

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta Tese será disponibilizado somente a partir de 16/04/2021.

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

Jader de Oliveira

Estudo citogenético, molecular, morfométrico e morfológico de espécies do gênero
***Psammolestes* Bergroth, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).**

Araraquara - SP
2019

JADER DE OLIVEIRA

**Estudo citogenético, molecular, morfométrico e morfológico de espécies do gênero
Psammolestes Bergroth, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).**

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

Orientador: Prof. Dr. João Aristeu da Rosa

Co-orientador: Dr. Carlos Eduardo Almeida

Araraquara - SP

2019

O49e Oliveira, Jader de.
Estudo citogenético, molecular, morfométrico e morfológico de espécies do gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) / Jader de Oliveira. – Araraquara, 2019. 95 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação Em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Parasitologia e Entomologia.

Orientador: João Aristeu da Rosa.
Coorientador: Carlos Eduardo Almeida.

1. Triatominae. 2. Rhodniini. 3. Sistemática. 4. Evolução e Cruzamentos. 5. Evolution and Crossovers. I. Rosa, João Aristeu da, orient. II. Almeida, Carlos Eduardo, 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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudo citogenético, molecular, morfométrico e morfológico de espécies do gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).


AUTOR: JADER DE OLIVEIRA

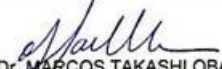
ORIENTADOR: JOAO ARISTEU DA ROSA


COORIENTADOR: CARLOS EDUARDO ALMEIDA


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: Parasitologia pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara


Pro. Dr. HELCIO REINALDO GIL SANTANA
Laboratório de Diptera / Instituto Oswaldo Cruz


Prof. Dr. MARCOS TAKASHI OBARA
Faculdade de Ceilândia / Universidade de Brasília


Profa. Dra. JANE MARGARET COSTA DE FRONTIN WERNECK
Laboratório de Biodiversidade Entomológica / Instituto Oswaldo Cruz


Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 16 de abril de 2019

Dedicatória

Ao Professor Dr. João Aristeu da Rosa pela orientação, amizade e por toda confiança que depositou no meu trabalho nos momentos mais difíceis, por todo seu carisma, carinho e calma em resolver os problemas. Resumindo, por toda a sua simplicidade de levar e assimilar a ciência com a vida de uma forma exuberante. Um maestro afinado com a vida.

In memoriam

Ao meu pai Jairo de Oliveira que partiu no meio do meu doutoramento e sempre sonhou em me ver formado com o título de doutor.

Agradecimentos

Em especial a minha esposa Paloma que foi uma pessoa maravilhosa me dando todo o apoio e acima de tudo concebeu a vida do nosso filho OTTO. Amo vocês!

Aos meus Avós que sempre guiaram e apoiaram meus estudos e trabalhos. Amo vocês.

A minha mãe Marinisa e irmã Jaira exemplos de amor, coragem, carinho e amizade.

À Professora Dra. Mara Cristina Pinto por toda a atenção, paciência e carinho nas correções, dúvidas e discussões do laboratório.

Ao laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP/Araraquara – SP.

À equipe de limpeza do departamento de Ciências Biológicas em especial a Marta, que toda manhã nós recebe com um sorriso e um bom dia carismático.

À toda equipe da secretaria de pós graduação e a coordenação de pós graduação.

À Secretaria de Saúde do Estado da Bahia/SESAB – Divisão de Entomologia, em especial a Eduardo Oyama, Ernesto Alves, Carlos Gustavo, José Carlos Alves dos Santos e Orlando Marcos Farias de Sousa por todo apoio em campo na Bahia.

À Jucimar Vaz: Agente de doença de Chagas, Centro de Controle de Endemias de SEABRA – BA por toda colaboração em campo.

Ao Professor Dr. Heitor Miraglia Herrera e ao Dr. Filipe Martins Santos, pela autorização e auxílio durante as etapas de coleta na região da Nhêcolândia no Pantanal Sul Mato-grossense.

Ao parceiro de laboratório e amigo Kaio Cesar Chaboli Alevi por todas as discussões, reflexões sistemáticas em Triatominae, agradeço em especial ao financiamento e todo apoio para a realização do trabalho de campo na Venezuela.

Ao amigo e entomologista amador José Manuel Ayala por todas as discussões e por me indicar o contato no museu MIZA em Maracay, Venezuela.

Ao *Museo del Instituto de Zoología Agrícola Francisco Fernández Yépez, Facultad de Agronomía*, MIZA da Universidade Central de Venezuela em especial a Diretora Dra. Vilma Savini e Wilmer por ter dado todo apoio do inicio ao fim ao

trabalho de campo, apesar de todas as dificuldades que o instituto e o país passava, fomos recebidos e tivemos todo respaldo para a execução do trabalho.

À Dra. Maria Tercília Vilela Azeredo-Oliveira por ter aberto o seu laboratório e dado toda a estrutura para eu realizar o estudo citogenético.

Ao Dr. Cleber Galvão do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos IOC, pela autorização, apoio na visita da coleção entomológica Dr. Herman Lent e Dr. Rodolfo Carcavallo, por todos ensinamentos compartilhados nos estudos da subfamília Triatominae e pela amizade.

Ao Dr. Hélcio Reinaldo Gil-Santana que dedicou número infinito de horas e dias em incontáveis explicações, opiniões, sugestões, correções, envio de textos, artigos e ensinamentos taxonômicos, sem os quais eu não teria chegado aqui.

Aos dois amigos que a pós-graduação me deu Jorge Fernando Brandão Pereira e André Moreni Lopes que com o conhecimento e paciência transmitiram as informações necessárias para que eu possa dar mais um passo a frente e seguir confiante em minha carreira.

Aos meus amigos Carlos Eduardo, André Teco, Marinaldo Souza, Fabio Barata, Thiago Schiavon, Fernando Mello, Alexandre Schiavon, Marcelo Quem, Marcos Oga, Roberto Gomes Padilha, Tacio Duarte, Everton Dias, Rogério Fields, Renato, Juliana Cassila e Livia Pires que de certa forma me deram apoio e energias positivas.

Ao Dr. Carlos Eduardo de Almeida pela co-orientação e amizade de longa data.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de estudos concedida para a execução desta Tese.

À vocês o meu reconhecimento e sincero agradecimento pelo incentivo e auxílio durante todas etapas desta Tese.

Jader de Oliveira

Errare Humanum Est

Tem uns dias
Que eu acordo
Pensando e querendo saber
De onde vem
O nosso impulso
De sondar o espaço
A começar pelas sombras sobre as estrelas-las-las-las
E depensar que eram os deuses astronautas
E que se pode voar sozinho até as estrelas-las-las
Ou antes dos tempos conhecidos
Conhecidos
Vieram os deuses de outras galáxias-xias-xias
Ou de um planeta de possibilidades impossíveis
E de pensar que não somos os primeiros seres terrestres
Pois nós herdamos uma herança cósmica
Errare humanum est
Errare humanum est
Nem deuses
Nem astronautas

Jorge Ben Jor – A tábua de esmeraldas (1974)

Resumo

A subfamília Triatominae inclui com as tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini, dentre as quais 19 gêneros e 154 espécies. As tribos Rhodniinini e Triatomini contém o maior número de espécies e epidemiologicamente as mais relevantes. O gênero *Psammolestes* que pertence à tribo Rhodniinini e conta com as espécies *P. arthuri*, *P. coreodes* e *P. tertius*. Foram realizados estudos citogenéticos, morfológicos, morfométricos, morfométricos geométricos e inferências evolutivas do gênero *Psammolestes*. Os estudos citogenéticos dos testículos foram feitos por meio de técnicas citogenéticas convencionais e indicaram a evolução cromossômica das três espécies de *Psammolestes*; Os aspectos morfológicos de ovos, adultos machos e fêmeas foram estudados por meio de microscopia eletrônica de varredura; a morfometria clássica por meio de mensuração de ovos e avaliada por análise estatística; o estudo da morfometria geométrica de cabeças foi conduzido por análises multivariadas e gráficos gerados no programa CLIC “*Collecting Landmarks for Identification and Characterization*”. Foram propostas hipóteses filogenéticas baseando-se na matriz morfométrica, padrão da coloração da glândula salivar e evolução cromossômica.

Palavras chaves: Triatominae, Rhodniini, Sistemática, Evolução e Cruzamentos.

Abstract

The subfamily Triatominae counts on the tribes: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniinini and Triatomini, among which 19 genera and 154 species. The Rhodniinini and Triatomini tribes contain the largest number of species and epidemiologically the most relevant. The genus *Psammolestes* belongs to the Rhodniinini tribe and has the species *P. arthuri*, *P. coreodes* and *P. tertius*. Cytogenetic, morphological, morphometric, morphometric and evolutionary inferences of the genus *Psammolestes* were performed. Cytogenetic studies of the testis were made using conventional cytogenetic techniques and showed the chromosomal evolution of the three species of *Psammolestes*; The morphological aspects of eggs, adult males and females were studied by means of scanning electron microscopy; The classical morphometry by means of egg measurement and evaluated by statistical analysis; the study of the geometric morphometry of heads was conducted by multivariate analyzes and graphs generated in the CLIC program "CollectingLandmarks for Identification and Characterization". Phylogenetic hypotheses were proposed based on the morphometric matrix, salivary gland coloration pattern and chromosome evolution.

Keyword: Triatominae, Rhodniini, Systematics, Evolution and Crossovers.

Sumário

Capitulo I.....	12
Introdução	12
Objetivos	22
Geral.....	22
Específicos	22
Referências.....	23
Capitulo II - (Artigo científico publicado na revista <i>Genetics and Molecular Research</i>).....	26
Capitulo III (Artigo científico publicado na revista <i>The American Journal of Tropical Medicine & Higiene</i>).....	33
Capitulo IV (Artigo científico publicado na revista <i>The American Journal of Tropical Medicine & Higiene</i>).....	38
Capitulo V (Artigo científico que será submetido na revista <i>Journal Medical Entomology</i>). Erro! Indicador não definido.	
Capitulo VI (Artigo científico que será submetido para a revista <i>Infection, genetics and Evolution</i>)..... Erro! Indicador não definido.	
Capitulo VII (Artigo científico que será submetido para a revista <i>PLOS ONE</i>). Erro! Indicador não definido.	
Anexo	51

Capítulo I

Introdução

A subfamília Triatominae descrita por (JEANNEL, 1919) a subfamília Triatominae é reconhecida pela hematofagia obrigatória das espécies pertencentes à mesmas. Pode ser diferenciada das demais subfamílias de Reduviidae por apresentarem uma membrana entre o segundo e o terceiro segmento do aparelho bucal picador-sugador. Atualmente, Triatominae é composta por 154 espécies e 19 gêneros, a subfamília Triatominae e está dividida em cinco tribos: Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini e Triatomini, das quais as duas últimas são as que apresentam o maior número de espécies e epidemiologicamente mais relevantes (DORN et al., 2018; GALVÃO, 2014; GALVÃO et al., 2003; LENT; WYGODZINSKY, 1979; LIMA-CORDÓN et al., 2019; POINAR, 2019).

Os triatomíneos possuem desenvolvimento hemimetabólico com cinco estádios ninfais anteriores à fase adulta. As ninfas podem ser diferenciadas dos adultos por serem ápteras, pela ausência de ocelos e de fossetas esponjosas. O 5º estágio apresenta diferenciação sexual externa, enquanto os adultos apresentam evidente dimorfismo sexual (ESPÍNOLA, 1966; LENT; WYGODZINSKY, 1979; ROSA et al., 1992).

Os adultos possuem cabeça geralmente alongada e subcilíndrica, dividida em regiões ante e pós-ocular; olhos bem desenvolvidos e presença de ocelos; um par de antenas com quatro artículos com funções olfatória e auditiva. Na base de cada antena pode ser encontrada uma estrutura chamada de tubérculo antenífero, situada lateralmente. O aparelho bucal do tipo picador-sugador é curto e retilíneo, formado por três segmentos. O tórax com o pronoto bem desenvolvido e escutelo proeminente exhibe

características com grande importância taxonômica. O abdome achatado dorso-ventralmente, apresenta conexivos laterais (LENT; WYGODZINSKY, 1979).

A maioria das espécies de triatomíneos podem ser encontradas no ambiente silvestre, vivem em ninhos de aves, tocas de animais, sob cascas ou ocos de árvores, em bromélias, palmeiras, abaixo de pedras e outros ecótopos, associados a mamíferos, aves, anfíbios, répteis e invertebrados dos quais se alimentam. Algumas espécies, no decurso da evolução, adquiriram a capacidade de colonizar as estruturas artificiais construídas pelo homem nas proximidades de suas casas, como galinheiros, pocilgas e estábulos e são denominadas peridomiciliares. Outras são capazes de colonizar o interior das habitações humanas, principalmente daquelas construídas de maneira a propiciar condições de albergar os triatomíneos, construções feitas de barro e bambu com folhas de palmeira. Essas são as espécies domiciliares, as mais importantes tratando-se de transmissão vetorial, uma vez que, são as principais responsáveis pela transmissão da doença de Chagas (CARCAVALLO et al., 1998a, 1998b).

Psammolestes Bergroth, 1911

Bergroth (1911) descreveu o gênero *Psammolestes* e a espécie *P. coreodes*. (BERGROTH, 1911). A seguir, em 1926, Cesar Pinto descreveu *Eutriatoma arthuri*, que posteriormente foi transferida para o gênero *Psammolestes* por Del Ponte em 1930. Em 1965 Lent & Jurberg descreveram *P. tertius*, a terceira e última espécie reconhecida até o momento no gênero *Psammolestes* (BERGROTH, 1911; DEL PONTE, 1930; LENT; JURBERG, 1965; PINTO, 1926).

A estreita associação de *Psammolestes* com aves sugere que essas constituem a única fonte de alimentação para esses triatomíneos na natureza. São várias as espécies de aves encontradas em associação com as três espécies de *Psammolestes* (LENT;

WYGODZINSKY, 1979). Espécies do gênero de *Psammolestes* já foram encontradas em ninhos das seguintes famílias de aves: Dendrocolaptidae (arapaçus), Troglodytidae (curruíra, garrinchão), Furnariidae (João graveteiro e João de barro), Icteridae (corrupião, japu, João pinto amarelo e xexéu)(BARRETTO; ALBUQUERQUE, 1969; CRUZ-GUZMÁN et al., 2014; GONÇALVES DIOTAIUTI et al., 2018; PIFANO, 1938; PINTO; LENT, 1935; SHERLOCK; GUITTON, 1973).

Psammolestes arthuri (Pinto, 1926)

O comprimento total dos machos:11,0 e 12,0 mm, das fêmeas entre 12,0 e 14,0 mm. Coloração geral amarelo palha com áreas irregularmente manchadas de castanho. Tegumento rugoso com cerdas curtas e douradas, cabeça muito curta com 3 mm de comprimento, antenas inseridas próximas aos olhos; primeiro segmento antenal curto quase atingindo a extremidade apical da cabeça, segundo, terceiro e quarto segmentos antenais quase do mesmo tamanho e todos com coloração castanha; cabeça castanha possuindo uma estria longitudinal mais clara e disposta centralmente, olhos negros e ocelos claros (LENT; WYGODZINSKY, 1979; PINTO, 1926).

O lábio é reto com três segmentos, o segundo segmento é o mais longo de todos; o terceiro é igual ao primeiro em extensão. A soma do 1° e 3° é menor do que o comprimento do 2° segmento. Escutelo triangular colorido escuro e castanho no ápice; conexivo estreito, escuro quase negro com cinco pequenas manchas transversais castanhas, com coloração mais intensa no ápice. Hemiélitros com divisão normal entre cório e membrana: Corio castanho, membrana um pouco mais escura; face ventral de colorido castanho e irregularmente salpicada de negro. As pernas são de colorido castanho, e as tíbias são mais escuras (LENT; WYGODZINSKY, 1979; PINTO, 1926).

Psammolestes arthuri já foi encontrado na Colombia (Meta) e na Venezuela (Aragua, Cojedes, Miranda, Guárico, Portuguesa, Yaracuy, Anzoátegui, Apure, Lara, Táchira, Barinas, Monagas) (GALVÃO et al., 2003).

Material tipo: Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro.

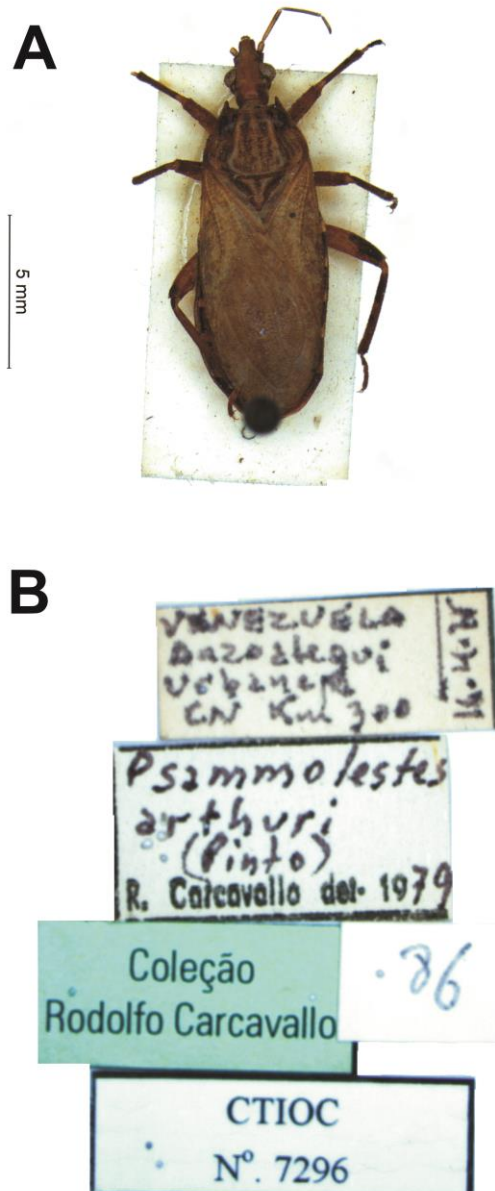


Figura 1 – A – Espécime macho de *P. arthuri*; B- etiquetas com informação sobre o espécime. (Imagens cedidas pelo Dr. Cleber Galvão do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos – LNIRTT).

Psammolestes coreodes (Bergroth, 1911).

O comprimento total dos machos varia entre 12 e 14 mm, das fêmeas entre 13,5 e 15 mm. Coloração geral marrom amarelada com áreas irregularmente manchadas de marrom escuro ou negro. Tegumento rugoso com cerdas curtas e douradas. Cabeça tão longa ou ligeiramente mais longa que larga, distintamente mais curta que o pronoto; de coloração amarelada e irregularmente manchada de marrom escuro (BERGROTH, 1911; GALVÃO, 2014; LENT; WYGODZINSKY, 1979).

Genas visíveis, fortemente divergentes, ultrapassando consideravelmente o clipeo. Olhos grandes, em vista lateral podem alcançar, mas não ultrapassar a face ventral da cabeça. Ocelos inseridos em nítidas elevações. Antenas amareladas, manchadas com negro; segundo artículo negro no ápice, terceiro escurecido submedianamente. Segundo e terceiro segmentos labiais com longas cerdas. Ângulos ântero-laterais do pronoto curtos, não atingindo o nível dos ocelos, aplainados e acuminados com pequenas áreas negras. Lobo posterior do pronoto irregularmente rugoso. Escutelo rugoso transversalmente, processo apical se estreitando apicalmente. Hemiélitro da mesma coloração do corpo, células da membrana distintamente escurecidas. Hemiélitros dos machos atingindo o ápice do abdômen, enquanto o das fêmeas apenas se aproxima. (BERGROTH, 1911; GALVÃO, 2014; LENT; WYGODZINSKY, 1979).

Pernas de cor marrom claro, com manchas marrons escuras irregularmente espalhadas. Abdômen ventral marrom amarelado, irregularmente reticulado com

manchas negras e com filas de manchas escuras longitudinais. Segmentos conexivais amarelados, geralmente com duas distintas marcas marrom escuro ao longo da margem lateral.(BERGROTH, 1911; GALVÃO, 2014; LENT; WYGODZINSKY, 1979).

Psammolestes coreodes encontra-se distribuido na Argentina (Catamarca, Córdoba, Corrientes, Chaco, Entre Rios, Formosa, Santa Fé, Santiago Del Estero, Salta, Jujuy, Tucumán), Bolivia (Santa Cruz), Brasil (Mato Grosso), Paraguay (Central) (GALVÃO et al., 2003).

Material tipo: *Universitetets Zoologiska Museum, Helsinki, Finland.*

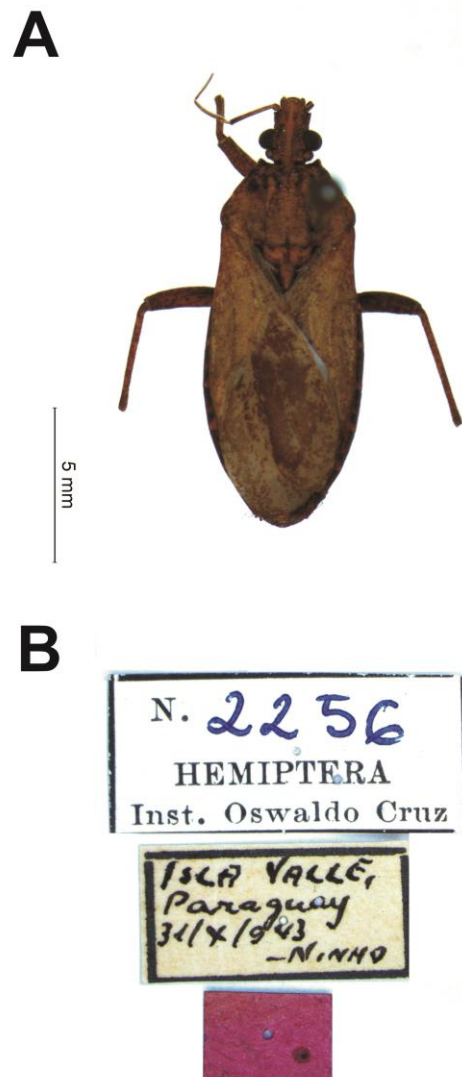


Figura 2 – A – Espécime de *P. coreodes*; B- etiquetas com informação sobre o espécime. (Imagens cedidas pelo Dr. Cleber Galvão do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos – LNIRTT).

Psammoles tertius Lent e Jurberg, 1965

Comprimento total dos machos de 11,5 a 12,5 mm, das fêmeas de 12,5 a 13,5 mm. Coloração geral marrom amarelada com áreas irregularmente manchadas de marrom escuro ou negro. Tegumento rugoso com sensilas curtas e douradas. Cabeça ligeiramente mais longa que larga e mais curta que o pronoto; coloração marrom amarelada dorsalmente com manchas escuras distribuídas irregularmente. Clípeo ligeiramente alargado anteriormente. Genas visíveis, fortemente divergentes, ultrapassando consideravelmente o clípeo. Olhos grandes, em vista lateral podem alcançar o nível da superfície ventral da cabeça e se aproximando do nível da superfície dorsal. Ocelos inseridos em nítidas elevações (um pouco menos proeminentes que em *P. coreodes*). Segundo e terceiro segmentos do lábio com longas cerdas. Pronoto com numerosas manchas escuras no lobo anterior. Escutelo rugoso transversalmente, processo apical afinando para o ápice. Hemiélitro atingindo o ápice do abdômen em ambos os sexos, de cor marrom geral, com cerdas da membrana distintamente escurecidas. Pernas da cor do corpo, com manchas marrons escuras irregularmente espalhadas. Abdômen e conexivo como em *P. coreodes*(GALVÃO, 2014; LENT; JURBERG, 1965; LENT; WYGODZINSKY, 1979)

P. tertius encontra-se distribuído no Brasil (Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, São Paulo e Rio Grande do Norte) e no Peru (San Martin)(CABRERA, 2006; GALVÃO et al., 2003; SILVA et al., 2018).

Material tipo: Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro.

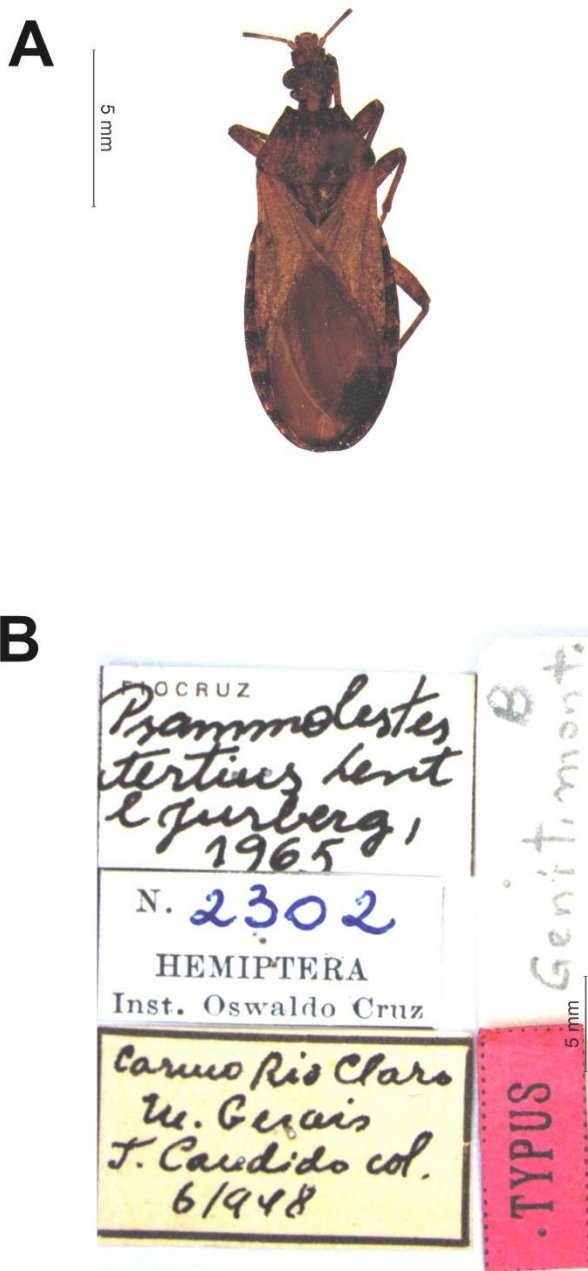


Figura 03 – A – Espécime tipo de *P. tertius*; B- etiquetas com informação sobre o espécime. (Imagens cedidas pelo Dr. Cleber Galvão do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos – LNIRTT).

Tribo Rhodniini

A tribo Rhodniini é composta por 23 espécies distribuídas em dois gêneros, a saber, *Rhodnius* e *Psammolestes*. As espécies do gênero *Rhodnius* são difíceis de distinguir apenas por dados morfológicos, pois apresentam plasticidade fenotípica e eventos de especiação críptica (ABAD-FRANCH et al., 2013), o que ressalta a importância dos dados moleculares para a correta identificação dos diferentes táxons. Dos dados, quando aplicados em estudos filogenéticos, sugeriram que a tribo Rhodniini é um grupo monofilético e o gênero *Rhodnius* é parafilético (MONTEIRO et al., 2000, 2018), o que ressalta a necessidade de novas análises para avaliar as questões taxonômicas e a hipótese do parafiletismo de *Rhodnius* (DE CARVALHO et al., 2017; ROSA et al., 2017).

Eventos de hibridização natural foram relatados para a tribo Rhodniini (DIAS; JARAMILLO-O; DIOTAIUTI, 2014). Além disso, cruzamentos experimentais entre *R. prolixus* x *R. neglectus*, *R. prolixus* x *R. robustus*, *R. prolixus* x *R. pictipes* e *R. pallescens* x *R. colombiensis* (CARVALHEIRO JR, 1976; DÍAZ et al., 2014; GALÍNDEZ et al., 1994) produziram híbridos em pelo menos uma das direções, ressaltando ausência de isolamento reprodutivo entre as espécies dessa tribo, o que também pode acarretar em erros taxonômicos caso esses organismos sejam encontrados na natureza. O cruzamento experimental entre *R. taquarussuensis* x *R. neglectus*, associado com dados de sistemática filogenética, demonstrou que *R. taquarussuensis* é uma entidade taxonômica sinônima de *R. neglectus* (RAVAZI et al., 2019; ROSA et al., 2017), destacando, assim, a importância de estudos filogenéticos associados à análise de híbridos experimentais para a taxonomia, sistemática e evolução da tribo Rhodniini.

Estudos mais aprofundados e dinâmicos devem ser desenvolvidos para solucionar as derivações evolutivas que permanecem desconhecidas sobre a tribo Rhodniini em especial, espécies do gênero *Psammolestes*, pois as suas características biológicas e ecológicas são distintas dos demais Triatominae .

Em vista do referido anteriormente, este trabalho tem o intuito de contribuir para aprofundar os estudos das três espécies do gênero *Psammolestes* por meio de métodos citogenéticos, morfométricos e morfológicos.

Objetivos

Geral

Estudar a evolução cromossômica, os caracteres morfológicos e morfométricos, bem como propor uma organização sistemática para as três espécies do gênero *Psammolestes*.

Específicos

Analisar a morfologia de ovos, glândulas salivares, genitálias masculina, feminina, cabeça e tórax das espécies: *P. arthuri*, *P. coreodes*, *P. tertius* capturados em diferentes áreas do Brasil e Venezuela.

Avaliar os aspectos morfométricos de cascas de ovos e da cabeça de adultos fêmeas das espécies do gênero *Psammolestes*.

Analisar a evolução cromossômica das três espécies do gênero *Psammolestes*.

Realizar cruzamentos experimentais entre espécies do gênero *Psammolestes* e *Rhodnius*, a fim de verificar a compatibilidade genômica entre a tribo Rhodniini.

Referências

ABAD-FRANCH, F.; PAVAN, M. G.; JARAMILLO-O, N.; PALOMEQUE, F. S.; DALE, C.; CHAVERRA, D.; MONTEIRO, F. A. *Rhodnius barretti*, a new species of triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 108, p. 92–99, 2013.

BARRETTO, M. P.; ALBUQUERQUE, R. D. R. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXIII. Infecção experimental e natural do *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 pelo *T. cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, [s. l.], v. 11, p. 4, 1969.

BERGROTH, E. A new genus of Reduviidae. **Psyche**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 144–146, 1911.

CABRERA, R. Brief notes on *Psammolestes tertius*, Bergroth, 1911 (Reduviidae:Hemiptera): a wild triatomine. [s. l.], v. 67, n. 4, p. 345–346, 2006.

CARCAVALLO, R.; GIRON, I.; JURBERG, J.; LENT, H. Feeding sources and patterns. In: **Atlas of Chagas' Disease Vectors in The Americas**. [s.l: s.n.]. p. 23.

CARCAVALLO, R.; GIRON, I.; JURBERG, J.; LENT, H. Geographical distribution and altitudinal dispersion/ Dispersão Geográfica e dispersão altitudinal. In: **Atlas of Chagas' Disease Vectors in The Americas**. [s.l: s.n.]. p. 143.

CARVALHEIRO JR, B. M. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LX – tentativas de cruzamento de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 com *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 (Hemiptera, Reduviidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 18, 1976.

CRUZ-GUZMÁN, P. J.; MOROCOIMA, A.; CHIQUE, J. D.; RAMONIS-QUINTERO, J.; TOQUERO UZCÁTEGUI, M.; CARRASCO, J. *Psammolestes arthuri* NATURALLY INFECTED WITH *Trypanosoma cruzi* FOUND IN SYMPATRY WITH *Rhodnius prolixus* AND *Triatoma maculata* ON BIRD NESTS IN ANZOÁTEGUI STATE, VENEZUELA. **Universidad de Oriente, Venezuela**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 428–440, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.org.ve/pdf/saber/v26n4/art08.pdf>>

DE CARVALHO, D. B.; CONGRAINS, C.; CHAHAD-EHLERS, S.; PINOTTI, H.; DE BRITO, R. A.; DA ROSA, J. A. Differential transcriptome analysis supports *Rhodnius montenegrensis* and *Rhodnius robustus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) as distinct species. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1–16, 2017.

DEL PONTE, E. Catalogo descriptivo de los géneros *Triatoma* Lap, *Rhodnius* Stal y *Eratyrus* Stal. **Revista do Instituto de Bacteriologia**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 12, 1930.

DIAS, F. B. S.; JARAMILLO-O, N.; DIOTAIUTI, L. Description and characterization of the melanic morphotype of *Rhodnius nasutus* Stål, 1859 (Hemiptera: Reduviidae):

Triatominae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 637–641, 2014.

DÍAZ, S.; PANZERA, F.; JARAMILLO-O, N.; PÉREZ, R.; FERNÁNDEZ, R.; VALLEJO, G.; SALDAÑA, A.; CALZADA, J. E.; TRIANA, O.; GÓMEZ-PALACIO, A. Genetic, cytogenetic and morphological trends in the evolution of the *Rhodnius* (Triatominae: Rhodniini) trans-Andean group. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1–12, 2014.

DORN, P. L.; JUSTI, S. A.; DALE, C.; STEVENS, L.; GALVÃO, C.; LIMA-CORDÓN, R.; MONROY, C. Description of *Triatoma mopan* sp. n. from a cave in Belize (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, [s. l.], v. 775, p. 69–95, 2018.

ESPÍNOLA, H. N. Note on sex differences in immature forms of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 263–267, 1966.

GALÍNDEZ, G.; BARAZARTE, R.; MÁRQUEZ, J.; OVIEDO, M.; MÁRQUEZ, Y.; MORÓN, L.; CARCAVALLO, R. Relaciones reproductivas entre *Rhodnius prolixus* Stal y *Rhodnius robustus* Larrousse (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) bajo condiciones de laboratorio. **Entomología y Vectores**, [s. l.], v. 1, 1994.

GALVÃO, C. **Vetores da Doença de Chagas no Brasil**. SciELO Boo ed. Curitiba: 2014, 2014. Disponível em: <<http://books.scielo.org>>

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D. da S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, [s. l.], v. 202, n. 1, p. 1, 2003.

GONÇALVES DIOTAIUTI, L.; MENDONCA BEZERRA, C.; JOSÉ SOARES, C.; MARIANA COSTA, L.; ERMELINDA BARBOSA, S. DESCRIPTION OF AN AMAZING NEST OF CAATINGA CACHALOTE *Pseudoseisura cristata* INFESTED BY *Psammolestes tertius* IN TAUÁ, STATE OF CEARÁ, NORTHEASTERN BRAZIL. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 125, 2018.

JEANNEL, R. Henicocephalidae et Reduviidae. Voyage de Ch. Alluaud et R. Jeannel en Afrique orientale. **Résultats Scientifiques Hemiptera**, [s. l.], v. 3, p. 131–314, 1919.

LENT, H.; JURBERG, J. O gênero *Psammolestes* Bergroth, 1911, com um estudo sobre a genitalia das espécies (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Revista Brasileira de Biologia**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 27, 1965.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of chagas disease. **Natural History**, [s. l.], v. 163, 1979.

LIMA-CORDÓN, R. A.; MONROY, M. C.; STEVENS, L.; RODAS, A.; RODAS, G. A.; DORN, P. L.; JUSTI, S. A. Description of *Triatoma huehuetenanguensis* sp. n., a potential Chagas disease vector (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **ZooKeys**, [s. l.], v. 820, p. 51–70, 2019.

MONTEIRO, F. A.; WEIRAUCH, C.; FELIX, M.; LAZOSKI, C.; ABAD-FRANCH, F.

Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. **Advances in Parasitology**, [s. l.], v. 99, p. 265–344, 2018.

MONTEIRO, F. A.; WESSON, D. M.; DOTSON, E. M.; SCHOFIELD, C. J.; BEARD, C. B. Phylogeny and molecular taxonomy of the rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 62, n. 4, p. 460–465, 2000.

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 Mededica de Caracas**, [s. l.], v. 45, p. 5, 1938.

PINTO, C. Triatomideos da venezuela, com a descrição de uma nova especie do gênero "Eutriatoma". **Annaes da faculdade de Medicina de S. Paulo**, [s. l.], v. 1, p. 3, 1926.

PINTO, C.; LENT, H. Sobre as especies do genero *Psammolestes* Bergroth, 1911 (Hemiptera, Triatomidae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 7, p. 5, 1935.

POINAR, G. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxytaxa* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. **Cretaceous Research**, [s. l.], v. 93, p. 90–97, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.09.004>>

RAVAZI, A.; ALEVI, K. C. C.; NASCIMENTO, J. D.; RAMÍREZ, J. D.; PARDO-DIAZ, C.; SALGADO-ROA, F. C.; DA ROSA, J. A.; DE AZEREDO OLIVEIRA, M. T. V.; DE OLIVEIRA, J.; HERNÁNDEZ, C.; SALAZAR, C. Taxonomical over splitting in the *Rhodnius prolixus* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) clade: Are *R. taquarussuensis* (da Rosa et al., 2017) and *R. neglectus* (Lent, 1954) the same species? **PLOS ONE**, [s. l.], 2019.

ROSA, J. A. Da; BARATA, J. M. S.; BARELLI, N.; SANTOS, J. L. F.; NETO, Francisco M. B. N. Sexual distictionbetween 5th instar nymphs of six species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). [s. l.], v. 87, n. 2, p. 257–264, 1992.

ROSA, J. A.; JUSTINO, H. H. G.; NASCIMENTO, J. D.; MENDONÇA, V. J.; ROCHA, C. S.; DE CARVALHO, D. B.; FALCONE, R.; DE AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ALEVI, K. C. C.; DE OLIVEIRA, J. A new species of rhodnius from Brazil (Hemiptera, reduviidae, triatominae). **ZooKeys**, [s. l.], 2017.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, N. Fauna Triatominae do estado da Bahia - Brasil III - Notas sobre ecótopos silvestres e o gênero *Psammolestes*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 1, p. 11, 1973.

SILVA, A. N. B. Da; DIOTAIUTI, L.; CUNHA GALVÃO, L. M.; CHIARI, E.; CÂMARA DE OLIVEIRA, P. I.; JÁCOME DA CÂMARA, A. C.; MOREIRA DE SOUZA, R. de C. First report of *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Rio Grande do Norte state, Brazil. **Check List**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1109–1113, 2018.

Capítulo II - (Artigo científico publicado na revista *Genetics and Molecular Research*)

New record and cytogenetic analysis of *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Bahia State, Brazil

Jader de Oliveira^{1*}, Kaio Cesar Chaboli Alevi², Eduardo Oyama Lins Fonseca³, Orlando Marcos Farias de Souza³, ³, Maria Tercilia Vilela de Azeredo-Oliveira², João Aristeu da Rosa¹

¹São Paulo State University School of Pharmaceutical Sciences (UNESP/FCFAR), Department of Biological Sciences, Parasitology Laboratory. Address: Rod. Araraquara-Jaú, Km 1. CEP 14801-902. Araraquara, São Paulo, Brazil.

²São Paulo State University Institute of Biological Sciences, Letters, and Exact Sciences (UNESP/IBILCE), Department of Biology, Cellular Biology Laboratory. Address: Rua Cristóvão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

³Professor Gonçalo Moniz Central Laboratory for Public Health (LACEN-BA), Entomology Laboratory, Address: Rua Waldemar Falcão, 123, CEP 40.296-710, Candeal, Salvador, Bahia, Brazil

*Corresponding Author: E-mail: jdr.oliveira@hotmail.com

Abstract

This short communication reports on the first occurrence of *Psammolestes tertius* in the Chapada Diamantina region, located in the city of Seabra, Bahia State, in northeastern Brazil. On an active search, 24 *P. tertius* specimens were collected from *Phacellodomus rufifrons* (rufous-fronted thornbird) nests. The *P. tertius* specimens were identified based on the criteria previously described by Lent and Wygodzinsky in 1979. The insects did not present infection by *Trypanosoma cruzi*. *P. tertius* males were cytogenetically analyzed, and the results were compared to the data on other specimens from the Brazilian state of Ceará. Triatomines from both locations presented the same cytogenetic characteristics: 22 chromosomes, little variation in the size of the autosomes, Y chromosomes that were larger than the X chromosomes, a chromocenter formed only by the sex chromosomes during prophase, and autosomes lacking constitutive heterochromatin. However, it is important to note that this species presents intraspecific chromosomal variation. In light of the results obtained, it is recommended that more studies be performed to characterize *P. tertius*. These studies will be

particularly helpful in understanding this species in ecological, biological, biogeographical, and phylogenetic terms.

Key Words: Triatominae subfamily, Chapada Diamantina, chromosomal variation

INTRODUCTION

The Triatominae subfamily is composed of 150 species grouped into 18 genera [1]. All triatomine species are bloodsucking and are potential vectors of the protozoan *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, an etiological agent of Chagas disease.

In Brazil, 65 triatomine species have been reported. They are distributed into ten genera: *Alberprosenia* Martínez and Carcavallo, 1977, *Belminus* Stål, 1859, *Cavernicola* Barber, 1937, *Eratyrus* Stål, 1859, *Microtriatoma* (Lent, 1951), *Panstrongylus* Berg, 1879, *Parabelminus* Lent, 1943, *Psammolestes* Bergroth, 1911, *Rhodnius* Stål, 1859, and *Triatoma* Laporte, 1832. With 23 species, the Brazilian state of Bahia has presented the greatest species diversity thus far. It is believed that one of the reasons for this richness in registered species is the variety of biomes and ecoregions in the state, which include the Cerrado, the Caatinga scrubland, and the Atlantic Forest [2].

Chapada Diamantina is located in the center of Bahia State. This region has been the focus of many studies [3,4] because it is considered a refuge for many species [5]. Sherlock and Serafim [6] reported the presence of nice triatomine species in the Chapada Diamantina: *Panstrongylus diasi*, *P. geniculatus*, *P. lutzi*, *P. megistus*, *Triatoma bahiensis*, *T. maculata*, *T. melanocephala*, *T. sordida*, and *T. tibiamaculata*. Forty years later, Souza et al. [7] reported the occurrence of ten triatomine species in the Chapada Diamantina: *P. diasi*, *P. geniculatus*, *P. lutzi*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. infestans*, *T. melanocephala*, *T. lenti*, *T. pseudomaculata*, and *T. sordida*. In other words, in the last forty years, only *T. brasiliensis* was newly reported in the Chapada Diamantina. It is important to note that Sherlock and Serafim [6] misidentified *T. pseudomaculata* as *T. maculata*, since *T. maculata* is a species restricted to the state of Roraima within Brazil [8]. In addition, *T. bahiensis* was found to be synonymous with *T. lenti* [9].

Some triatomine species are associated with bird nests [9]. *Psammolestes tertius* is one of the species with which triatomines have been associated. In most cases, these insects are found living in furnariid nests, particularly in those of the species *Phacellodomus rufifrons* Wied, 1821, *P. ruber* Vieillot, 1817 [10], and *Anumbius annumbi* Vieillot, 1817 [11]. Thus, in order to determine whether this species is present in the Chapada Diamantina of Brazil, active searches of *P. rufifrons* nests were performed in the city of Seabra, Bahia State, Brazil (12°32.449'S and 41°32.896'W), and *P. tertius* specimens were captured.

The triatomines were collected with help from the Central Laboratory for Public Health (LACEN-BA), and the Endemic Disease Control Center in the city of Seabra, Bahia. On an active search in *P. rufifrons* nests made of thorny twigs and hung 1064

meters high (Figure 1), 24 *P. tertius* specimens were collected, five of which were adult females, two of which were adult males, and 17 of which were nymphs. Beetles from the families Cerambycidae, Chrysomelidae, and Curculionidae were also identified around the nests, as were phytophagous hemipterans from the family Lygaeidae.

The *P. tertius* specimens were identified in the Parasitology Laboratory within the Department of Biological Science, part of the School of Pharmaceutical Sciences at São Paulo State University, Araraquara (UNESP/FCFAR) in São Paulo, Brazil. Identification was based on the criteria described previously by Lent and Wygodzinsky [9]. Feces from the specimens were examined. For this examination, the feces samples were diluted in a saline solution and observed under a Leica MZ APO stereomicroscope. No Trypanosomatid forms were found. After the identification, these insects were also cytogenetically analyzed using lacto-aceto orcein techniques [12], with modifications, according to Alevi et al. [13], and also using C-banding [14]. The results were compared to those obtained by Panzera et al. [15] in a study on *P. tertius* from the Brazilian state of Ceará in order to determine whether *P. tertius* exhibits any intraspecific chromosomal variation.

The genus *Psammolestes* Bergroth, 1911 is composed of three species grouped into the Rhodniini tribe: *P. arthuri* (Pinto, 1926), *P. coreodes* Bergroth 1911, and *P. tertius* Lent and Jurberg 1965. *P. arthuri* distribution was found to be restricted to Colombia and Venezuela, while *P. coreodes* was reported in Argentina, Bolivia, Brazil, and Paraguay. *P. tertius* distribution is restricted to Brazil [2].

P. tertius is an exclusively sylvatic species that has not been associated with the transmission of Chagas disease, particularly because of its feeding habits, which are restricted to Chagas-resistant birds. Though the results obtained were negative for infection by *T. cruzi*, this species was found to be infected by the protozoan in nature [9]. The authors report that these flagellates were likely acquired from opossums that were found in abandoned bird nests that were still inhabited by triatomines.

The cytogenetic analyses performed on *P. tertius* revealed that this species does not present intraspecific chromosomal variation, since the specimens from Bahia presented the same characteristics described for the samples from Ceará [15]: 22 chromosomes (20A + XY) (Figure 2A); little variation in autosome size (Figure 2A); Y chromosomes that were larger than X chromosomes (Figure 2A), a chromocenter formed only by X and Y chromosomes during initial prophase (Figure 2B, arrow); and autosomes lacking constitutive heterochromatin, which was restricted to the Y chromosomes (Figure 2C, arrow).

Intraspecific chromosomal variation in the Rhodniini tribe was observed in the case of *R. ecuadoriensis* [16] and *R. pallescens* [17]. As was found with *P. tertius*, *Rhodnius neglectus* presented chromosomal homogeneity among specimens from different Brazilian states [18]. Soares et al. [19] analyzed two *P. tertius* populations through the use of morphometry, isoenzymes, and genetic analyses; they were able to distinguish between specimens from Ceará and specimens from the Brazilian state of Minas Gerais. The authors suggest that these populations have not performed genetic exchanges, largely because they are geographically isolated. Though the results herein did not reflect intraspecific variation, it is important to note that genetic evolution and chromosomal evolution are each guided by very different factors. The events that may lead to variations in DNA sequences are more common than those that lead to chromosomal changes [20].

Thus, the presence of *P. tertius* in the Chapada Diamantina region of Brazil is being described for the first time, keeping in mind that this species presents intraspecific chromosomal homogeneity. Thus, more studies are necessary to characterize this species. These studies will be particularly helpful in understanding this species in ecological, biological, biogeographical, and phylogenetic terms. More studies are also necessary to determine triatomine fauna and their distribution around Brazil, particularly in the case of species from the genus *Psammolestes*.

References:

- 1 - ALEVI KCC, MOREIRA FFF, JURBERG J, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. **Description of diploid chromosome set of *Triatoma pintodiasi* (Hemiptera, Triatominae).** Genetics and Molecular Research (2015A), in press.
- 2 - GALVÃO C. **Vetores da doença de chagas no Brasil.** Sociedade Brasileira de Zoologia (2014), Curitiba, Brasil, 289 pp.
- 3 - FUNCH LS, FUNCH RR, QUEIROZ LP. **Serra do Sincorá, Parque nacional da Chapada Diamantina.** Feira de Santana: ED-Radami (2008).
- 4 - JUNCÁ FA, FUNCH L, ROCHA W. **Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente (MMA) (2008).
- 5 - RODRIGUES-FILHO S, BEHLING H, IRION G, MULLER G. **Evidence for lake formation as a response to an inferred Holocene climatic transition in Brazil.** Quat. Res (2002), 57(1):131-137.
- 6 - SHERLOCK IA, SERAFIM EM. **Fauna Triatominae do Estado da Bahia, Brasil. I. As espécies e distribuição geográfica. VI. Prevalência geográfica e infecção dos triatomíneos por *Trypanosoma cruzi*.** Rev Soc Bras Med Trop (1972), 6: 265-297.
- 7 - SOUZA NS, OLIVEIRA KCS, MOTTA LRL, COSTA NETO EM, GURGEL-GONCALVES R. **DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE TRIATOMÍNEOS (HEMIPTERA, REDUVIIDAE) E AÇÃO ANTRÓPICA NA REGIÃO CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA.** In: I Seminário Internacional de Ecologia Humana, 2012, Paulo Afonso. Anais do Iº Seminário Internacional de Ecologia Humana. Salvador: EDUNEB, 2012. v. 1.
- 8 - GALVÃO C, CARCAVALLO RU, ROCHA DS, JURBERG J. **A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes.** Zootaxa (2003), 202: 1-36.

- 9 - LENT H, WYGODZINSKY P. **Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease.** Bulletin of the American Museum of Natural History (1979), v. 163, p. 123-520.
- 10 - GURGEL-GONCALVES R, CUBA, CAC. **Infestation of thornbird nests (Passeriformes: Furnariidae) by *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae) across Brazilian Cerrado and Caatinga ecoregions.** *Zoologia (Curitiba, Impr.)* 2011, vol.28, n.3, pp. 411-414. ISSN 1984-4670.
- 11 - TURIENZO P, DI IORIO O. **Insects found in birds' nests from Argentina: *Anumbius annumbi* (Vieillot, 1817) (Aves: Furnariidae)** *Zootaxa* (2008), 1871: 1-55.
- 12- DE VAIO ES, GRUCCI B, CASTAGNINO AM, FRANCA ME, MARTINEZ ME. **Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae).** *Genetica* (1985), 67: 185-191.
- 13 - ALEVI KCC, MENDONÇA PP, PEREIRA NP, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. **Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva and Pinto (1923). Does this species fit in the *Brasiliensis* subcomplex?** *Infection, Genetics and Evolution* (2012a) 12: 1652-1653.
- 14 - SUMNER AT. **A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.** *Exp Cell Res* (1972), 75:305-306.
- 15 - PANZERA F, SCVORTZOFF E, PEREZ R, PANZERA Y, HORNOS S, CESTAU R, NICOLINI P, DELGADO V, ALVAREZ F, MAZZELLA MC, COSSIO G, MARTINEZ M, SALVATELLA R **Cytogenetics of Triatomines.** In: CARCAVALLO, R.U. *Atlas of Chagas Disease Vectors in the Americas* (1998), 621–664. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.
- 16 - PITA S, PANZERA F, FERRANDIS I, GALVÃO C, GÓMEZ-PALACIO A, PANZERA Y **Chromosomal divergence and evolutionary inferences in *Rhodnius* based on the chromosomal location of ribosomal genes.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (2013), v. 108, p. 376-382.
- 17 - GOMEZ-PALACIO A, JARAMILLO-OCAMPO N, TRIANA-CHAVEZ O, SALDANÑA AA, CALZADA J, PÉREZ R, PANZERA F. **Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Rhodniini).** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (2008), v. 103, p. 160-164.

18 - ALEVI KCC, RODAS LAC, TARTAROTTI E, AZEREDO-OLIVEIRA MTV, GUIRADO MM Entoepidemiology of Chagas disease in the Western region of the State of São Paulo from 2004 to 2008, and cytogenetic analysis in *Rhodnius neglectus* (Hemiptera, Triatominae). Genetics and Molecular Research (2015), v. 14, p. 5775-5784.

19 - SOARES RP, BARBOSA SE, BORGES EC, MELO JÚNIOR TA, ROMANHA AJ, DUJARDIN JP, SCHOFIELD CJ, DIOTAIUTI L. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, morphometry, isoenzymes, and random amplified polymorphic DNA. Biochem Genetic (2001), Feb;39(1-2):1-13.

20 - ALEVI KCC, NUNES GM, ROSA JA, AZEREDO-OLIVEIRA MTV. Homogeneidade cromossômica em diferentes populações de *Panstrongylus megistus* do Brasil. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada (2015), in press.



Figure 1: *P. tertius* males (A), Map of the Brazilian state of Bahia (B), cities within the Chapada Diamantina region: 1- Morro do Chapéu, 2- Tapiramuta, 3- Bonito, 4- Utinga, 5- Souto Soares, 6- Iraquara, 7- Wagner, 8- Lençóis, 9- Seabra, 10- Ibitiara, 11- Palmeira, 12- Andaraí, 13- Boninal, 14- Novo Horizonte, 15- Piatã, 16- Mucugê, 17- Nova Redenção, 18- Itaetê, 19- Ibicoara, 20- Marcionílio Souza, 21- Abaira, 22- Barra da Estiva, 23- Jussiape, and 24- Rio de Contas (C).

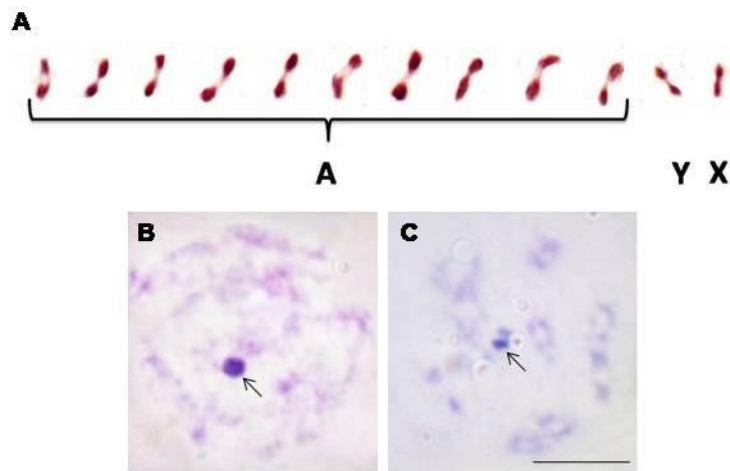


Figure 2. Karyotype (A) and constitutive heterochromatin arrangement (B, C) in *P. tertius*. A: Metaphase I: Note that the species presents 22 chromosomes, little variation in autosome size, and a Y chromosome that is larger than the X chromosome. B: Initial prophase. Note the heterochromatic chromocenter formed by the sex chromosomes (arrow). C: Final prophase. Note that only the Y chromosome is heterochromatic (arrow). Bar scale used: 10 μ m.

Capítulo III (Artigo científico publicado na revista *The American Journal of Tropical Medicine & Higiene*).

SHORT REPORT

Running title: **Study of the salivary glands in Triatominae**

Study of the salivary glands in Triatominae (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): coloration and its applications to the Chagas disease vector evolution

Jader de Oliveira^{1*}, Amanda Ravazi², Eder dos Santos Souza¹, Felipe Ferraz Figueiredo Moreira³, Cleber Galvão⁴, João Aristeu da Rosa¹, Kaio Cesar Chaboli Alevi²

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - Araraquara, Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil

² Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil

³ Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biodiversidade Entomológica, Avenida Brasil 4365, Pavilhão Mourisco – 2º andar, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁴ Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz, LNIRTT/IOC/FIOCRUZ, Pavilhão Rocha Lima, 5º andar, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, RJ, Brasil

***Corresponding author:** Jader de Oliveira, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCFAR – UNESP, Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil. E-mail: jdr.oliveira@hotmail.com. Phone: +55 016 997239464.

Abstract

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and transmitted by feces of triatomine that has the habit of defecating during the blood feeding. The salivary glands of triatomines are important to hematophagy, because the saliva is abundant in proteins anticoagulant and hemolytic. The salivary glands of some *Rhodnius* species analyzed are reddish by presence of nitrophorins (anti-hemostatic activity). Thus the present study aimed to analyze the pattern of coloration of the salivary glands of 67 triatomines species in order to evaluate whether the presence of nitrophorins is a synapomorphy of *Rhodnius*, of the Rhodniini tribe or it is shared with triatomines from the Triatomini and Cavernicolini tribes. Only the species of the tribe Rhoniini present red glands. Thus, we highlight the presence of the nitrophorins proteins as a synapomorphy the Rhodniini tribe and suggest that this tribe has derived more recently when compared with Triatomini and Cavernicolini tribes.

Key Words: taxonomy; tribe Rhodniini; tribe Triatomini; tribe Cavernicolini; nitrophorins

Short Report

The Chagas disease is a potentially life-threatening illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, distributed mainly in endemic areas of 21 Latin American countries, where it is mostly vector-borne transmitted to humans by contact with faeces of triatomines, known as 'kissing bugs'. It is estimated that about 6 million to 7 million people are infected worldwide, mostly in Latin America where Chagas disease is endemic.¹

Currently, there are 151 species of triatomines, distributed in 18 genera and five tribes, being all species considered as potential vector of Chagas disease.^{2,3,4,5} As Chagas disease has no cure and treatment with benznidazole and nifurtimox is effective only in the acute phase of the disease (which is often asymptomatic), vector control is the most effective method of preventing this neglected disease.¹ Thus, all knowledge about these hematophagous insects is important and can generate subsidies to assist the vector control programs.

Though the transmission of *T. cruzi* to the host occurs through the feces of triatomines, the behavior of hematophagy is fundamental to contamination with the protozoan, once the triatomines present the habit of defecate during blood feeding.² It is believed that hematophagy was derived from generalist predators ancestral who initiated the behavior as opportunistic hematophagy, passed for a facultative hematophagy and evolved for mandatory hematophagy.⁶

The salivary glands of triatomines perform a fundamental role during hematophagy, because the saliva is abounds in proteins and anticoagulant and hemolytic enzymes.^{7,8} These structures have been studied anatomically⁹, histologically⁹, biochemically⁷, molecularly¹⁰ and cytogenetically¹¹ based on few triatomines of the genus *Triatoma*, *Rhodnius* and *Panstrongylus*.

Based on the analysis of *R. prolixus* has been suggested that salivary glands (principal glands) of the species of the genus *Rhodnius* is reddish.¹² This characteristic is coming from the presence of nitrophorins.¹² These proteins present a heme group in its molecule (which confer the reddish coloration) are responsible for many anti-hemostatic activity.¹³

Considering that the presence nitrophorins is suggested for all species of the genus *Rhodnius*,¹⁴ and only *R. prolixus*,¹⁴ *R. robustus*,¹⁴ and *R. domesticus*¹⁵ have been studied, the present study aimed to analyze the pattern of coloration of the salivary glands of 67 triatomine species, distributed in ten different genera and grouped into three tribes, in order to evaluate whether the presence of nitrophorins is a synapomorphy of *Rhodnius*, of the tribe Rhodniini or it is shared with triatomines from the Triatomini and Cavernicolini tribes.

Were analyzed at least two adult male specimens of each species (tribe Cavernicolini: *Cavernicola pilosa*; tribe Rhodniini: *Psammolestes tertius*, *P. coreodes*, *P. arthuri*, *Rhodnius brethesi*, *R. colombiensis*, *R. domesticus*, *R. ecuadoriensis*, *R. marabaensis*, *R. milesi*, *R. montenegrensis*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, *R. neivai*, *R. pallescens*, *R. pictipes*, *R. prolixus*, *R. robustus*, *R. stali*, tribe Triatomini:

Dipetalogaster maxima, *Eratyrys cuspidatus*, *Meccus pallidipennis*, *M. longipennis*, *M. picturata*, *M. phylossoma*, *Mepraia spinolai*, *Nesotriatoma bruneri* sn *N. flavida*, *Panstrongylus herreri* sn *P. lignarius*, *P. lignarius*, *P. megistus*, *P. lutzi*, *Triatoma arthurneivai*, *T. bahiensis*, *T. baratai*, *T. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma*, *T. carcavalloi*, *T. circummaculata*, *T. costalimai*, *T. delpontei*, *T. dimidiata*, *T. garciabesi*, *T. guasayana*, *T. guazu*, *T. infestans*, *T. juazeirensis*, *T. jurbergi*, *T. klugi*, *T. lectularia*, *T. lenti*, *T. maculata*, *T. matogrossensis*, *T. melanica*, *T. melanocephala*, *T. petrocchiai*, *T. platensis*, *T. protracta*, *T. pseudomaculata*, *T. pintodiasi*, *T. rubrovaria*, *T. sherlocki*, *T. sordida*, *T. tibiamaculata*, *T. vandae*, *T. vitticeps*, *T. williamsi*, *T. wygodzinskyi*, that were provided by the “Insetário de Triatominae”, from FCFAR/UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil, and by the “Insetário do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos”, from FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. The bugs were dissected, the salivary glands were removed, and examined by stereoscope microscope.

Through the analysis of the salivary glands, it was observed that the species of the tribe Rhoniini present red glands [represented by *P. tertius* (Figure 1A) and *R. montenegrensis* (Figure 1B)]. On the other hand, all other species analyzed exhibited transparent glands [represented by *T. infestans* (Figure 1C)].

It is estimated that the Triatomini and Rhodniini tribes diverged at 48.9-64.4 mya, when South America was already separated from Africa.¹⁶ Recently, it was suggested that the uplift of the Andes in South America and the variations in sea levels in North America are the events involved in the diversification of these tribes.¹⁷ During the diversification of these tribes from the common ancestor, we suggest that nitrophorins hemeproteins appeared (and was selected positively) after the divergence of the tribes, more specifically in the common ancestor of Rhodniini tribe.

Although there is no dating to the divergence of Cavernicolini tribe, recently this tribe was presented as a brother group of Rhodniini.¹⁷ However, the absence of nitrophorins in the salivary glands of *C. pilosa* also allows us to suggest that this tribe derived before Rhodniini tribe. Thus, we suggest that Triatomini tribe derived first, followed by Cavernicolini tribe and lastly the Rhodniini tribe, highlighting the need for studies using molecular clocks in Triatominae with representatives of all the tribes.

Between the anti-hemostatic activities from the nitrophorins, can highlight storage and transport of nitric acid ligated into the center of ferric heme⁸ which promotes vasodilation and inhibition of platelet aggregation when it is released in the microcirculation.¹⁸ Our study demonstrates that the species of Triatomini and Cavernicolini tribe not show this hemeprotein in the composition of salivary glands. Among the few studies that characterize the salivary glands of other genera the Triatomini tribe, the anti-hemostatic substances isolated were: triabin and pallidipin in *M. pallidipennis*,¹⁹ triafestins in *T. infestans*,²⁰ and lipocalin in *T. lectularia*¹⁰ and *P. herreri*.¹⁰

Thus, we highlight the presence of the nitrophorins proteins as a synapomorphy of the Rhodniini tribe and suggest that this tribe has derived more recently when compared with Triatomini and Cavernicolini tribes, contributing to the knowledge of the evolutionary history of this important vector group.

Acknowledgments

The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Process numbers 2013/19764-0, 2013/08826-5, and 2015/11372-1, FAPESP, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

References

1. World Health Organization, 2015. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). *Weekly Epidemiological Record* 90: 33–44.
2. Galvão C, 2014. Vetores da doença de chagas no Brasil. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia.
3. Mendonça VJ, Alevi KCC, Pinotti H, Gurgel-Gongalves R, Pita S, Guerra AL, Panzera F, Araújo RF, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, 2016. Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. *Zootaxa* 4107: 239–254.
4. Alevi KCC, Reis YV, Guerra AL, Imperador CHL, Banho CA, Moreira FFF, Azeredo-Oliveira MTV, 2016. Would *Nesotriatoma bruneri* Usinger, 1944 be a valid species? *Zootaxa* 4103: 396–400.
5. Souza ES, Atzinger NCBV, Furtado MB, Oliveira J, Dameli JN, Vendramini DP, Gardim S, Rosa JA, 2016. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. N. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Pará State, Brazil. *Zookeys*, in press.
6. Schofield CJ, 1988. The biosystematics of Triatominae. Service MW. ed. Biosystematics of Haematophagous Insects, Systematics Association special. Oxford, UK: Clarendon press, 284–312.
7. Hellmann K, Hawkins RI, 1965. Prolixins-S and prolixin-G; two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stal. *Nature* 207: 265–267.
8. Ribeiro JM, Hazzard JM, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA, 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260: 539–541.
9. Lacombe D, 1999. Anatomia e histologia de glândulas salivares de triatomíneos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 557–564.
10. Montandon CE, Barros E, Vidigal PM, Mendes MT, Anê ANBM, Ramos HJO, Oliveira CJF, Mafra C, 2016. Comparative proteomic analysis of the saliva of the *Rhodnius prolixus*, *Triatoma lecticularia* and *Panstrongylus herreri* triatomines reveals a high interspecific functional biodiversity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 71: 83–90.
11. Anê AC, Azeredo-Oliveira MT, 2008. Cytochemical characterization of *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* salivary gland cells (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Micron* 39: 1126–1133.
12. Champagne DE, Nussenzveig RH, Ribeiro JMC, 1995. Purification, partial characterization and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 8691–8695.
13. Montfort WR, Weichsel A, Andersen JF, 2000. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochimica et Biophysica Acta* 1482: 110–118.

14. Soares RPP, Gontijo NF, Romanha AJ, Diotaiuti L, Pereira MH, 1998. Salivary heme proteins distinguish *Rhodnius prolixus* from *Rhodnius robustus* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Acta Tropica* 71: 285–291.
15. Meirelles RM, Rodrigues IS, Steindel M, Soares MJ, 2003. Ultrastructure of the salivary glands of *Rhodnius domesticus* Neiva & Pinto, 1923 (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of submicroscopic cytology and pathology* 35: 199–207.
16. Barges MD, Marcilla A, Ramsey J, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S, 2000. Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 567–573.
17. Justi SA, Galvão C, Schrago CG, 2016. Geological Changes of the Americas and their Influence on the Diversification of the Neotropical Kissing Bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *PLoS Neglected Tropical Disease* 10: e0004527.
18. Ribeiro JMC, Schneider M, Guimaraes JA, 1995. Purification and characterization of Prolixin S (Nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Biochemistry Journal* 308: 243–249.
19. Noeske-Jungblut C, Kratzschmar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P, Schleuning WD, 1994. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *Journal of Biology Chemistry* 269: 5050–5053.
20. Isawa H, Orito Y, Jingushi N, Iwanaga S, Morita A, Chinzei Y, Yuda M. Identification and characterization of plasma kallikrein-kinin system inhibitors from salivary glands of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*. *The FEBS Journal* 274: 4271–4286.

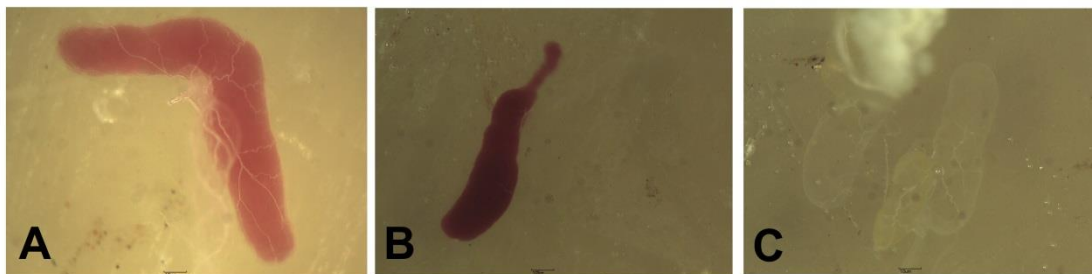


Figure 1. Salivary glands of *P. tertius* (A), *R. montenegrensis* (B) and *T. infestans* (C). Note the red glands in *P. tertius* (A) and *R. montenegrensis* (B) (tribe Rhodniini). Bar = 10 μ m.

Capítulo IV (Artigo científico publicado na revista *The American Journal of Tropical Medicine & Higiene*).

New evidence of the monophyletic relationship of the genus *Psammolestes* Bergroth, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

Jader de Oliveira^{1*}, Kaio Cesar Chaboli Alevi², Amanda Ravazi², Heitor Miraglia Herrera³, Filipe Martins Santos³, Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira² and João Aristeu da Rosa¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araraquara, Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil.

²Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

³Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil.

*Correspondence author: Jader de Oliveira, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araraquara, Rod. Araraquara-Jaú km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil. E-mail: jdr.oliveira@hotmail.com

Abstract

The genus *Psammolestes* within the subfamily Triatominae and tribe Rhodniini comprises the species *P. arthuri*, *P. coreodes* and *P. tertius*, all potential vectors of Chagas disease. A feature of *Psammolestes* is their close association with birds, which makes them an interesting model for evolutionary studies. We analyzed cytogenetically *Psammolestes* spp., with the aim of contributing to the genetic and evolutionary knowledge of these vectors. All species of the *Psammolestes* showed the same chromosomal characteristics: chromocenter formed only by sex chromosomes X and Y, karyotype $2n = 22$ and constitutive heterochromatin and AT base pairs restricted to the sex chromosome Y. These results corroborate the monophyly of the genus and leads to the hypothesis that during the derivation of *P. tertius*, *P. coreodes* and *P. arthuri* from their common ancestor there was no reorganization in the number or structure of chromosomes.

Keywords: cytogenetic, evolution, Rhodniini, wild species.

Short report

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) and transmitted mainly by triatomines¹. Presently, the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) consists of 152 species (150 living species and two fossil ones) distributed in 18 genera and five tribes (Alberproseniini, Bolboderini, Cavernicolini, Rhodniini and tribes Triatomini)², all the species being potential vectors of *T. cruzi*.

The tribe Rhodniini is a monophyletic group³ consisting of two genera with different phenotypes: one with long thin legs and a long head, living mainly in palm trees (genus *Rhodnius* Stål, 1859), and the other having a short head, strong legs, wide femora, a very wide rostrum (the widest in all the subfamily) and living in nests of birds of the family Furnariidae (genus *Psammolestes* Bergroth, 1911)⁴. The genera include 21 species of *Rhodnius* [divided into the groups *pallescens*, *pictipes* and *prolixus*] and three species of *Psammolestes*.^{2,5}

Psammolestes coreodes Bergroth, 1911 is distributed in Argentina (Catamarca, Corrientes, Chaco, Entre Rios, Formosa, Santa Fe, Santiago Del Estero, Salta, Jujuy and Tucumán), Bolivia (Santa Cruz), Brazil (Mato Grosso), Paraguay (Central); *P. tertius* Lent & Jurberg, 1965 is distributed in Brazil (Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Minas Gerais, Para, Paraíba, Pernambuco and São Paulo) and Peru (San Martin) and *P. arthuri* (Pinto, 1926) is distributed in Colombia (Meta) and Venezuela (Aragua, Cojedes, Miranda, Guárico, Portuguesa, Yaracuy, Anzoátegui, Apure, Lara, Táchira, Barinas and Monagas).^{6,7}

Phylogenetic analyses of *P. tertius* and *P. coreodes* suggest that this genus is monophyletic³ (there are no phylogenetic studies of *P. arthuri* in the literature) and presents a phylogenetic relationship with the species of the *prolixus* group³, which led to suggest the inclusion of the genus *Psammolestes* in the genus *Rhodnius*.⁸ Monteiro et al.³ suggest that perhaps *Psammolestes* should be regarded as a specialized lineage from the *prolixus* group of *Rhodnius*, because the genus *Psammolestes* and species of the *prolixus* group share a common ancestral, which highlights the paraphyly of the genus *Rhodnius*⁵.

Based on mitochondrial DNA data presented by Monteiro et al.³, Soares et al.⁹ suggest that *Psammolestes* has derived from a form similar to *R. robustus*. In addition,

the authors suggest that these triatomines spread from the Amazon region northward into the llanos of Venezuela, where *P. arthuri* is now abundant in furnariidae nests, and southeastward into the caatinga-cerrado path of Central Brazil. Furthermore, as predicted by Schofield and Dujardin¹⁰ the authors suggest subsequent differentiation of *P. tertius* along a north–south cline, from the larger specimens of the northeastern caatinga region to the smaller individuals of the central cerrado. According to them, the third species of the genus, *P. coreodes*, from the Chaco region of Argentina and Paraguay, may represent the southernmost differentiation of these descending populations.

Cytogenetic studies on the genus *Psammolestes* started in 1950 with the description of the karyotype of *P. coreodes*¹¹. After 48 years the karyotype of *P. tertius* was described¹² and in 2012 the constitutive heterochromatin pattern of the species was characterized by Panzera et al.¹³ (Table 1). In addition, a more recent cytogenetic study comparing *P. tertius* of different Brazilian states (Bahia and Ceará) was performed and showed absence of intraspecific chromosome variation¹⁴. The present work seeks to characterize the karyotype evolution and the chromatin composition of the species of the genus *Psammolestes*, with the aim of contributing to the genetic and evolutionary knowledge of these potential vectors.

Five adult males of each species were used for cytogenetic analysis. The wild species considered herein were *P. tertius* [Castro Alves, Bahia, Brazil], *P. coreodes* [Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brazil] and *P. arthuri* [Maracay, Aragua, Venezuela], all of them being from the field. The seminiferous tubules were torn apart, crushed and fixed on slides in liquid nitrogen. The cytogenetic technique of Lacto-Acetic Orcein^{15,16} and C-banding¹⁷ were applied for description of karyotype, characterization of meiosis and description of heterochromatin pattern, respectively. Then the cytogenomic

technique of CMA₃/DAPI banding was applied Schmid¹⁸ with the modifications provided by Severi-Aguiar et al.¹⁹ to differentiate the heterochromatin regions rich in AT and CG. The biological material was analyzed using a Jenaval light microscope (Zeiss) and Olympus BX-FLA fluorescence microscope.

All species of the genus *Psammolestes* presented the same chromosomal characteristics, namely chromocenter formed only by sex chromosomes X and Y during the prophase (Fig. 1a-c), euchromatic autosomes and sex chromosomes X and heterochromatic sex chromosome Y (Fig. 1d-f), sex chromosome X rich in CG (Fig. 1g-i) and Y rich in CG (Fig. 1j-l), and karyotype $2n = 22$ (Fig. 1m-o). These characteristics confirm the data already described in the literature (Table 1) and corroborate the monophyly of this genus.

The karyotype $2n = 22$ is present in all species of the tribe Rhodniini^{20,21}. This karyotype is the same number of chromosomes as the ancestor of Triatominae¹⁷ which indicates that the genomic reorganization events that occurred during the evolution of the tribe Rhodniini did not lead to numerical alterations in the chromosomes, unlike what happened to the tribe Triatomini, which presents karyotypes ranging from $2n = 21$ to 25.^{22,23}

Chromocenter formed only by sex chromosomes X and Y is also shared with the species of *Rhodnius*^{13,24}, which demonstrates that this meiotic behavior is present in all species of the tribe Rhodniini. In the tribe Triatomini there are species with the pattern described for *Psammolestes* and species that present union of autosomes with sexual chromosomes in the formation of the chromocenter²⁵. This meiotic behavior can be used as a taxonomic tool to group related species. For example, all species of the *T. brasiliensis* complex present chromocenter formed by the sex chromosomes plus a pair

of autosomes [characteristics that make it possible to differentiate seven species in this complex from all other triatomine complexes²⁶.

With the exception of *R. colombiensis* Mejia, Galvão & Jurberg, 1999, *R. nasutus* Stål, 1859, *R. pallescens* Barber, 1932, *R. pictipes* and *R. taquarussuensis* Rosa et al. 2017^{21,27} all *Rhodnius* species also have constitutive heterochromatin restricted to the sex chromosome Y, as well as observed in *Psammolestes* spp. The distribution pattern of constitutive heterochromatin is extremely important for the taxonomy of Triatominae, being one of the main tools used in the description of the last species of the tribe Rhodniini, namely *R. taquarussuensis*²¹. In addition, the three species of the genus *Psammolestes* showed the same DNA composition rich in AT and CG.

Heterochromatin loss/reorganization in AT and CG composition could have occurred during the speciation of *Psammolestes* spp, as observed for the species of the group *pallescens*²⁸. However, considering that the ancestor of *P. tertius*, *P. coreodes* and *P. arthuri* was similar to *R. robustus* Larrousse, 1927 (which does not present heterochromatin in the autosomes either, only in the sexual chromosome Y²⁷) and especially the degree of specialization of these species during their evolution (they inhabit only bird nests), it can be stated that the species maintained the genetic material without chromosomal changes.

The cytogenetic characteristics analyzed indicate chromosomal homogeneity in the genus *Psammolestes*, which corroborates the monophyletic feature of the genus and suggests that during the derivation of *P. tertius*, *P. coreodes* and *P. arthuri* from the common ancestor there was no reorganization in the number or structure of chromosomes.

Funding

The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (process number 2013/19764-0 and 2015/11372-1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

Acknowledgments

We appreciate Dr. Wilma Savini and Jose Manuel Ayala for to support in the Venezuela and Central Laboratory of Public Health - Professor Gonçalo Moniz (LACEN - BA) for field support in Bahia.

References

- 1 - World Health Organization, 2015. Chagas disease (American trypanosomiasis). *Week Epidemiol Rec* 90: 33–44.
2. Oliveira J, Alevi KCC, 2017. Taxonomic status of *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 and the number of Chagas disease vectors. *Rev Soc Bras Med Trop* 50: 434–435.
3. Monteiro FA, Wesson DM, Dotson EM, Schofield CJ, Beard CB, 2000. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 62: 460–465.
4. Lent H, Wygodzinsky P, 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas's disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 123–520.
5. Justi S, Galvão C, 2017. The evolutionary origin of diversity in Chagas Disease vectors. *Trends Parasitol* 33: 42–52.

- 6 - Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J, 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1–36.
- 7- Cabrera R, 2006. Notas breves sobre *Psammolestes tertius* Bergroth, 1911 (Reduviidae: Hemiptera): un triatomino silvestre. *An Fac Med Lima* 67: 345–365.
8. Hypsa V, Tietz D, Zrzavy J, Rego RO, Galvão C, Jurberg J, 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol* 23: 447–457.
9. Soares RPP, Barbosa SE, Borges EC, Melo Júnior TA, Romanha AJ, Dujardin JP, Schofield CJ, Diotaiuti L, 2001. Genetic studies of *Psammolestes tertius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using male genital morphology, morphometry, isoenzymes, and random amplified polymorphic DNA. *Biochem Genet* 39: 1–13.
10. Schofield CJ, Dujardin JP, 1999. Theories on the evolution of *Rhodnius*. *Actual Biol* 21: 183–197.
11. Schreiber G, Pellegrino J, 1950. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione; ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici. *Sci Genet* 3: 215–226.
12. Panzera F, Scvortzoff E, Pérez R, Panzera Y, Hornos S, Cestau R, Nicolini P, Delgado V, Alvarez F, Mazella MC, Cossio G, Martinez M, Salvatella R, 1998. Cytogenetics of Triatomines. Carcavallo RU, Galíndez-Girón I, Jurberg J, Lent H, eds. *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 621–664.

13. Panzera Y, Pita S, Ferreiro MJ, Ferrandis I, Lages C, Perez R, Silva AE, Guerra M, Panzera F, 2012. High dynamics of rDNA cluster location in kissing bug holocentric chromosomes (Triatominae, Heteroptera). *Cytogenet Genome Res* 138: 56–67.
14. Oliveira J, Alevi KCC, Fonseca EO, Souza OM, Santos CG, Azeredo-Oliveira MTV, Rosa JA, 2016. New record and cytogenetic analysis of *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Bahia State, Brazil. *Gen Mol Res* 15: 1–6.
15. De Vaio ES, Grucci B, Castagnino AM, Franca ME, Martinez ME, 1985. Meiotic differences between three triatomine species (Hemiptera:Reduviidae). *Genetica* 67: 185–191.
- 14 - Sumner AT, 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 305–306.
16. Alevi KCC, Mendonça PP, Pereira NP, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2012. Karyotype of *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto (1923). Does this species fit in the Brasiliensis subcomplex? *Infect Genet Evol* 12: 1652–1653.
17. Sumner AT, 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 305–306.
18. Schmid M, 1980. Chromosome banding in amphibia IV. Differentiation of GC and AT rich regions in Anura. *Chromosoma* 77: 83–103.
19. Severi-Aguiar GD, Lourenço LB, Bicudo HE, Azeredo-Oliveira MTV, 2006. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps* (Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126: 141–151.
20. Alevi KCC, Ravazi A, Mendonça VJ, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2015. Karyotype of *Rhodnius montenegrensis* (Hemiptera, Triatominae). *Gen Mol Res* 12: 222–226.

21. Rosa JA, Justino HHG, Nascimento JD, Mendonça VJ, Rocha CS, Carvalho DB, Falcone R, Azeredo-Oliveira MTV, Alevi KCC, Oliveira J, 2017. A new species of *Rhodnius* from Brazil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *ZooKeys* 675: 1–25.
22. Ueshima N, 1966. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97–122.
23. Alevi KCC, Oliveira J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2018. Karyotype evolution of Chagas disease vectors (Hemiptera, Triatominae). *Am J Trop Med Hyg*, in press.
24. Perez R, Panzera Y, Scafiezzo S, Mazzella M, Panzera P, Dujardin JP, Scvortzoff E, 1992. Cytogenetics as a tool for triatominae species distinction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 353–361.
25. Alevi KCC, Nascimento JGO, Moreira FFF, Jurberg J, Azeredo-Oliveira MTV, 2016. Cytogenetic Characterisation of *Triatoma rubrofasciata* (De Geer) (Hemiptera, Triatominae) spermatocytes and its cytotaxonomic application. *Afr Entomol* 24: 257–260.
26. Alevi KCC, Oliveira J, Moreira FFF, Jurberg J, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2015. Chromosomal characteristics and distribution of constitutive heterochromatin in the Matogrossensis and Rubrovaria subcomplexes. *Infect Genet Evol* 33: 158–162.
27. Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F, 2002. Los vectores de la enfermedad de Chagas. Bruxelles: Académie Royale des Sciences D’Outre-Mer.
28. Alevi KCC, Ravazi A, Franco-Bernardes MF, Rosa JA, Azeredo-Oliveira MTV, 2015. Chromosomal evolution in the *pallescens* group (Hemiptera, Triatominae). *Gen Mol Res* 14: 12654–12659.

Table 1 - Cytogenetic characteristics of species of the genus *Psammolestes*.

Species	Karyotype	Meiosis	C-Banding	CMA ₃ /DAPI
---------	-----------	---------	-----------	------------------------

		Chromocenter	A	X	Y	A	X	Y
<i>P. arthuri</i>	2n = 22 (20A + XY)	XY	-	-	+	-	CMA ⁺	DAPI ⁻
<i>P. coreodes</i>	2n = 22 (20A + XY) ¹	XY	-	-	+	-	CMA ⁺	DAPI ⁻
<i>P. tertius</i>	2n = 22 (20A + XY) ^{2,4}	XY ³	-	-	+ ^{3,4}	-	CMA ⁺	DAPI ⁻

⁹Schreiber and Pellegrino (1950); ¹⁰Panzer et al. (1998); ¹¹Panzer et al. (2012); ¹²Oliveira et al. (2016)

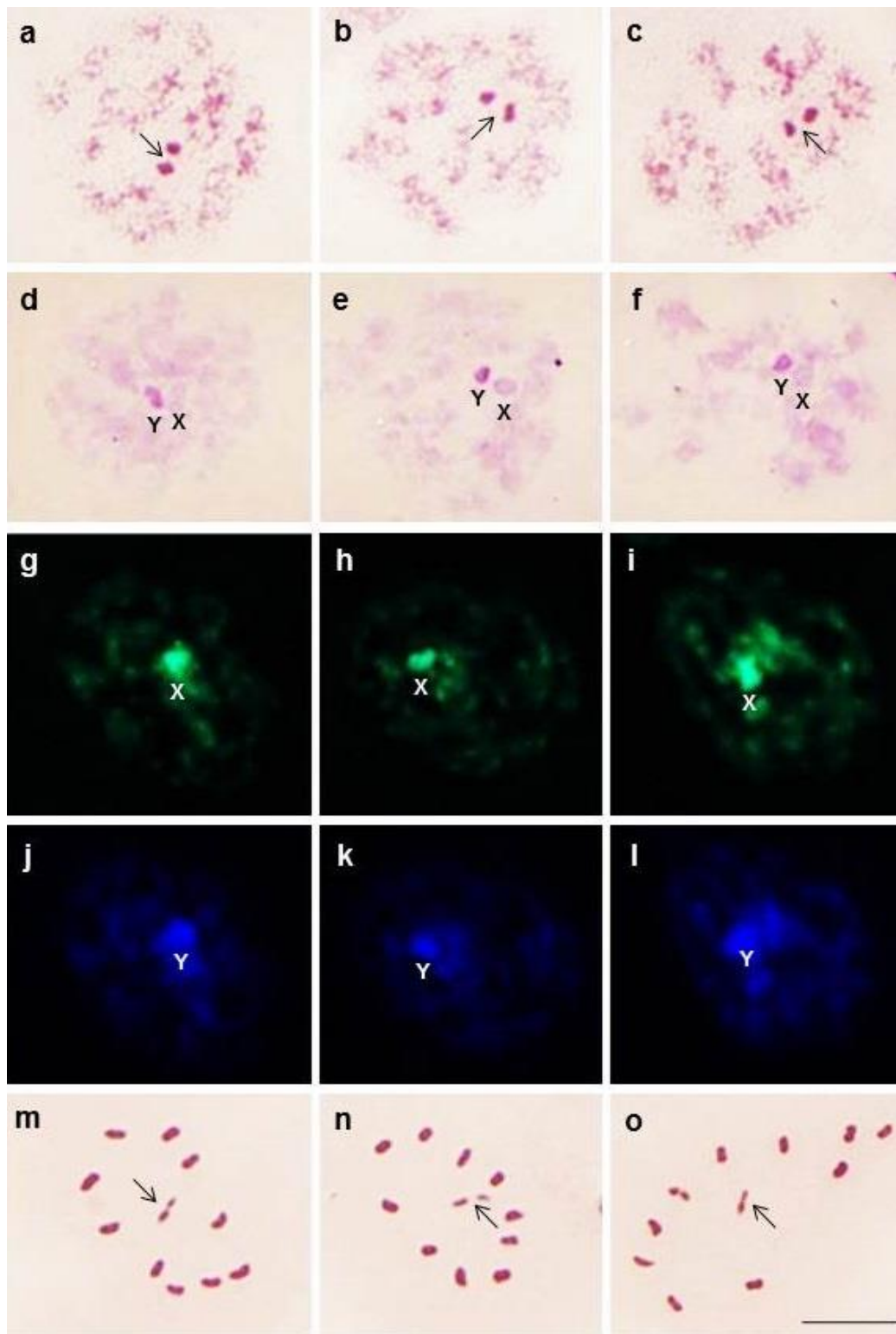


Fig. 1 Cytogenetics analyses of *Psammolestes* spp. Note the X and Y sex chromosomes forming the chromocenter of *P. tertius* (**a**, **arrow**), *P. coreodes* (**b**, **arrow**), and *P. arthuri* (**c**, **arrow**). Note that the autosomes and X chromosome are euchromatic and Y is heterochromatic in *P. tertius* (**d**), *P. coreodes* (**e**), and *P. arthuri* (**f**). Note that the X chromosome is rich in CG (**g-i**) and the Y chromosome is rich in AT (**j-l**) and the karyotype is $2n = 22 (20A + XY)$

(**m-o**) for *P. tertius* (**g, j, m**), *P. coreodes* (**h, k, n**), and *P. arthuri* (**i, l, o**). X: X sex chromosome, Y: Y sex chromosome. *Scale-bar*: 10 μ m.

Anexo

Licença para realização das coletas e transporte em território nacional.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 50299-1	Data da Emissão: 21/08/2015 11:17	Data para Revalidação*: 19/09/2016
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Jader de Oliveira	CPF: 382.454.058-41
Título do Projeto: Estudo citogenético, molecular, morfométrico e morfológico de espécies do gênero <i>Psammolestes</i> Bergroth, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae).	
Nome da Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas	CNPJ: 48.031.918/0025-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Triatomíneos	10/2015	01/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/icgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DADAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da Infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Solicita-se que o pesquisador, de acordo com o Plano de Manejo do Parque Nacional da Chapada Diamantina (PNCD), encaminhe à Sede Administrativa desta Unidade um texto, escrito de forma didática e acessível ao grande público, com informações que considerer mais pertinentes (fisiologia, biologia, ecologia, etc.) referentes aos organismos objeto de sua pesquisa, com ilustrações e/ou fotos das mesmas, objetivando a divulgação e sensibilização da sociedade acerca da biodiversidade existente no PNCD. O pesquisador deverá contactar a Sede do PNCD (pamadamantina@yahoo.com.br ; telefone (75) 3332-2310) antes do início das atividades de campo, para informar seu cronograma e itinerário. Finalmente, as publicações geradas deverão ser encaminhadas, preferencialmente por meio eletrônico, ao PNCD.
2	1) Fazer contato com a administração do Parque Nacional do Pantanal Matogrossense (pamapantanal@icmbio.gov.br) com pelo menos 30 dias antes das expedições de campo. 2) A UC oferece alojamento e, quando possível, um servidor para apresentar a área da UC aos pesquisadores.

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	GUIABA	MT	Guiaba	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 41545758



Página 1/4