p. 01-10, 2013.

ARAGÃO, M. B. Domiciliary adaptation of triatomine or pre-adaptation to anthropophily and ornithophily?. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, p. 51-55, 1983.

ARAÚJO, J. C. **Análise de eficiência dos municípios paraibanos na aplicação de recursos do Governo Federal para o Controle da Doença de Chagas—uma investigação por meio de Análise Envoltória de Dados João Pessoa 2017.** 2018. 68 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, Paraíba. 2018.

ARAÚJO, R. N. *et al.* Interação entre os insetos hematófagos e seus hospedeiros vertebrados. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**, v. 1, n. 2, p. 1-15, 2012.

ARAUJO, R. N.; SOARES, A. C.; PAIM, R. M. The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 83-89, 2009.

ARGOLO, A. M; FELIX, M; PACHECO, R. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil.** 2. Ed. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 2008. p. 63.

BARATA, J. M. S. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae: II- Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera-Reduviidae). **Revista de Saúde Pública**, v. 15, n. 5, p. 490-542, 1981.

BARRETO-SANTANA, D. *et al.* Biologia comparativa e comportamento alimentar de *Rhodnius neglectus* e *Rhodnius robustus* (Triatominae) sob condições de laboratório. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 490-495, 2011.

BARRETO, M. P. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, p. 339-353, 1976.

BARRETT, T. V. Advances in triatomine bug ecology in relation to Chagas' disease. **Advances in Disease Vector Research**, p. 143-176, 1991.

BARRETTO, M. P; RIBEIRO, R. D. Trypanosomas of the subgenus *Herpetosoma* Doflein 1901 in wild rodents, with a description of 3 new species. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 41, n. 3, p. 485-497, 1981.

BENNET-CLARK, H. C. Negative pressures produced in the pharyngeal pump of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 40, n. 1, p. 223-229, 1963.

BÉRENGER, J.M. *et al.* he Triatominae species of French Guiana (Heteroptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1111-1116, 2009.

BEZERRA, V. S. **Açaí seguro: choque térmico nos frutos de açaí como recomendação para eliminação do agente causador da doença de Chagas**. Macapá: EMPRAPA, 2018.

BILHEIRO, A. B. *et al.* First report of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 18, n. 11, p. 605-610, 2018.

BILHEIRO, A. B. *et al.* Identification of blood meal sources in species of genus *Rhodnius* in four different environments in the Brazilian amazon. **Acta Tropica**, v. 232, p. 106486, 2022.

BLOHM, L. *et al.* Domiciliation and sympatry of *Triatoma maculata* and *Rhodnius prolixus*, risk of *Trypanosoma cruzi* transmission in villages of Anzoátegui, Venezuela. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 46, n. 1, p. 37-46, 2022.

BRAGA, M. V.; PINTO, Z. T.; LIMA, M. M. Life cycle and reproductive patterns of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773)(Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 539-542, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Territorialização e vulnerabilidade para doença de Chagas crônica: 14 de abril, dia mundial de combate à doença de Chagas**. Boletim Epidemiológico. N Esp:1-51. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-especial-de-doenca-de-chagas-numero-especial-abril-de-2022>

BRASIL. MS - Ministério da Saúde do Brasil. **Doença de Chagas aguda: notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net. 2016**. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/doenca-de-chagas-aguda>

BRENER Z, ANDRADE Z. ***Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

BRENIÈRE, S. F. *et al.* Molecular identification of wild triatomines of the genus *Rhodnius* in the Bolivian Amazon: strategy and current difficulties. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 51, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.002>.

BRICEÑO-LEÓN, R. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n.1 p. S71-S82, 2009.

BRITO, R. N. *et al.* Transcriptome-based molecular systematics: *Rhodnius montenegrensis* (Triatominae) and its position within the *Rhodnius prolixus*–*Rhodnius robustus* cryptic–species complex. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2019.

BRUM-SOARES, L. M. *et al.* Morbidade da doença de Chagas em pacientes autóctones da microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 170-177, 2010.

CABEZÓN, E. *et al.* Towards an integrated model of bacterial conjugation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 1, p. 81-95, 2015.

CALDERÓN, J. M.; GONZÁLEZ, C. Co-occurrence or dependence? Using spatial analyses to explore the interaction between palms and *Rhodnius* triatomines. **Parasites & vectors**, v. 13, p. 1-12, 2020.

CAMARGO, E. P.; WALLACE, F. G. Vectors of plant parasites of the genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophorea, Kinetoplastida). **Advances in disease vector research**, p. 333-359, 1994.

CAMPETELLA, F. *et al.* Comparative dissection of the peripheral olfactory system of the Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *Rhodnius brethesi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. e0009098, 2021.

CARCAVALHO, R. U. *et al.* Habitats e Fauna relacionada. In: CARCAVALHO, R. U. *et al.* **Atlas dos vetores da Doença de Chagas nas Américas**. 1. Ed. v. I Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. p. 471-471.

CASTILLO-RIQUELME, M. *et al.*, The costs of preventing and treating Chagas disease in Colombia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 11, p. e336, 2008.

CASTRO, M. *et al.* Attraction of Chagas disease vectors (Triatominae) to artificial light sources in the canopy of primary Amazon rainforest. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 1061-1064, 2010.

CATALÁ, S.; CROCCO, L. B.; MORALES, G. F. *Trypanosoma cruzi* transmission risk index (TcTRI): an entomological indicator of Chagas disease vectorial transmission to humans. **Acta tropica**, v. 68, n. 3, p. 285-295, 1997.

CATALÁ, S. Searching for triatomines. A new method for field search using UV light. **Acta tropica**, v. 116, n. 1, p. 111-114, 2010.

CATALÁ, S. S.; NOIREAU, F.; DUJARDIN, J. P. Biology of triatominae. In: American Trypanosomiasis Chagas Disease. **Elsevier**. v1, p. 145-167, 2017.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. Proceedings of the Royal Society of London. **Series B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1545, p. 1251-1262, 2004.

CAVAZZANA, J. R. M. *et al.* Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (*Cyt b*) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 3, p. 345-355, 2010.

CAZORLA-PERFETTI, D. *Psammolestes arthuri* naturalmente infectado con *Trypanosoma cruzi* encontrado en simpatria con *Rhodnius prolixus* y *Triatoma maculata* en nidos de aves en el estado Anzoátegui, Venezuela. **Saber**, v. 27, n. 2, p. 324-327, 2015.

CECCARELLI, B. A. *et al.* Analysis of Chagas disease vectors occurrence data: the Argentinean triatomine species database. **Biodiversity data journal**, v. 8, 2020.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CORRÊA-DO-NASCIMENTO, G. S. *et al.* The rediscovery of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in the state of Espírito Santo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2020.

COSTA, J. R.; LORENZO, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines-Chagas disease vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 46-51, 2009.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.

COURA, J. R. **Síntese das doenças infecciosas e parasitárias**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 314-314.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 277-282, 2015.

COURA, J. R. *et al.* Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 379-384, 1999.

COURA, J. R. *et al.* Emerging chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 4, p. 171-176, 2002., v. 18, n. 4, p. 171-176, 2002.

COURA, J. R.; BARRETT, T. V.; NARANJO, M. A. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 251-253, 1994.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main sceneries in the Brazilian Amazon. **Acta tropica**, v. 151, p. 51-57, 2015.

CROCCO, L. *et al.* Factors associated with the presence of triatomines in rural areas of south Argentine Chaco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

D'ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In **Parasitic Protozoa**, 2nd San Diego, CA, USA: Academic Press v 2, pp. 1–54. 1992.

DA SILVA ANDRADE, J. K. *et al.* Qualidade microbiológica de polpas de açaí comercializadas em um estado do nordeste brasileiro/Microbiological quality of açaí pulps marketed in a state of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 12215-12227, 2020.

DA SILVA, F. M.; MARCILI, A.; LIMA, L. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. **Acta Tropica**, v. 109, n. 3, p. 199-207, 2009.

DALE, C. *et al.* *Belminus santosmalletae* (Hemiptera: Heteroptera: Reduviidae): new species from Panama, with an updated key for *Belminus* Stål, 1859 species. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 686, 2021.

DEANE M.P; LENZI, H. L.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 513-515, 1984.

DEPICKÈRE, S. *et al.* *Rhodnius* (Stål, 1859)(Hemiptera, Triatominae) genus in Bolivian Amazonia: a risk for human populations?. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 307, 2022.

DIAGNÓSTICO da situação atual do manejo florestal comunitário nas reservas extrativistas estaduais de Rondônia. Porto Velho, RO: OSR- Organização dos Seringueiros de Rondônia e WWF, 2005.

DIAS, F. B. S. *et al.* Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 824-830, 2008.

DIAS FILHO, Moacyr Bernardino. **Estratégias de recuperação de pastagens degradadas na Amazônia brasileira**. 2015. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1019156>. Acesso em: 20 ago 2023.

DIAS-LIMA, A. G. *et al.* Wild habitat and related fauna of *Panstrongylus lutzi* (Reduviidae, Triatominae). **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 989-990, 2003.

DIAS, E. Doença de Chagas nas Américas III. América Central. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 4, p. 75-84, 1952.

DIAS, F. B. S. *et al.* Ecological aspects of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in palms of the Chapada do Araripe in Ceará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 824-830, 2008.

DIAS, F. B. S. *et al.* Ecology of *Rhodnius robustus* larrousse, 1927 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in *Attalea* palm trees of the Tapajós river region (Pará state, Brazilian Amazon). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2014.

DIAS, F. B. S. *et al.* *Tamandua tetradactyla* Linnaeus, 1758 (Myrmecophagidae) and *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927 (Triatominae) infection focus by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 (Trypanosomatidae) in *Attalea phalerata* Mart. ex Spreng (Arecaceae) palm tree in the Brazilian Amazon. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 8, p. 1278-1281, 2010.

DÍAZ-ALBITER, H. M. *et al.* Everybody loves sugar: first report of plant feeding in triatomines. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1-8, 2016.

DIAZ-UNGRIA, C. Transmission du *Trypanosoma cruzi* chez les mammifères. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 41, n. 6, p. 549-571, 1966.

DOMINGUEZ, O. A. E. **Diversidade, taxonomia e filogenia de tripanossomatídeos da subfamília Leishmaniinae**. 2015. 117 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

DORIA, C. R. C. **Viabilidade do ecoturismo como alternativa de renda para comunidades na Amazônia**. 270 f. 2004. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável do Trópico Úmido) - Núcleo de Altos Estudos Amazônicos, Universidade Federal do Pará. Belém, 2004.

SANTANA, V. O. **Reservas extrativistas estaduais de Rondônia: uma história em construção**. 2007. Dissertação (Mês trado em Ciências Sociais) - Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade Estadual Paulista - campus de Marília. Marília, 2007.

DRANSFIELD, J. *et al.* **Genera palmarum: the evolution and classification of palms**. 1. Ed. Chicago: International Palm Society, 2014. p. 732.

DUJARDIN, J. P. *et al.* Epidemiological status of kissing-bugs in South East Asia: a preliminary assessment. **Acta tropica**, v. 151, p. 142-149, 2015.

DUJARDIN, J. P; SCHOFIELD, C. J; PANZERA, F. **Les Vecteurs de la Maladie de Chagas**. 1. Ed. Brussels: Recherches Taxonomiques, Biologiques et Génétique, 2000. 162 p.

EBERHARD, F. E. *et al.* Modelling the climatic suitability of Chagas disease vectors on a global scale. **Elife**, v. 9, p. e52072, 2020.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 119-134, 2019.

EMRONDÔNIA. **Estação histórica da EFMM no distrito de Iata é revitalizada e será ponto de atendimento ao turista**. 2022. Disponível em: <https://www.emrondonia.com/destaques/estacao-historica-da-efmm-no-distrito-de-iata-e-revitalizada-e-sera-ponto-de-atendimento-ao-turista/>. Acesso em: 08 jun. 2023.

ERAZO, D; CORDOVEZ, J. The role of light in Chagas disease infection risk in Colombia. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2016.

FAB. Comissão de Aeroportos da Região Amazônica. Força Area do Brasileira. Disponível em <https://www2.fab.mil.br/comara/index.php/historico>. Acesso em 08 jun 2023.

FÉ, N. F.; MAGALHÃES, L. K.; FÉ, F. A. *et al.* Ocorrência de triatomíneos em ambientes silvestres e domiciliares do município de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 642-646, 2009.

FERMINO, B. R. **Filogenia e taxonomia de tripanossomas de vertebrados aquáticos**. 2017. 134 p. Tese (Doutorado em Ciencias) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

FERREIRA, R. A. Primeiro encontro de *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: reduviidae) no município de Açucena, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v.43, n.3, p. 369-374.2014.

FITZPATRICK, S.; FELICIANGELI, M. D.; SANCHEZ-MARTIN, M. J. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, p. e210, 2008.

FORATTINI, O. P. *et al.* Aspectos ecológicos da tripanossomose americana: III-Dispersão local de triatomíneos, com especial referência ao *Triatoma sordida*. **Revista de Saúde Pública**, v. 5, p. 193-205, 1971.

FORLANI, L. *et al.* Biological control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* combined with an aggregation cue: field, laboratory and mathematical modeling assessment. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003778, 2015.

FRANZÉN, O. *et al.* Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2012.

FREITAS, V. L. T. D. *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcI and TcIV in two outbreaks of orally-transmitted Chagas disease in the Northern region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 65, 2023.

G1 Rondônia. Moradores de área rural em Guajará, RO, podem regularizar propriedade. 2015. Disponível em <https://g1.globo.com/ro/rondonia/noticia/2015/05/moradores-de-area-rural-em-guajara-ro-podem-regularizar-propriedades.html>. Acesso em 08 jun 2023.

GALENO, É. O. *et al.* First report of *Rhodnius amazonicus* Almeida, Santos & Sposina, 1973 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) invading a dwelling in the state of Amapá, Brazil. **Heliyon**, v. 9, n. 5, 2023.

GALVÃO, A. B. *et al.* Sobre a distribuição geográfica e infecção natural do *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 13, p. 57-60, 1961.

GALVÃO, C. *et al.* **Taxonomia dos Vetores da Doença de Chagas da Forma à Molécula, quase três séculos de história**. Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores. São Paulo: Strictu Ssensu Editora, p. 9-37, 2020.

GALVÃO, C.; JUSTI, S. A. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 151, p. 116-125, 2015.

GALVÃO, C. A sistemática dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. **Entomol Vect**, v. 10, n. 4, p. 511-30, 2003.

GALVÃO, C., (org.) Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. **Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia**, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>

GAMA NETO, J. L. *et al.* Two new records of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Roraima state, Brazil. **Revista Chilena de Entomología**, v. 46, n. 2, 2020.

GARCIA, E. S. *et al.* Parasite-mediated interactions within the insect vector: *Trypanosoma rangeli* strategies. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2012.

GAUNT, M.; MILES, M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 557-565, 2000.

GAUNT, M. W. *et al.* Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 936-939, 2003.

DARIO, M. A.; PAVAN, M. G.; RODRIGUES, M. S. *Trypanosoma rangeli* genetic, mammalian hosts, and geographical diversity from five Brazilian biomes. **Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 736, 2021.

GIL-SANTANA, H. R. *et al.* *Panstrongylus noirequi* a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. **ZooKeys**, v. 1104, p. 203, 2022.

GIOJALAS, L. C.; CATALA, S. Changes in male *Triatoma infestans* reproductive efficiency caused by a suboptimal temperature. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, n. 4, p. 297-302, 1993.

GORLA, D. E.; SCHOFIELD, C. J. Analysis of egg mortality in experimental populations of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. **Bull. Sociedade Vector Ecology**, v. 10, p. 107-117, 1985.

GORLA, D.; NOIREAU, F. **Geographic distribution of Triatominae vectors in America**. In: American trypanosomiasis Chagas disease. Elsevier, 2017. p. 197-221.

GORLA, D.; NOIREAU, F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In American Trypanosomiasis Chagas Disease. **Elsevier**, v1, n. 1 pp. 197–221, 2017.

GORLA, D. E. *et al.* Different profiles and epidemiological scenarios: past, present and future. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e200409, 2022.

GORLA, D. E; SCHOFIELD, C. J. Population dynamics of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in the Argentine Chaco. **Medical and veterinary entomology**, v. 3, n. 2, p. 179-194, 1989.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. **Pequenos produtores da Gleba Comara, Guajará-Mirim, recebem títulos definitivos de suas propriedades**. 2023. Disponível em: <https://rondonia.ro.gov.br/pequenos-produtores-da-gleba-comara-guajara-mirim-recebem-titulos-definitivos-de-suas-propriedades/> Acesso em: 8 jun. 2023.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. **Plano de manejo da reserva extrativista estadual Rio Pacaás Novos, com vistas à exploração de uso múltiplo**. 1. ed. Guajará-Mirim, Rondônia, 2004. 103 p.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. **Resex de Rondônia denunciam omissões de governos**. 2005. Disponível em http://www.gta.org.br/noticias_exibir.php?cod_cel=1534. Acesso em: 23 maio 2006.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. **Diagnóstico das Unidades de Conservação Estadual: Reservas Extrativistas**, 1. Ed. Porto Velho, Rondônia. 2002.

GOVERNO DO ESTADO DE RONDÔNIA. **Plano de Zoneamento socioeconômico-ecológico de Rondônia**. 2010. Disponível em: http://www.amazonia.cnpia.embrapa.br/publicacoes_estados/Rondonia/ZEE_Rondonia.pdf Acesso em 16 set 2023.

GREWAL, M.S. Pathogenicity of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 in the invertebrate host. **Experimental Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 123-30, 1957.

GRIJALVA M. J. *et al.* Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the Amazon region of Ecuador. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 4, p. 380-385, 2003.

GRISARD, E. C. Salivaria or stercoraria? The *Trypanosoma rangeli* dilemma. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, p. 1-2, 2002.

GUERENSTEIN, P. G.; LAZZARI, C. R. Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. **Acta tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 148-158, 2009.

GUHL, F. *et al.* Solation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. **American Journal of Physical Anthropology: The Official Publication of the American Association of Physical Anthropologists**, v. 108, n. 4, p. 401-407, 1999.

GUHL, F.; AUDERHEIDE, A.; RAMÍREZ, J. D. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. **International journal for parasitology**, v. 44, n. 9, p. 605-612, 2014.

GUHL, F.; PINTO, N.; AGUILERA, G. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 71-75, 2009.

- GUHL, F. Chagas disease in Andean countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 29-38, 2007
- GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 435-442, 2003.
- GURGEL, C. B.; MAGDALENA, C. V.; PRIOLI, L. F. A Tripanossomíase Americana antes de Carlos Chagas. **Cadernos Saúde Coletiva**. Rio Janeiro. 2009.
- GURGEL-GONÇALVES, R.; ABAD-FRANCH, F.; FERREIRA, J.B.C. et al. Is *Rhodnius prolixus* (Triatominae) invading houses in central Brazil?. **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 90-98, 2008.
- GURGEL-GONÇALVES, R. *et al.* Sampling *Rhodnius neglectus* in *Mauritia flexuosa* palm trees: a field study in the Brazilian savanna. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 3, p. 347-350, 2003.
- GYORKOS, T. *et al.* Eliminating morbidity caused by neglected tropical diseases by 2030. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. e16, 2023.
- HAMILTON, P. B.; STEVENS, J. R. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In: **American Trypanosomiasis Chagas Disease**. Elsevier, 2017. p. 321-344.
- HAMILTON, P. B. *et al.* Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. **International journal for parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1393-1404, 2004.
- HAMILTON, P. B.; TEIXEIRA, M.M. G; STEVENS, J. R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the ‘bat seeding’ hypothesis. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 4, p. 136-141, 2012.
- HAMPL, V.; HUG, L.; LEIGH, J. W. *et al.* Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 10, p. 3859-3864, 2009.
- HASHIMOTO, K.; SCHOFIELD, C. J. Elimination of *Rhodnius prolixus* in central America. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 1-10, 2012.
- HERNÁNDEZ, C.; ROSA, J. A.; VALLEJO, G. A. Taxonomy, evolution, and biogeography of the Rhodniini tribe (Hemiptera: Reduviidae). **Diversity**, v. 12, n. 3, p. 97, 2020.
- HIWAT, H. Triatominae species of Suriname (Heteroptera: Reduviidae) and their role as vectors of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 452-458, 2014.
- HOCHBERG, N. S.; MONTGOMERY, S. P. Chagas Disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 176, n. 2, p. ITC17-ITC32, 2023.
- HURD, H. Reproductive disturbances induced by parasites and pathogens of insects, p. 87-93. In: BECHAGE, N. E; THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.). **Parasites and pathogens of insects**, San Diego, v. 1, P.1, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Guajará-Mirim: Histórico. IBGE, [s.d.]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ro/guajara-mirim/historico>. Acesso em: 08 jun. 2023.

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Plano de Manejo da Reserva Extrativista do Rio Ouro Preto/RO. Brasília, 2014. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/amazonia/lista-de-ucs/resex-do-rio-ouro-preto/arquivos/versao_completa_21_08_2014_com_mapas.pdf. Acesso em: 8 jun. 2023.

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Brasília: ICMBio, 2017. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/assuntos/biodiversidade/unidade-de-conservacao/unidades-de-biomas/amazonia/lista-de-ucs/resex-do-rio-do-caitario/plano_de_manejo_resex_cautario.pdf. Acesso em: 8 jun. 2023.

JARAMILLO, O. N.; CASTILLO, D.; WOLFF, E. M. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 667-673, 2002.

JESUS, A. C. D. *et al.* Occurrence of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) and their natural infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in Boca do Moa community, Cruzeiro do Sul, Acre, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

JIMÉNEZ, M. L.; PALACIOS, C. Life cycle and reproductive and feeding behavior of *Dipetalogaster maximus* (Uhler)(Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions in Baja California Sur, Mexico. **Southwestern Entomologist**, v. 27, n. 1, p. 65-72, 2002.

JULIÃO, G. R. *et al.* Acute Chagas Disease Caused by *Trypanosoma cruzi* TcIV and Transmitted by *Panstrongylus geniculatus*: Molecular Epidemiological Insights Provided by the First Documented Autochthonous Case in Rondônia, Southwestern Amazonia, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 22, n. 4, p. 244-251, 2022.

JULIÃO, G. R. *et al.* Infestation in palm trees and natural infection by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in periurban and rural areas of state of the Rondônia, in the Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 220, p. 105963, 2021.

JÚNIOR, G. R. *et al.* Potencial de dispersão de algumas espécies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) por aves migratórias. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 6, n. 4, p. 324-328, 2006.

JURBERG, J. *et al.* **Atlas Iconográfico dos triatomíneos do Brasil: vetores da doença de Chagas**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2014. 51 p.

JUSTI, SA.; GALVÃO, C. The evolutionary origin of diversity in Chagas disease vectors. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 1, p. 42-52, 2017.

KIKUCHI, S. A. **A heterogeneidade dos isolados silvestres de *Trypanosoma cruzi* (zimodema III) expressa pelo perfil de suas glicoproteínas de superfície**. 2014. 110 p. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

KOSTYGOV, A. Y. *et al.* Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biology**, v. 11, n. 3, p. 200407, 2021.

LA FUENTE CARBAJAL A. L. C. *et al.* Behavioral plasticity of Triatominae related to habitat selection in northeast Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 45, n. 1, p. 14-19, 2008.

LA FUENTE CARBAJAL, A. L. C. *et al.* The association between the geographic distribution of *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae) with environmental variables recorded by remote sensors. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 1, p. 54-61, 2009.

LEHANE, M. J. **The biology of blood-sucking in insects**. 2 nd. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

LENT H.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. *Rhodnius stali* n. sp. afim de *Rhodnius pictipes* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, n.4, p. 605-614, 1993.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. *et al.* Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of the American museum of Natural History**, v. 163, n. 3, p. 123-520, 1979.

LENT, H.; MARTINS, A.V. Estudos sobre os triatomíneos do Estado de Minas Gerais, com descrição de uma espécie nova. **Revista de Entomologia**, v. 11, p. 877-886, 1940.

LEWIS, M. D. *et al.* Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1305-1317, 2009.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in public health**, v. 7, p. 166, 2019.

LIMA-CORDÓN, R. A. *et al.* Insights from a comprehensive study of *Trypanosoma cruzi*: A new mitochondrial clade restricted to North and Central America and genetic structure of TcI in the region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 12, p. e0010043, 2021.

LIMA, A. F. R. *et al.* Triatomines in dwellings and outbuildings in an endemic area of Chagas disease in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 701-706, 2012.

LIMA, L. *et al.* Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (*discrete typing unit*). **Acta tropica**, v. 151, p. 166-177, 2015.

LIMA, L. *et al.* Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38385, 2012.

LIMA, L. *et al.* Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. **Protist**, v. 163, n. 6, p. 856-872, 2012.

LIMA, M. M.; JURBERG, J.; ALMEIDA, J. R. D. Behavior of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas Disease. III. Influence of the number of matings on the fecundity and fertility of *Panstrongylus megistus* (Burm. 1835) in the Laboratory. 1987.

LÓPEZ-GARCÍA, A.; GILABERT, J. A. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: A systematic review. **Tropical Medicine & International Health**, 2023.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo. Ed. Plantarum, 2004. 432p.

LUKEŠ, J.; SKALICKÝ, T; TÝČ, J. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115-122, 2014.

POVOA, M. M. *et al.* Chagas' disease in the Amazon Basin IV: Host records of *Trypanosoma cruzi* zymodemes in the States of Amazonas and Rondônia, Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 78, n. 5, p. 479-487, 1984.

MACHADO, A. D. C. **Comissão de Aeroportos da Região Amazônica: Força Aérea Brasileira promovendo integração, desenvolvimento, segurança e defesa frente ao Desafio Amazônico**. 2018. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Altos Estudos de Política e Estratégia) - Escola Superior de Guerra da Aeronáutica. Rio de Janeiro, 2018.

MADEIRA, F. P. *et al.* First report of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

MAGALHÃES-SANTOS, Í. F. Transmissão oral da doença de Chagas: breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 2, p. 226-235, 2014.

MARCILI, A. *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. **Parasitology**, v. 136, n. 6, p. 641-655, 2009.

MARIA, S. P. DE O. DO.; NATÁLIA, P DE O.; ELISA, F. M.; *Oenocarpus* Spp. Bacabeiras. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; VIEIRA, I. C. G. (Org.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região norte**. Brasília, Distrito Federal, 2022. p. 1452

MARINKELLE, C. J. Biology of the trypanosomes of bats. **Biology of the Kinetoplastida**, v. 1, p. 175-216, 1976.

- MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F. *et al.* A new record of the introduced species *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 59, n. 6, p. 2150-2157, 2022.
- MARTÍNEZ-IBARRA, J. A. *et al.* Biological and genetic aspects of crosses between species of the genus *Meccus* (Hemiptera: Reduviidae Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 293-300, 2011.
- MARTINS, L. P. A. *et al.* Using captive sentinels to collect wild triatomines in the region of Marília-SP, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, p. 96-104, 2013.
- MATIAS, A. *et al.* Domiciliation process of *Rhodnius stali* (Hemiptera: Reduviidae) in Alto Beni, La Paz, Bolivia. **Tropical Medicine & International Health**, v. 8, n. 3, p. 264-268, 2003.
- MENDES-OLIVEIRA, A. C.; MIRANDA, C. L. Pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia brasileira. **Sociedade Brasileira de Mastozoologia**. Rio de Janeiro, 2015.
- MENEGUETTI, D. U. D. *et al.* First report of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) infection by *Trypanosoma rangeli*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 374-376, 2014.
- MENEGUETTI, D. U. O. *et al.* First report of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in the state of Acre, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 471-473, 2015.
- MENEZES, A. L. R. *et al.* First report of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Bolivia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, 2022.
- MESQUITA, R. D. *et al.* Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 48, p. 14936-14941, 2015.
- MILES, M. A.; SOUZA, A.A.; POVOA, M. Chagas disease in the Amazon Basin. III - Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera, Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 18, p. 266-278, 1981.
- MILES, M. A.; ARIAS, J. R.; SOUZA, A. Chagas' disease in the Amazon basin: V. Periurban palms as habitats of *Rhodnius robustus* and *Rhodnius pictipes*-triatomine vectors of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, p. 391-398, 1983.
- MINOLI, S. A.; LAZZARI, C. R. Take-off activity and orientation of triatomines (Heteroptera: Reduviidae) in relation to the presence of artificial lights. **Acta tropica**, v. 97, n. 3, p. 324-330, 2006.
- MOLYNEUX, D. H. Trypanosomes of bats. **Parasitic protozoa**, v. 1, p. 195-223, 1991.

- MONTEIRO, F. A.; ESCALANTE, A. A.; BEARD, C. B. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 7, p. 344-347, 2001.
- MONTEIRO, F. A. *et al.* Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. **Molecular ecology**, v. 12, n. 4, p. 997-1006, 2003.
- MONTEIRO, F. A. *et al.* Evolution, systematics, and biogeography of the Triatominae, vectors of Chagas disease. **Advances in parasitology**, v. 99, p. 265-344, 2018.
- MONTEIRO, P. S. *et al.* Cadeia trófica e ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* em palmeiras *Orbignya phalerata*. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. Supl II, p. 123, 1999.
- MOREIRA, DAVID.; LÓPEZ-GARCÍA, P.; VICKERMAN, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1861-1875, 2004.
- NOIREAU, F. *et al.* Sylvatic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: trends toward domesticity and possible infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 5, p. 594-598, 1995.
- NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary research**, v. 40, n. 2, 2009.
- NOIREAU, F.; DUJARDIN, J-P. Biology of triatominae. In: **American trypanosomiasis**. Elsevier, 2010. p. 149-168.
- NOIREAU, F. *et al.* Phylogenetic relationships within the oliveirai complex (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Infection, Genetics and Evolution**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2002.
- NÚÑEZ-AVELLANEDA, L. A; ROJAS-ROBLES, R. Biología reproductiva y ecología de La polinización de La palma milpesos *Oenocarpus bataua* en los Andes colombianos. **Caldasia**, v.30, n.1, p. 101-125, 2008.
- OLIVEIRA CORREIA, J. P. S. *et al.* *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky is a junior synonym of *Triatoma williami* Galvão, Souza and Lima. **Insects**, v. 13, n. 7, p. 591, 2022.
- OLIVEIRA, J. *et al.* Atualidades em medicina tropical no Brasil: vetores. 2020
- OLIVEIRA, J. *et al.* Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the Brasiliensis subcomplex. **Acta tropica**, v. 170, p. 140-148, 2017.
- OLIVEIRA, J. D. *et al.* *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): first report in Sergipe State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021

OMS - Organização Mundial de Saúde. Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors. **Geographical distribution of arthropod-borne diseases and their principal vectors.**, v. 89, n. 967, 1989.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Trabalhando para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas. **Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas**, 2010.

ORGHESAN, T. C. **Diversidade e filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros**. 2013. 84 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

OTÁLORA-LUNA, F. *et al.* Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). **Revista chilena de história natural**, v. 88, p. 1-13, 2015.

PÁEZ-COLASANTE, X.; ALDANA, E. Morfometría geométrica del borde corial y del collar de huevos de cinco especies del género *Rhodnius* Stal (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). **EntomoBrasilis**, v. 1, n. 3, p. 57-61, 2008.

PAIVA, V.F.D. *et al.* Confirmation of the first report of *Psammolestes tertius* Lent and Jurberg, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Paraná state, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

PANZERA, F. *et al.* Genomic changes of Chagas disease vector, South America. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 438, 2004.

PATTERSON, J. S.; BARBOSA, S. E.; FELICIANGELI, M. D. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. **Acta tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 187-199, 2009.

PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F.A. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 6, p. 751-758, 2007.

PEIXOTO, S. R. *et al.* *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811)(Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): first record on Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil. **Check List**, v. 16, n. 2, p. 391-394, 2020.

PERETOLCHINA, T. *et al.* Phylogeography and demographic history of the Chagas disease vector *Rhodnius nasutus* (Hemiptera: Reduviidae) in the Brazilian Caatinga biome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006731, 2018.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PESSOA, G. C. D. A. *et al.* Fortalecimento da vigilância em saúde no Brasil: Rede de Monitoramento da resistência dos triatomíneos aos inseticidas. 2016.

PETERSON A.T. *et al.* Ecological niches and geographic distributions. **Princeton: Princeton University Press**, v. 1, n. 1, p. 82-94, 2011.

PHILIPS, Guia. Amazônia, Brasil. **São Paulo: Horizonte Geográfico**, 2001.

PICCINALI, R. V. *et al.* Genetic variability, phylogenetic relationships and gene flow in *Triatoma infestans* dark morphs from the Argentinean Chaco. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 895-903, 2011.

PIFANO, F. Anotaciones acerca del *Psammolestes arthuri* (Pinto, 1926)(Hemiptera, Heteroptera, Triatomidae) reduviedo hematofago encontrado en nidos de" cucarachero de monte (probablemente, Dendrocolaptidae) en un sector de los valles de Yaracuy. **Gaceta Médica de Caracas**, v. 45, p. 241-5, 1938.

PINTO, A. Y. D. N. *et al.* Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 25, n. 1, p. 77-83, 2009.

PINTO DIAS, J. C. Human chagas disease and migration in the context of globalization: some particular aspects. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2013, p. 241-5, 2013.

PINTO, C.; LENT, H. Sobre as espécies do gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911 (Hemiptera, Triatomidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 7, n. 4, p. 333-7, 1935.

PIRES, H. H. R. *et al.* Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intraspecific responses. **Acta Tropica**, v. 81, n. 1, p. 47-52, 2002.

PISCON, B. *et al.* The Effect of Outer Space and Other Environmental Cues on Bacterial Conjugation. **Microbiology Spectrum**, v.1, p. e03688-22, 2023.

POINAR, J. R. G. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n.(Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a triatomine-trypanosomatid vector association. **Vector-Borne & Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 1, p. 72-81, 2005

RAMÍREZ, J. D. *et al.* First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. **Zoonoses and public health**, v. 61, n. 7, p. 477-479, 2014.

RAVAZI, A. *et al.* Trends in evolution of the Rhodniini tribe (Hemiptera, Triatominae): experimental crosses between *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 and *P. coreodes* Bergroth, 1911 and analysis of the reproductive isolating mechanisms. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2021.

RAVAZI, A.; OLIVEIRA, J.; ALEVI, K. C. C. Taxonomia e sistemática da tribo Rhodniini (Hemiptera, Triatominae): uma mini-revisão. **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil. Vetores**, v. 1, p. 38-48, 2020.

RECINE, E.; RADAELLI, P. Alimentação e cultura. Departamento de Nutrição, Universidade de Brasília. 2015. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/alimentacao_cultura.pdf. Acesso em 08 jun 2023.

RIANO, H. C.; JARAMILLO, N.; D, J. P. Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 2, p. 162-168, 2009.

RIBEIRO, C. S.; CORÇÃO, M. O consumo da carne no brasil: entre valores sócios culturais e nutricionais. **Demetra: alimentação, nutrição & saúde**, v. 8, n. 3, p. 425-438, 2013.

ROJAS, C. M. G.; GONÇALVES, T. C. M. Resistance to starvation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) under laboratory conditions (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 549-554, 1998.

ROSA, J. A. et al. Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. **Zootaxa**, v. 3478, n. 1, p. 62–76, 2012.

RUEDA, K.; TRUJILLO, J. E.; CARRANZA, J. C. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for chagas disease in Colombia and other South American countries. **Biomedica**, v. 34, n. 4, p. 631-641, 2014.

SALYERS, A. A; SHOEMAKER, N. B. Conjugative transposons. **Genetic Engineering: Principles and Methods**, v. 1, p. 89-100, 1997.

SAMPAIO, D. T. **A caça ilegal de animais silvestres na Mata Atlântica, Baixada Litorânea do estado do Rio de Janeiro, Brasil: eficiência de proteção de reservas biológicas e triangulação do perfil da caça**. 2011. 193 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2011.

SAMPAIO, A. B. *et al.* **Guia técnico de prevenção de invasão biológica associada a atividades de empreendimentos licenciáveis em unidades de conservação federais** [livro eletrônico]. 1. ed. Brasília, Distrito Federal, 2022.

SAMPAIO, A. B. **Guia Técnico de Prevenção de Invasão Biológica Associada a Atividades de Empreendimentos Licenciáveis em Unidades de Conservação Federais**. 2022.

SANCHEZ, D. R. *et al.* Chagas disease awareness among Latin American immigrants living in Los Angeles, California. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 5, p. 915, 2014.

SANDOVAL, C. *et al.* Feeding sources and natural infection of *Belminus herreri* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from dwellings in Cesar, Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 137-140, 2004.

SANDOVAL, C. M. *et al.* Cleptohaematophagy of the Triatomine bug *Belminus herreri*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 14, n. 1, p. 100-101, 2000.

SANDOVAL, C. M. *et al.* Feeding behaviour of *Belminus ferroae* (Hemiptera: Reduviidae), a predaceous Triatominae colonizing rural houses in Norte de Santander, Colômbia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 24, n. 2, p. 124-131, 2010.

SANGENIS, L. H. C. *et al.* Transmissão da doença de Chagas por consumo de carne de caça: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, p. 803-811, 2016.

SANMARTINO, M.; CROCCO, L. Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 7, n. 3, p. 173-178, 2000.

SANT'ANNA, M. R. V.; DIOTAIUTI, L.; FIGUEIREDO GONTIJO, A. Feeding behaviour of morphologically similar *Rhodnius* species: influence of mechanical characteristics and salivary function. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 12, p. 1459-1465, 2001.

SANTOS-MALLET, J. R. D. *et al.* Morphobiological aspects of *Rhodnius brethesi* Matta, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) from the Upper and Middle Negro River, Amazon region of Brazil: I-scanning electron microscopy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 915-923, 2005.

SANTOS, C. M. D. *et al.* Estudo morfológico do gênero *Panstrongylus* Berg, 1879 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 939-944, 2003.

SCHAUB, G. A. Interactions of trypanosomatids and triatomines. **Advances in insect physiology**, v. 37, p. 177-242, 2009.

SCHAUB, G. A. Pathogenicity of trypanosomatids on insects. **Parasitology Today**, v. 10, n. 12, p. 463-468, 1994.

SCHMID-HEMPEL, R.; TOGNAZZO, M. Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 337-345, 2010.

SCHMIDT, J. O.; DORN, P. L.; KLOTZ, S. A. Second-best is better than nothing: Cockroaches as a viable food source for the kissing bug *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae). **Journal of medical entomology**, v. 56, n. 3, p. 651-655, 2019.

SCHOFIELD, C. J. Chagas disease, triatomine bugs, and blood-loss. **Lancet**, v. 317 p. 1316, 1981.

SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.

SCHOFIELD, C. J. Biosystematics of the Triatominae. Biosystematic of Haematophagous Insects, 37. **MW Service Systematics Assoc Special Oxford Clarendon Press**, v.1, n. 1, p. 2843121988, 1988.

- SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J-P. Theories on the evolution of *Rhodnius*. **Actualidades Biológicas**, v. 21, n. 71, p. 183-197, 1999.
- SCHOFIELD, C. J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. **Acta tropica**, v. 110, n. 2-3, p. 88-100, 2009.
- SCHOFIELD, C. J. Elimination of *Rhodnius prolixus* in central America. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 1-10, 2012.
- SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J. P. Chagas disease vector control in Central America. **Parasitology Today**, v. 13, n. 4, p. 141-144, 1999.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. Emerging and reemerging forms of *Trypanosoma cruzi* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210033, 2022.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.
- SILVA ALVES, E.; DOS SANTOS PINTO, A.; CAETANO, R. F. Memórias de Mulheres Seringueiras na Reserva Extrativista Rio Ouro Preto/RO: Linguagem, Cultura e Identidade. **Amazônica-Revista de Antropologia**, v. 10, n. 2, p. 738-761, 2018.
- SILVA, A. N. B. *et al.* First report of *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Rio Grande do Norte state, Brazil. **Check List**, v. 14, n. 6, p. 1109-1113, 2018.
- SIMPSON, A. G. B.; ROGER, A. J. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 30, n. 1, p. 201-212, 2004.
- SOLANO, C. *et al.* Avaliação em laboratório da atividade de voo de *Rhodnius brethesi* Matta, 1919, potencial vetor silvestre do *Trypanosoma cruzi* na Amazônia Brasileira (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 1, p. 6-6, 2011.
- SOUZA, W.; BARRIAS, E. S. May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective?. **Acta tropica**, v. 212, p. 105688, 2020.
- SOUSA, O. M. F. D. *et al.* Triatomíneos da Bahia: manual de identificação e orientações para o serviço. **Salvador: Oxente**, v. 1, p. 208, 2020.
- SOUTO, R. P. *et al.* DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 83, n. 2, p. 141-152, 1996.
- SOUZA, R. D. C. M. D. *et al.* Chagas disease in the context of the 2030 agenda: Global warming and vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e200479, 2022.
- STEINDEL, M. *et al.* Colonização de ecótopos artificiais pelo *Panstrongylus megistus* na ilha de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 43-50, 1994.

STEVENS, J. R. *et al.* The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Elsevier**. v.1, n.1, p.1, 2001.

STEVENS, J. R. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite**, v. 15, n. 3, p. 226-232, 2008.

STEVEDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2014.

TANADA, Y.; KAYA, H. K. **Protozoan infections: Zoomastigina, rhizopoda, and ciliophoran**. In: TANADA, Y.; KAYA, H. K. Insect Pathology, 1. ed. California: Academic Press, Inc. 1993. Cap. 11, p. 388-407.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 405-410, 2002.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 85-104, 1998.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Microevolution and subspecific taxonomy of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 103, p. 105344, 2022.

TINEO-GONZÁLEZ, E. *et al.* Geographic Distribution of the Genus *Panstrongylus* Berg, 1879 in the Neotropic with Emphasis on *Trypanosoma cruzi* Vectors. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 5, p. 272, 2023.

TRUMPER, E. V; GORLA, D. E. Density-dependent timing of defaecation by *Triatoma infestans*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 800-802, 1991.

UCS - Unidade de Conservação no Brasil. Reserva Extrativista do Rio Ouro Preto. 2006. Disponível em: <https://uc.socioambiental.org/pt-br/arp/628>. acesso em: 08 jun. 2023

VALENTE, V. C. *et al.* Chagas disease in the Amazon Basin: association of *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) with domestic pigs. **Journal of Medical Entomology**, v. 35, n. 2, p. 99-103, 1998.

VALLEJO, G. A. *et al.* Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. **Revista brasileira de biologia**, p. 577-87, 1988.

VARGAS, P. A. O. **Genes de cisteíno-proteases de *Trypanosoma* spp. de mamíferos: polimorfismo e relações filogenéticas**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VERGARA-MEZA, J. G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in Acre, Brazilian Amazonia: Coinfection and Notable Genetic Diversity in an Outbreak of Orally

Acquired Acute Chagas Disease in a Forest Community, Wild Reservoirs, and Vectors. **Parasitologia**, v. 2, n. 4, p. 350-365, 2022.

VERLY, T. *et al.* Vector competence and feeding-excretion behavior of *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843)(Hemiptera: Reduviidae) infected with *Trypanosoma cruzi* TcVI. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, p. e0008712, 2020.

VILLACÍS, A. G. *et al.* Pioneer study of population genetics of *Rhodnius ecuadoriensis* (Hemiptera: Reduviidae) from the central coast and southern Andean regions of Ecuador. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 116-127, 2017.

VILLACÍS, A. G.; ARCOS-TERÁN, L.; GRIJALVA, M. J. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958)(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 690-695, 2008.

VILLACHICA, H. *et al.* Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Tratado de Cooperación Amazonica, Secretaría Pro-Tempore, v.1, p. 367, 1996.

VITTA, A. C. R.; FIGUEIRAS, A.N.L.; LAZZARI. Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 865-867, 2002.

WHO - World Health Organization. **Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021-2030**. Geneva: World Health Organization; 2020. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/resources/who-ucn-ntd-2020.01/en/.

WHO - World Health Organization. Brazil to be declared free of Chagas disease. **TDR News** 2000a, v. 62, p. 14, 2000.

WIGGLESWORTH, V. B. Memoirs: The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). II. Factors controlling moulting and 'metamorphosis'. **Journal of Cell Science**, v. 2, n. 306, p. 191-222, 1934.

YEO, M. *et al.* Origins of Chagas disease: *Didelphis species* are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 2, p. 225-233, 2005.

YURCHENKO, V.Y. *et al.* Morphological discordance of the new trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. **Protist**, v. 159, n. 1, p. 99-114, 2008.

ZAPPAROLI, D. *et al.* Commercially acquired açaí pulps contamination by *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 363, p. 109508, 2022.

ZELEDÓN, R. **El Triatoma Dimidiata y su Relación con la Enfermedad de Chagas**. 1 Ed. San José, California, EUA: Editorial Universidad Estatal a Distancia, 1987.

ZHAO, Y; GALVÃO, C; CAI, W. *Rhodnius micki*, a new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. **ZooKeys**, v. 1012, p. 71, 2021.

ZHAO, Y. *et al.* Review of Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from China with Descriptions of Two New Species. **Insects**, v. 14, n. 5, p. 450, 2023.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; BARTHOLOMEU, D. C. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e210193, 2022.

ZINGALES, B. *et al.* A The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, genetics and evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B. *et al.* Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 159-164, 1999.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta tropica**, v. 184, p. 38-52, 2018.

CAPÍTULO 2 - ARTIGOS PUBLICADO E ACEITO

Artigo 1 - First report of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Bolivia

André Luiz Rodrigues Menezes [1],[2], Ricardo Angelo Schneider [3], Mariane Albuquerque Lima Ribeiro [2], [4], Cícera Alexsandra Costa dos Santos [1], Elaine Oliveira Costa de Carvalho [1], Gabriel Cestari Vilardi [5], Jader de Oliveira [6], João Aristeu da Rosa [2],[7]

[1] Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Rondônia- IFRO, campus Guajará-Mirim, Brasil.

[2] Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara/SP, Brasil.

[3] Universidad Autónoma del Beni “José Ballivián” - UAB, Guayaramerín, Beni, Bolívia.

[4] Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR, Departamento Acadêmico de Ciências Sociais e Ambientais (DACSA), Campus de Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil.

[5] Centro de Ciências da Saúde e do Desporto, Universidade Federal do Acre, UFAC, Rio Branco, AC, Brasil.

[6] Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo USP, São Paulo, SP, Brasil.

[7] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Ciências Biológicas, Araraquara, SP, Brasil.

***Corresponding author:** Dr. Jader de Oliveira **E-mail:** jdr.oliveira@hotmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2588-1911>

Abstract

Introduction: The subfamily Triatominae, which comprises 157 species, can carry the protozoan *Trypanosoma cruzi*, an etiological agent of Chagas disease. This short communication reports for the first time the occurrence of *Rhodnius montenegrensis* in Bolivia.

Methods: Active searches were carried out in palm trees of the genus *Oenocarpus*, from the Beni district, Bolivia. **Results and Conclusions:** Fifteen specimens of *R. montenegrensis* were collected in a rural area of the Beni district, Bolivia, showed positivity for *T. cruzi*. This new report expands the geographic distribution of the species in Latin America and for having the ability to transmit trypanosomatids, the species deserves attention of vector control programs.

Keywords: Entomological surveillance; Western Amazon; kissing bugs, new records.

The subfamily Triatominae is currently composed of 157 species, with 18 genera¹⁻³. In Bolivia, there are 20 species of triatomines: *Eratyrus mucronatus* Stål, 1859; *Microtriatoma trinidadensis* (Lent, 1951); *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811); *Panstrongylus guentheri* Berg, 1879; *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835); *Panstrongylus noireaudi* Gil-Santana *et al.*, 2022; *Panstrongylus rufotuberculatus* (Champion, 1899); *Psammolestes coreodes* Bergroth, 1911; *Psammolestes diasi* (Pinto & Lent, 1946); *Rhodnius micki* Zhao *et*

al., 2021; *Rhodnius prolixus* Stål, 1859; *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927; *Rhodnius stali* Lent et al. 1993; *Triatoma boliviana* Martínez et al., 2007; *Triatoma delpontei* Romaña; Abalos, 1947; *Triatoma garciabesi* Carcavallo et al., 1967; *Triatoma guasayana* Wygodzinsky; Abalos, 1949; *Triatoma infestans* (Klug, 1834); *Triatoma sordida* Stal, 1859 and *Triatoma venosa* Stål, 1872^{4,6}.

Rhodnius Stål, 1859, species are from wild areas and consequently maintain the enzootic cycle, having as main ecotopes the palm trees of the genus *Attalea*. However, there are reports of their presence in homes (intradomiciliary and peridomiciliary), which poses the epidemiological risk of transmission of Chagas disease, since they contain significant percentages for natural infection by *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae)⁷⁻⁸.

The species *Rhodnius montenegrensis* was registered only in Brazil, occurring in the following states: Acre⁹, Amazonas¹⁰, Rondônia¹¹ and Roraima¹² and this distribution has been expanded with the present study, which aims to describe the first report of occurrences of the species *R. montenegrensis* in Bolivia. Between 2019 and 2020, 15 specimens of *R. montenegrensis* were collected in the rural area of the municipality of Guayaramerin, Beni, Bolivia (Figure 1).

Guajará-Mirim, in Brazil, borders *Guayaramerin*, located in Bolivia, they are considered twin cities that are separated by the Mamoré River¹³. The first record of the species *R. montenegrensis*, in 2012, was carried out in the municipality of Monte Negro¹¹, Rondônia, a city close to Guajará-Mirim, thus we may justify the presence of this specimen in Bolivia due to the surroundings of these municipalities.

The specimens were collected by means of active search in palm (genus *Oenocarpus*) trees distributed in areas of secondary forests and pasture. Using tweezers and machetes to assist in thinning, the bracts were removed (as they can lodge a large number of invertebrates and small vertebrates), and the triatomines were collected one at a time so as not to damage them. With the capture of 15 triatomines – nine adults, three fourth-instar nymphs and three fifth-instar nymphs of the fifth instar of *R. montenegrensis*.

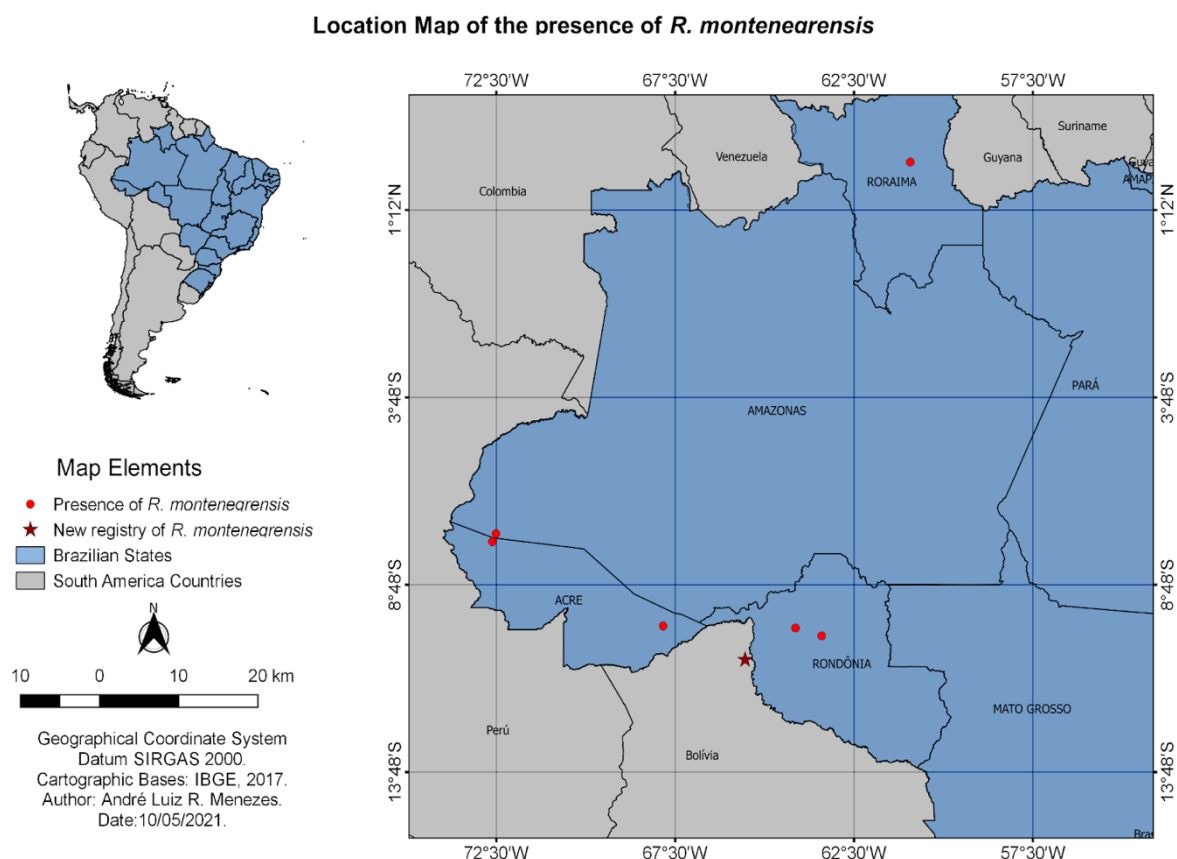


Figure 1. Location of *R. montenegrensis* collection in Bolivia in 2019.

For identification we used the description by Rosa et al.¹¹. The 15 triatomines were analyzed in the Parasitology laboratory of the Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, for infection analysis and identification. The specimens were added to the Triatominae collection (figure 2), "Dr. José Maria Soares Barata" (CTJMSB) at UNESP, Araraquara. Infection of triatomines was performed by molecular analysis (Polymerase Chain Reaction - conventional PCR), with the aim of detecting and confirming the presence of *T. cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease.

To identify *T. cruzi*, we first extracted the DNA, using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, using as a sample the digestive tract of each collected triatomine that was in absolute alcohol and stored at -20°C. For PCR, we followed the kDNA-PCR protocol, described by Márquez et al. (2016). The gel, after being revealed, showed that of the 15 samples tested, 6 were positive for *T. cruzi* (Figure 3).

Rhodnius montenegrensis and *R. robustus* are species that present some morphological similarity, but morphological¹⁴, morphometric¹⁴, transcriptomic¹⁴ and cytogenetic¹⁵ studies allowed to differentiate the species and confirm the specific status of *R. montenegrensis*. For this reason, there may possibly be an erroneous description of the distribution of *R. montenegrensis* both in Brazil and in other Latin American countries (with emphasis on Brazilian border countries).

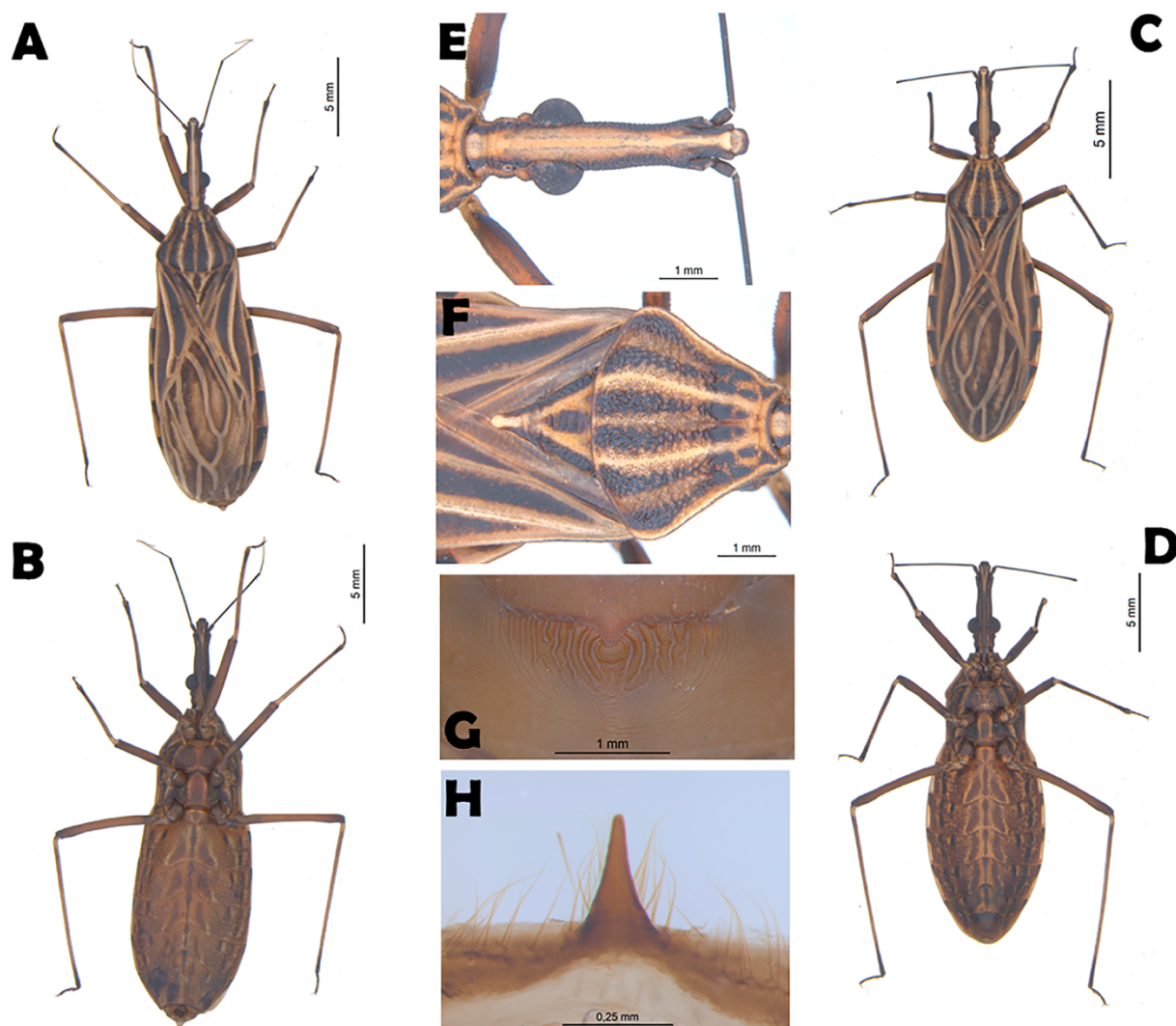


Figure 2. *Rhodnius montenegrensis* specimen captured in a palm tree in the municipality of Guayaramerin, Beni, Bolivia. Legends: *R. montenegrensis*. A- Female: dorsal side; B- Female: ventral side; C- Male: dorsal side; D- Male: ventral side; E- Head; F- Pronotum and scutellum; G- Process of the I urotergite; H- Male external genitalia – median process of the pygophore.

Specimens of *R. montenegrensis* collected from palm trees and residences reveal their ability to adapt to the human environment, dispersal and mobility¹⁶. Studies carried out in Acre, Amazonas and Rondônia demonstrate the predominance of the occurrence of this species in its natural ecotope, and the intrusion into residence and the infection rate for *T. cruzi* in this species

is significant in the localities where they were captured^{9-11,16}. Another aspect described in the studies is the non-occurrence of domiciliation of the species *R. montenegrensis*^{10,16}.

With the expansion of this species in Brazilian states and in a neighboring country, such as Bolivia, it is pertinent to affirm the epidemiological importance of including this species in the transmission cycle of Chagas disease in the Brazilian and international Amazon.

Rhodnius montenegrensis has also been reported in domestic environments, but only in the countryside¹⁷. In addition to that, it has been found naturally infected by *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 a fact of major importance because the difficulty in isolation and diagnosis may be related to a double trypanosomatid infection, which can lead to false positive or true positive results for Chagas disease^{17,18}. This new report of the occurrence of *R. montenegrensis* expands the geographic distribution of the species in Latin America, with Bolivia being the second country to register the presence of the insect and increases the number of species described for the locality.

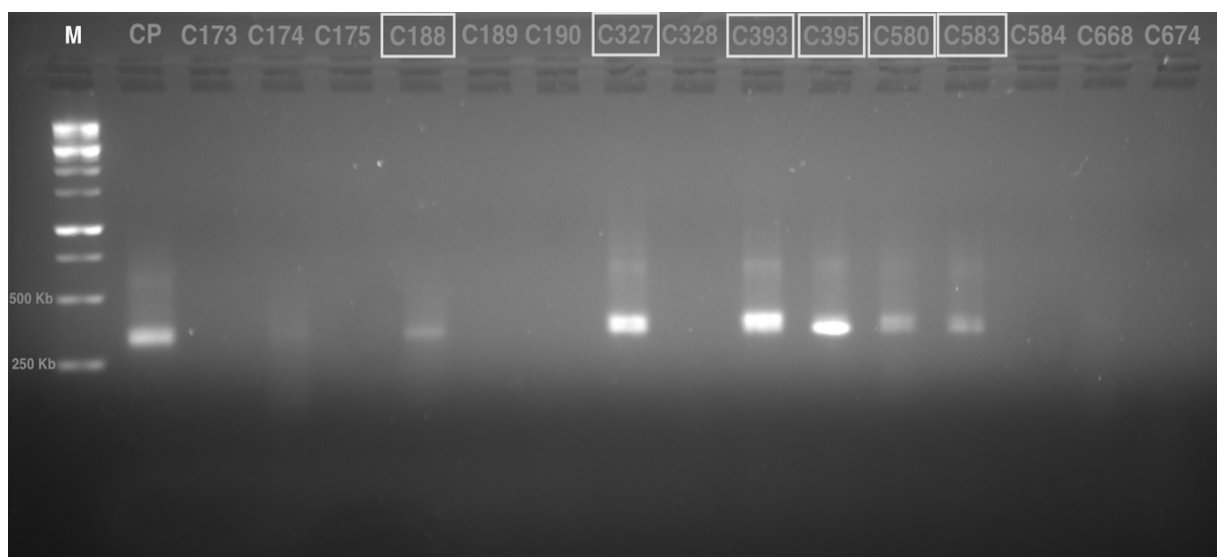


Figure 3. Caption: M – Marker (Ladder 1kb), CP - Positive control (Y strain), Samples - C188, C327, C393, C580, C583 are positive for *T. cruzi*, we use forward primers 121: 5' · AAATAATG TACGGGKGAGATGCATGA · 3' and reverse 122: 5' · GGTTCGATT GGGGTTGGTGTAATATA · 3'.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

Artigo 2 – First report of *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vector of *Trypanosoma cruzi* (TcI) and *Trypanosoma rangeli* (TrA), in Rondônia, southwestern Brazilian Amazonia

André Luiz Rodrigues Menezes ^[1,2], Mariane Albuquerque Lima Ribeiro ^[2,3], Lucas Nascimento da Cruz ^[1], Elaine Oliveira Costa de Carvalho ^[1], Jader de Oliveira ^{[4]*}, Marta Maria Geraldine Teixeira ^[5], João Aristeu da Rosa ^[2,6]

^[1] Federal Institute of Education, Science and Technology of Rondônia, Guajará-Mirim, Rondônia, Brazil.

^[2] Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, Brazil.

^[3] Centro de Ciências da Saúde e do Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brazil.

^[4] Public Health Entomology Laboratory, Department of Epidemiology, School of Public Health, São Paulo University, São Paulo, São Paulo, Brazil.

^[5] Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

^[6] Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:** Dr. Jader de Oliveira. Public Health Entomology Laboratory, Department of Epidemiology, School of Public Health, São Paulo University, São Paulo, São Paulo, Brazil. **E-mail:** jdr.oliveira@hotmail.com

Abstract: Triatomines are hematophagous insects of epidemiological importance as they are vectors of Chagas disease. The first report of *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 in Rondônia, Brazil, is described. The insects were captured on palm trees of the genus *Oenocarpus* sp. Two adult male specimens of *R. stali* were identified and were found to be infected with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. The confirmation of this *Rhodnius* species in Rondônia increases the number of triatomines from nine to ten species in this state.

Keywords: Entomological surveillance, kissing bugs, new records, Western Amazon.

In the Amazon region, currently eleven species of the genus *Rhodnius* are known, a genus that is distributed from Central to South America (Hernández *et al.*, 2020). *Rhodnius* comprises twenty-one species (Zhao; Galvão; Cai, 2021), of which ten are found in Northern Brazil (Souza *et al.*, 2016). *Rhodnius* exhibits its species diversity strictly associated with palm trees in both the wild and peridomestic cycles. (Abad-Franch *et al.*, 2015). This association is important in terms of public health because the insects that live in these palm trees can invade nearby homes, overall attracted by light (Fitzpatrick *et al.*, 2008). The migration of these vectors from palm trees to houses can undermine vector control programs, as it can lead to

reinfestation of homes treated with insecticides (Sanchez-Martin *et al.*, 2006), and represent a risk of emerging *T. cruzi* transmission in peridomestic and domestic environment in Amazonia (Depickère *et al.* 2023; Medina *et al.* 2022).

Transmission of human trypanosomiasis in the Amazon region has been increasing, possibly due to the contact of humans with the rich fauna of vectors and animal reservoirs, with growing human population and migratory movements of people causing deforestation and invading the natural habitat of these insects. Transmission of Chagas disease in Brazilian Amazon region relied mostly on *Rhodnius* species and has spreading due to limited vector surveillance campaigns, and public health education (Dias *et al.*, 2002; Luitgards-Mourta *et al.*, 2005; Aguilar *et al.*, 2007; Coura; Junqueira, 2012; Vergara-Mesa *et al.*, 2022).

In the Amazon context Chagas disease is an emerging disease, most confirmed outbreaks of acute disease through epidemiological investigations indicate non-vectorial transmission involving palm fruit juices (Coura *et al.*, 2002; Barbosa *et al.*, 2015; Vergara-Mesa *et al.*, 2022). From 2001 to 2018, acute cases of Chagas disease were concentrated in the North region, representing more than 50% in relation to the other regions (South, Southeast, Central-West and Northeast) and were predominantly oral (Santos *et al.*, 2020). According to a systematic review and meta-analysis, oral Chagas disease has been increasing in the last two decades, but lethality has reduced by improvement on diagnosis and treatment, and all cases were from Latin America, particularly Brazil, and caused mostly by the ingestion of acai fruit (Bruneto *et al.*, 2021).

Palms are considered an important ecotope for triatomines, providing ideal conditions for their development (Massaro, Rezende, & Camargo, 2008; Galvão, 2014; Abad-Franch *et al.*, 2015), particularly for species of the genus *Rhodnius*. Palm-vector association enhances the occurrence of domiciliary and peridomiciliary invasion in the Brazilian Amazon region (Coura & Junqueira, 2012; Abad-Franch *et al.*, 2015), this makes the genus *Rhodnius* the most important for the region due to its abundance in peridomestic palms and its close association in the Amazon region, as well as its involvement in reported outbreaks of oral transmission, during which they are found invading homes and spaces. Therefore, this study aims to describe the first report of the occurrence of *Rhodnius stali* in the state of Rondônia, Brazil, and the identification of trypanosomes they can harbor and transmit.

The collections were conducted in 2020 within the Rio Cautário Extractive Reserve, located in the municipality of Guajará-Mirim, Rondônia, bordering the city of Costa Marques in Rondônia and the country of Bolivia (Figure 1). Triatomine bugs were captured through active search methods on palm trees of the *Oenocarpus* sp. genus. Nine palm trees were

sampled, and two tested positive for *Rhodnius stali*. It is worth noting that the insects were found in the canopy of the palms, in areas with accumulations of materials and bracts. Collection tools included cutting equipment and tweezers. The bracts were individually removed, and a meticulous analysis of the material present between them was conducted.

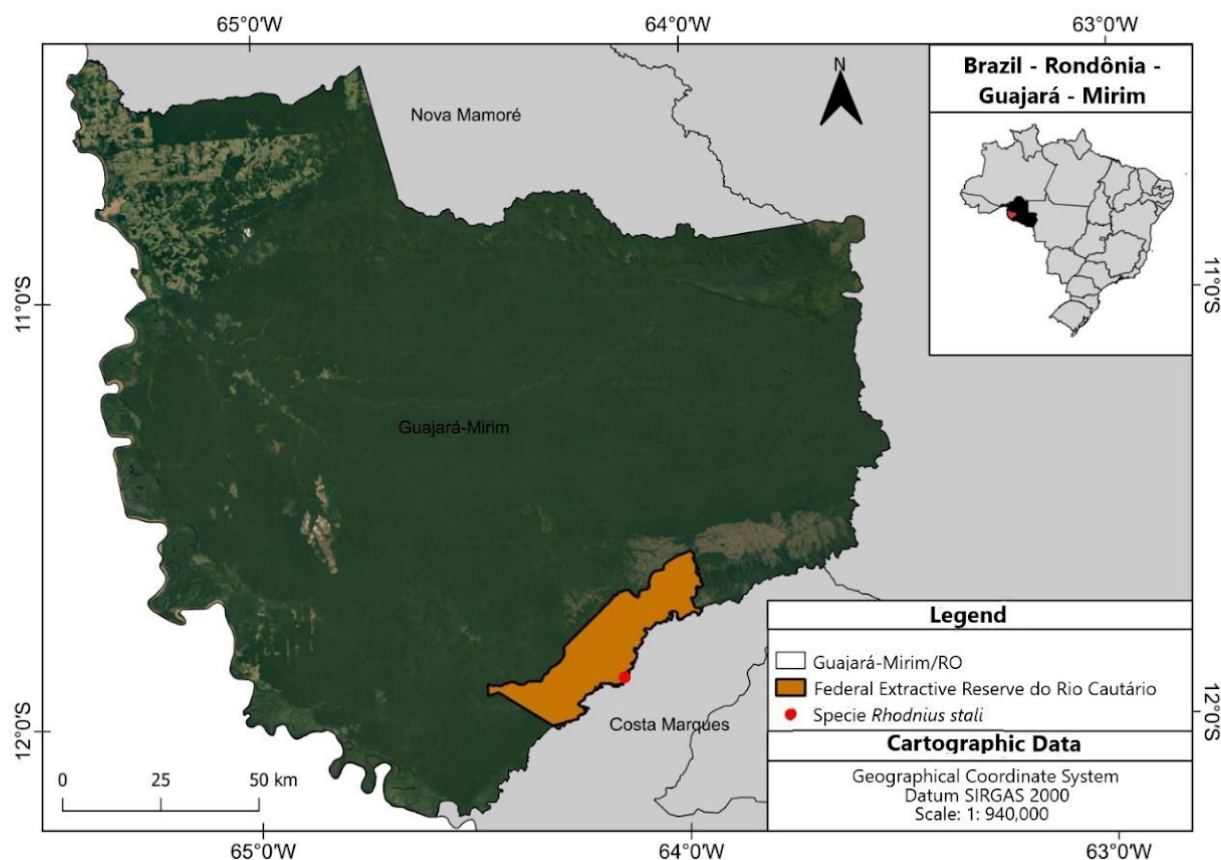


Figure 1. Location of *Rhodnius stali* collection in the Rio Cautário Extractive Reserve, municipality of Guajará-Mirim, Rondônia, Brazil.

After collection, the insects were taken to the laboratory of the Federal Institute of Rondônia (IFRO) campus in Guajará-Mirim, where they were sorted and sent to the Parasitology Laboratory of the Faculty of Pharmaceutical Sciences - Unesp/Araraquara for specific confirmation through male genitalia examination. The diaphanization and examination of the morphological structures of the collected specimens were performed as described by Lent et al (1993) and Zhao, Galvão, Cai (2021).

For the analysis of the presence of trypanosomes, initially, optical microscopy (40x objective) was used to examine aliquots of feces diluted in saline solution (0.9%). In case of a positive or negative result for trypanosomatids, total DNA extraction was performed. For this purpose, a conventional protocol described by Adams et al. (2008) was used, and for digestion

of the feces/digestive tract, Digsol solution (50 mM Tris, 20 mM EDTA, 117 mM NaCl, and 1% SDS) was used, along with proteinase K at 37 °C overnight. The solution was then precipitated with an ammonium acetate-based solution, centrifuged, and washed with 99.8% and 70% ethanol, respectively. After drying, the DNA was resuspended in 40 µl of TE buffer (Tris-EDTA) and stored at -20 °C (Garcia *et al.*, 2018). After extraction, DNA concentration and quality were evaluated using the NanoDrop™ equipment (Thermo Scientific™ spectrophotometers).

For the identification of trypanosome species, the Fluorescent Fragment Length Barcoding (FFLB) method was used, which presents high sensitivity and precision in distinguishing species/genotypes of trypanosomes simultaneously (as in mixed infection) (Vergara-Meza *et al.*, 2022).

The DNA samples from triatomines was subjected to four PCR reactions with specific fluorescent primers, and the four PCR products analyzed in an ABI 3500 sequencer, and fluorescent peaks assessed using the GeneMapper Software v.4.0 (Applied Biosystems). Each trypanosome species/genotype has a unique a profile of four peaks of variable length, allowing for the identification of trypanosomes without the need of sequencing, as it is unlikely to find the same FFLB profile for different species (Hamilton *et al.*, 2008; Hamilton *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2018). The method of FFLB was developed for trypanosome surveys in tsetse flies, and recently adapted with success for identification and genotyping of both *T. cruzi* and *T. rangeli* directly in samples from digestive tract of triatomines (Hamilton *et al.*, 2008, 2011; Garcia *et al.*, 2018; Valença-Barbosa *et al.*, 2021; Vergara-Mesa *et al.*, 2022).

Two specimens of triatomine bugs were collected, identified as two adult males of *Rhodnius stali* (Figure 2). *Rhodnius stali* specimens have a yellowish-brown, dotted coloration, usually with small spots, measuring around 16.5 to 17mm. They have an elongated head with an anteocular region. The pronotum is brown, covered with irregularly shaped black spots. The legs, coxae, trochanter, and femurs are yellowish and speckled with black as described in the diagnosis proposed by Lent *et al.* (1993). The identification of trypanosomes using FFLB revealed the presence of *Trypanosoma cruzi* of discrete typing units (DTU) TcI and *Trypanosoma rangeli* of lineage A (TrA) (Figure 3).

New records. BRAZIL – Rondônia • Guajará-Mirim / Rio Cautário Extractive Reserve; Latitude: -11.897069, Longitude: -64.150294; 2020; leg. Menezes, ALR; CEJSMB, 2 ♂ (Figure 2).

Rhodnius stali, according to Abad-Franch and Gurgel-Gonçalves (2021), inhabits the moist forests of southwestern Amazon and transitional ecoregions (mountainous Yungas,

Chiquitano dry forests, and Beni-Cerrado-Pantanal savannas) (Abad-Franch, Gurgel-Gonçalves 2021), but in a community in Bolivia that suffered deforestation and construction of residences roofed by palm leaves, a process of domiciliation occurred (Matias *et al.*, 2003), with this species representing the main vectors of Chagas disease in region of Bolivia (Cortez, 2007). Another study revealed *R. stali* in peridomicile areas and in palm trees (*Attalea phalerata*) in the Alto Beni region, Bolivia, being the likely vector responsible for the Chagas disease seropositivity in an indigenous population (Justi *et al.*, 2010).

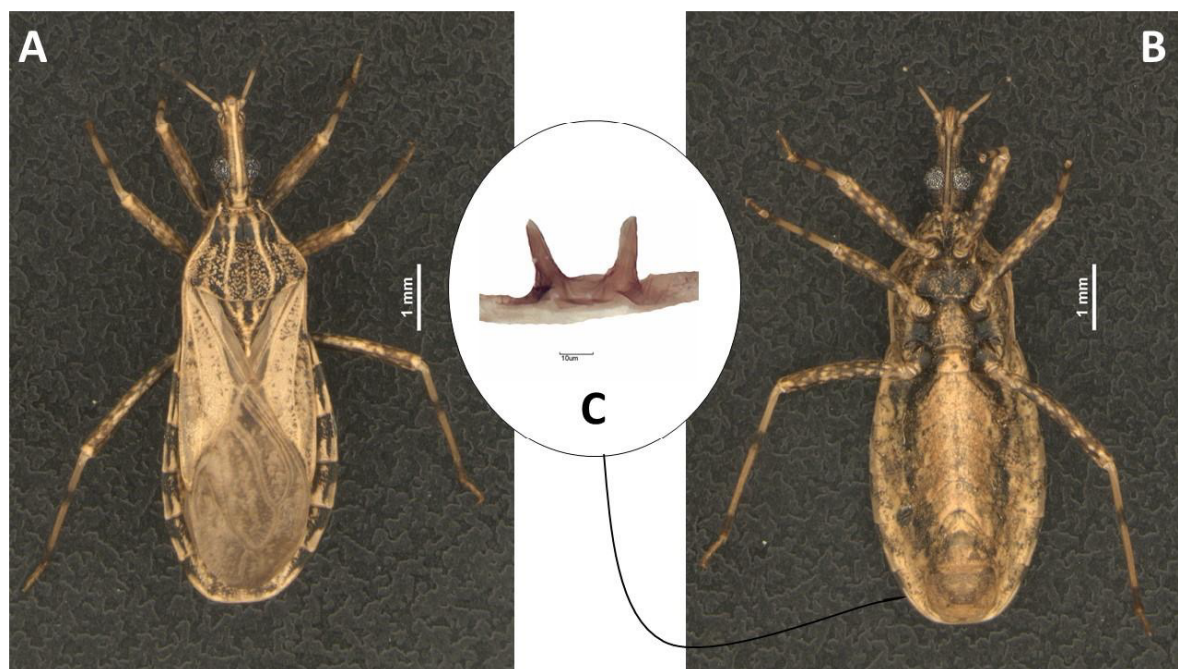


Figure 2. Male *Rhodnius stali* collected in Guajará-Mirim in 2020, Rondônia, Brazil. A) Dorsal view. B) Ventral view. C) Median process of the pygophore.

In 1993, the first record of *R. stali* species was reported, but it was only in 2009 that molecular studies confirmed the presence of *T. cruzi* (TcI) and *T. rangeli* (non-genotyped) in Mato Grosso do Sul, Brazil (Silva *et al.*, 2009; Lent; Jurberg; Galvão, 1993). In Brazilian Amazonia, first report of *R. stali* occurred in Acre, in 2015 (Meneguetti *et al.*, 2016), and *T. rangeli* was identified in this species (Castro *et al.*, 2017). In a community in the Juruá Valley, Acre, *R. stali* infected by *T. cruzi* was found in palm trees through passive search (Jesus *et al.*, 2021). These studies highlighted the importance of describing the occurrence of *R. stali* and its potential role as vector for Chagas disease in Brazil. In addition, our findings exposed the possibility of trypanosome misidentification in vectors since mixed infections of *T. cruzi* with *T. rangeli* can occur in *R. stali*.

The sites where *R. stali* was found includes coati burrows in the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil (Santos *et al.*, 2019). In Rio Branco, capital city of Acre, this species was captured using a light trap and by passive search surroundings *Attalea* palm trees (Meneguetti *et al.*, 2016). In a region 648 km from the capital of Acre, an *R. stali* adult was collected in an *Attalea butyracea* palm (Jesus *et al.*, 2021). In Bolivia, *R. stali* was found in *Attalea phalerata* located near infested residences, and also inside human houses and peridomiciliary environment (in a chicken coop), thus indicating a domiciliation process (Matias *et al.*, 2003; Justi *et al.*, 2010). In 2022, an extensive collection was carried out in 6 cities in Bolivia, and *R. stali* was captured in two palm trees, *Copernicia alba* and *Attalea phaetara* (Depickère *et al.*, 2022). Therefore, natural ecotopes of *R. stali* are possibly palm trees of different genera such as *Attalea*, *Copernicia* and, after this study, *Oenocarpus* sp.

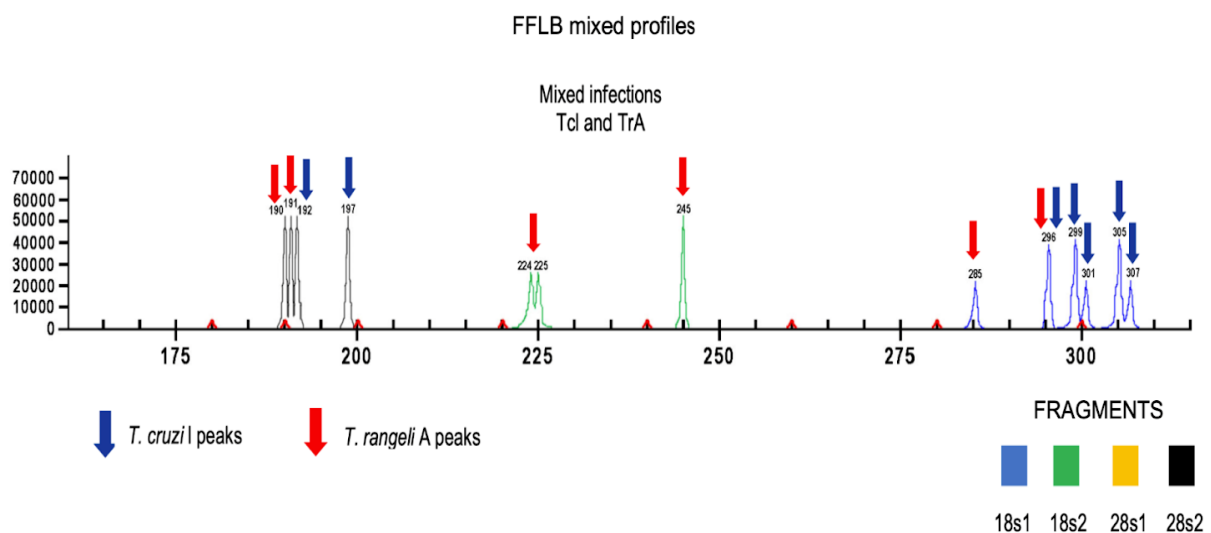


Figure 3. FFLB profiles obtained with DNA samples from *R. stali*. The image shows different peaks that form the specific profile of each species/genotype. In this case, we have the occurrence of mixed infection of the protozoa *T. cruzi* (TcI) and *T. rangeli* (TrA).

T. cruzi is a complex taxon comprising seven DTUs. The DTUs TcI, TcIII, TcIV, and TcV genotypes of *T. cruzi* were related to oral outbreaks of acute Chagas disease (ACD) in Brazil, Colombia, Venezuela, Bolivia, and French Guiana (Velásquez-Ortiz; Ramirez, 2020). In Brazil, there is a predominance of TcI and TcIV in oral transmission in the Amazon region (Santana *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020; Bruneto *et al.*, 2021; Madeira *et al.*, 2021; Vergara-Meza *et al.*, 2022). *T. rangeli* is non-pathogenic to humans but is epidemiologically relevant as it can cause false-positive results in xenodiagnosis of triatomines, and microscopical and serological tests used to diagnose *T. cruzi* infection (Guhl *et al.*, 1985; Zuniga *et al.*, 1997). This species is widespread in Brazilian Amazonia, where three (TrA, TrB and TrE) of the five

known genotypes are transmitted by *Rhodnius* spp. to a range of wild mammals, domestic dogs, and humans (Maia da Silva *et al.*, 2007; Dario *et al.*, 2021; Vergara-Meza *et al.*, 2022).

In Rondônia, the following triatomines have already been reported: *Eratyrus mucronatus* Stal, 1859, *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), *P. lignarius* (Walker, 1873), *P. megistus* (Burmeister, 1835), *P. rufotuberculatus* (Champion, 1899), *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão and Jurberg, 2001, *R. montenegrensis* Rosa *et al.*, 2012, *R. pictipes* Stål, 1872, *R. robustus* Larrousse, 1927 and *Rhodnius stali* Lent, Jurberg & Galvão, 1993 (Massaro; Rezende; Camargo 2008; Rosa *et al.* 2012; Galvão 2014; Galvão; Justi 2015; Terassini *et al.* 2017; Castro *et al.* 2018; Rocha *et al.* 2021). This is the second report of *R. stali* in southwestern Amazon, after early reports in Acre (Meneguetti *et al.* 2016; Jesus *et al.*, 2021). First reports of *R. stali* in Brazilian territory were from Mato Grosso do Sul (Maia da Silva *et al.* 2009; Gurgel-Gonçalves *et al.* 2012, Galvão, 2014).

Our finding of *R. stali* in Rondônia indicates the need for meticulous entomological and epidemiological surveillance in the Brazilian Amazon. Additionally, accurate taxonomic identification, the study of the biology and geographical distribution of vectors and etiological agents of diseases are fundamental to design strategies for the prevention of Chagas disease in the Amazon region.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our gratitude to the Federal Institute of Education, Science, and Technology of Rondônia (IFRO), Guajará-Mirim Campus, for providing technical support during the study. The second to last author (JO) would like to thank the São Paulo State Research Support Foundation - FAPESP for the scholarship. We would like to thank José Gabriel Meza for his great help in the molecular analyzes and the student Raí da Silva Lopes for his effort and dedication in collecting insects. We would like to thank Evaristo Villalba Alemán, Marta Campaner, Carmem Silva de Almeida Takata, Letícia Pereira Úngari and Bruno Rafael Fermino for all the support and help with the daily laboratory routine.

FINANCING SOURCE

This study was partially funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. JAR's research was supported by CNPq, PQ-2, process 307 398/2018-8, and the Federal Institute of Education, Science, and Technology of Rondônia (IFRO), under Public Notice No.5/2021/REIT - PROPESP/IFRO, dated July 5th, 2021.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Menezes; Ribeiro; Cruz: Conceptualization, Methodology, Writing - Original Draft and Programs. Carvalho: Methodology, Programs and Data Curation. Oliveira; Teixeira; Rosa: Methodology, Writing - Original Draft, Review, Editing, and Supervision. All authors read and agreed to the published publication of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.