



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – CÂMPUS DE BOTUCATU (IBB/UNESP)
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA)

Denis Vinícius de Mello

**Entomoepidemiologia da doença de Chagas no Nordeste brasileiro:
desenvolvimento de chaves de identificação com dados citogenéticos
para os triatomíneos notificados em áreas de surto de transmissão oral**

Botucatu

2023

Denis Vinícius de Mello

**Entomoepidemiologia da doença de Chagas no Nordeste brasileiro:
desenvolvimento de chaves de identificação com dados citogenéticos
para os triatomíneos notificados em áreas de surto de transmissão oral**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia), junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

Orientador: Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mello, Denis Vinícius de.

Entomoepidemiologia da doença de Chagas no Nordeste brasileiro : desenvolvimento de chaves de identificação com dados citogenéticos para os triatomíneos notificados em áreas de surto de transmissão oral / Denis Vinícius de Mello. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Kaio Cesar Chaboli Alevi

Capes: 20405006

1. Chagas, Doença de. 2. Barbeiros (Inseto).
3. Triatominae. 4. Análise citogenética. 5. Zoologia - Classificação.

Palavras-chave: Chave dicotômica; CytoKey; Taxonomia; Triatominae.

Denis Vinícius de Mello

**Entomoepidemiologia da doença de Chagas no Nordeste brasileiro:
desenvolvimento de chaves de identificação com dados citogenéticos
para os triatomíneos notificados em áreas de surto de transmissão oral**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Zoologia), junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

Comissão examinadora

Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi
IOC/FIOCRUZ
Orientador

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
IBILCE/UNESP

Profa. Dra. Lilian Castiglioni
FAMERP

Botucatu

2023

Dedicatória

Dedico esta conquista aos meus amados pais Dona Vanda Helena da Silva Mello e Sr. Francisco Silvério de Mello, que são meus apoiadores, meus exemplos e simplesmente pessoas que amo muito. À minha avó Clélia Mello, primo Silvio Bueno, tios e tias Roberto e Juvenal da Silva, Gonsalina, Orivaldo e Aparecida da Silva, todos falecidos, mas muito amados e suas lembranças me ajudam a sempre seguir em frente. Aos meus amigos e amigas Antônio Flaviano, Luiz Negretti e Thatiana Freire, Rodrigo Capra, Fernando Silva e Amanda Valério, por suas amizades e incentivos. Aos amigos do Atletismo, em especial ao amigo Valdivino Vinicius, cuja luta pelo câncer ainda tão jovem, foi uma inspiração e sua recente partida deixará muitas saudades. Finalmente, dedico este trabalho especialmente ao meu filho Theo Bruno de Mello, pois você é o maior presente que a vida poderia me dar e por todo o amor que eu sinto por você.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida e fortaleza e, especialmente, aos meus pais, Sr. Francisco Silvério de Mello e Dona Vanda Helena da Silva Mello, por darem a mim a base educacional, bem como os incentivos iniciais com livros, enciclopédias e revistas que me fizeram despertar o amor pelos insetos e pela Biologia em si. A eles também meu profundo amor e admiração. Grato, também, à minha mulher, Gisele Mello, pela sua compreensão nessa fase. À Dra. Erika Hingst-Zaher, por ter me dado à chance de começar a trabalhar no Instituto Butantan, local no qual minha paixão por insetos e aves tomou dimensões maiores e importantes em minha vida, me ajudando a ingressar em uma nova graduação, e ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Ernesto Candia-Gallardo, por me aceitar e guiar como seu orientado na graduação. Aos estimados docentes da USP, Prof. Dr. André Simões e Prof. Dr. Fernando Carbayo, os quais mui gentilmente propiciaram-me a oportunidade de realizar o estágio docência a graduandos na EACH USP. À minha instrutora de carreira, Andrea Trench, por me direcionar nas minhas carreiras profissional e acadêmica, a Seção de Pós-Graduação e corpo docente da UNESP Botucatu, pela transferência de conhecimento e contínuo suporte, bem como aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES, CNPq e FAPERJ pelo financiamento do projeto de pesquisa e da taxa de publicação do artigo científico resultante da dissertação de Mestrado. Agradeço profundamente ao meu orientador no Mestrado, o Prof. Dr. Kaio Cesar Chaboli Alevi, por me aceitar e incentivar como seu orientando no Mestrado, mesmo sabendo de minhas limitações e atribuições como pai, profissional de tecnologia, atleta e marido. Por fim, agradeço ao meu maravilhoso filho Theo Bruno de Mello, que veio e deu novo sentido à minha vida e ressignificou o que sinto e chamo de amor. Sua tenra paixão por animais e plantas, especialmente artrópodes e dinossauros, me tornam um pai ainda mais orgulhoso, feliz e esperançoso de que será um adulto que fará diferença no mundo pelo seu amor aos animais.

“Therefore, since we are surrounded by so great a cloud of witnesses, let us also lay aside every weight, and in which clings so closely, and let us run with endurance the race that is set before us.”

Hebrews 12:1

Resumo

A doença de Chagas (DC) é uma enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida, principalmente, pelas fezes/urina dos triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*. Os casos mais recentes de DC no Brasil ocorreram por infecção oral, a partir do consumo acidental de alimentos contaminados pelo *T. cruzi* (alimentos *in natura* que foram triturados/processados junto com triatomíneos infectados), acarretando, por exemplo, na notificação de 27 contaminados em Pernambuco (PE) e 18 contaminados e dois mortos no Rio Grande do Norte (RN). Até o momento, 13 espécies de triatomíneos foram notificadas em PE e nove no RN. A correta identificação desses vetores auxilia diretamente nas atividades dos programas de controle, permitindo que as espécies de importância primária sejam priorizadas durante as vigilâncias epidemiológicas. Embora as chaves dicotômicas baseadas em dados morfológicos sejam de extrema importância para a taxonomia desses vetores, eventos de plasticidade fenotípica e especiação críptica resultaram na proposta de chaves alternativas, baseadas em dados citogenéticos. Com base no exposto, desenvolvemos chaves dicotômicas para auxiliar na identificação das espécies de triatomíneos dos estados de PE e RN, a partir de dados citogenéticos. Todas as espécies puderam ser diferenciadas pelas características citogenéticas, ressaltando a importância das chaves taxonômicas desenvolvidas para a correta identificação dos triatomíneos do PE e RN, com destaque para as espécies que apresentam semelhanças morfológicas (como *Triatoma brasiliensis* e *T. petrocchiae*) e espécies que já foram identificadas de forma errada (*T. pseudomaculata* já foi identificada como *T. maculata* em ambos os estados). Essas chaves alternativas poderão auxiliar a comunidade científica e, principalmente, os sanitaristas, evitando que novos equívocos ocorram na identificação dos vetores presentes nesses estados que se destacaram pelos surtos de DC por infecção oral.

Palavras-chave: Triatominae; taxonomia; CytoKey; chave dicotômica

Abstract

Chagas disease (CD) is a disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and transmitted mainly by the feces/urine of triatomines infected with *T. cruzi*. The most recent cases of CD in Brazil occurred due to oral infection, from the accidental consumption of food contaminated by *T. cruzi* (in natura foods that were crushed/processed together with infected triatomines), resulting, for example, in the notification of 27 contaminated in Pernambuco (PE) and 18 infected and two dead in Rio Grande do Norte (RN). So far, 13 species of triatomines have been notified in PE and nine in RN. The correct identification of these vectors directly helps in the activities of the control programs, allowing the species of primary importance to be prioritized during epidemiological surveillance. Although dichotomous keys based on morphological data are extremely important for the taxonomy of these vectors, events of phenotypic plasticity and cryptic speciation resulted in the proposal of alternative keys, based on cytogenetic data. Based on the above, we developed dichotomous keys to help identify triatomine species from the states of PE and RN, based on cytogenetic data. All species could be differentiated by cytogenetic characteristics, emphasizing the importance of the taxonomic keys developed for the correct identification of triatomines from PE and RN, with emphasis on species that present morphological similarities (such as *Triatoma brasiliensis* and *T. petrocchiae*) and species that already were misidentified (*T. pseudomaculata* has been identified as *T. maculata* in both states). These alternative keys will be able to help the scientific community and, mainly, sanitarians, preventing new mistakes from occurring in the identification of vectors present in these states that stand out for CD outbreaks due to oral infection.

Keywords: Triatominae; taxonomy; CytoKey; dichotomous key

Sumário

Resumo.....	08
Abstract.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. RESULTADOS.....	13
3.1 Artigo científico.....	14
3.2 Capítulo de livro.....	23
4. CONCLUSÃO.....	35
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), que atinge cerca de oito milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2021), ocasionando, aproximadamente, 10 mil mortes por ano (WHO, 2021). De forma geral, a DC é caracterizada por atingir populações com maior vulnerabilidade social, que vivem em condições de saneamento básico inadequado e, principalmente, que vivem em contato muito próximo com os triatomíneos (insetos hematófagos capazes de se infectar e transmitir o *T. cruzi*) (FUENTES-VICENTE et al., 2018).

Embora existam diferentes formas de contaminação [como via oral, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e congênita (COURA, 2015; WHO, 2021)], a vetorial, pelas fezes/urina dos triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*, é considerada como a principal forma de transmissão da DC nas Américas (WHO, 2021). Atualmente, existem 157 espécies descritas na subfamília Triatominae (sendo 154 espécies vivas e três espécies fósseis), agrupadas em 18 gêneros e cinco tribos (ALEVI et al., 2021; GIL-SANTANA et al., 2022; OLIVEIRA CORREIA et al., 2022). Apesar de existirem espécies com maior ou menor grau de importância na transmissão da DC, todos os triatomíneos, de ambos os sexos e em qualquer fase do desenvolvimento após a eclosão (N1, N2, N3, N4, N5 e adultos), são considerados como potenciais vetores dessa doença negligenciada.

Os casos mais recentes de DC no Brasil ocorreram por infecção oral, a partir do consumo acidental de alimentos contaminados com *T. cruzi* (COURA, 2015). Esses surtos ocorreram porque triatomíneos infectados foram triturados/processados junto com alimentos consumidos *in natura* (como caldo de cana e açaí) (SHIKANAI-YASUDA et al., 1991). No período entre 1968 a 2000, 50% dos casos agudos da DC na região Amazônica, por exemplo, foram atribuídos à transmissão oral (BENCHIMOL-BARBOSA, 2006) e, entre 2000 e 2010,

a taxa chegou a 70% (SHIKANAI-YASUDA e CARVALHO, 2012). Além disso, casos de infecção oral foram registrados recentemente no nordeste brasileiro: em Pernambuco (PE), por exemplo, 27 pessoas foram notificadas com DC após comparecerem ao mesmo evento religioso (SAMPAIO et al., 2020); já no Rio Grande do Norte (RN), 18 casos de contaminação e duas mortes ocorreram após consumo de alimento contaminado com o parasito (VARGAS et al., 2018).

Até o momento, 13 espécies foram notificadas em PE [*Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811), *P. lutzi* Neiva & Pinto, 1926, *P. megistus* Burmeister, 1835, *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965, *Rhodnius nasutus* Stal, 1859, *R. neglectus* Lent, 1954, *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911, *T. melanocephala* Neiva & Pinto, 1923, *T. petrocchiae* Pinto & Barreto, 1925, *T. pseudomaculata* Corrêa & Spínola, 1964, *T. rubrofasciata* (De Geer, 1773), *T. sordida* (Stål, 1859) e *T. tibiamaculata* (Pinto, 1926)] e nove espécies foram notificadas no RN [*P. lutzi*, *P. megistus*, *P. tertius*, *R. nasutus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. petrocchiae*, *T. pseudomaculata* e *T. rubrofasciata*] (GALVÃO, 2014; SILVA et al., 2016; da SILVA et al., 2018). A correta identificação desses insetos auxilia diretamente nas atividades dos programas de controle de vetores, permitindo que as espécies de importância primária sejam priorizadas durante as vigilâncias epidemiológicas (CARCAVALLO et al., 2000).

Até o ano de 2019, as principais chaves de classificação se fundamentavam em chaves dicotômicas baseadas em dados morfológicos (LENT e WYGODZYNSKY, 1979; GALVÃO, 2014). Com base em eventos que inviabilizam a utilização de caracteres fenotípicos (como plasticidade fenotípica e especiação críptica), chaves dicotômicas alternativas foram propostas: Borsatto et al. (2019a,b) desenvolveram chaves de identificação para triatomíneos dos estados de Alagoas, Amapá, Ceará, Roraima, Santa Catarina e São Paulo, a partir de dados citogenéticos (como número de cromossomos, padrões cromossômicos de bandamento

C e CMA₃/DAPI e distribuição do DNAr nos cromossomos).

Recentemente, Oliveira et al. (2021) notificaram, pela primeira vez, *T. infestans* (Klug, 1834) no estado do Espírito Santo e desenvolveram uma chave atualizada para os triatomíneos notificados no estado a partir de dados citogenéticos. Além disso, Britz et al. (2021) realizaram um estudo entomoepidemiológico de *T. sordida* no Paraguai e apresentaram uma chave baseada em dados citogenéticos para todas as espécies de triatomíneos do país.

2. OBJETIVOS

Com base no exposto, desenvolvemos chaves dicotômicas para auxiliar na identificação das espécies de triatomíneos dos estados de PE e RN, a partir de dados citogenéticos.

3. RESULTADOS (apresentados na forma de artigo científico e capítulo de livro)

3.1 Artigo científico aceito para a revista internacional *Tropical Medicine and Infectious Disease* (FI 3,71)

MELLO, D.V.; NHAPULO, E.F.; CESARETTO, L.P.; ALEVI, J.J.; CRISTAL, D.C.; MONTANARI, G.; GALVÃO, C.; ALEVI, K.C.C. Dichotomous keys based on cytogenetic data for triatomines reported in Brazilian regions with outbreaks of orally transmitted Chagas disease (Pernambuco and Rio Grande do Norte). *Tropical Medicine And Infectious Disease*, 2023, *in press*.



Communication

Dichotomous Keys Based on Cytogenetic Data for Triatomines Reported in Brazilian Regions with Outbreaks of Orally Transmitted Chagas Disease (Pernambuco and Rio Grande Do Norte)

Denis Vinícius de Mello ¹, Emercio Felisberto Nhapulo ², Laura Poloto Cesaretto ¹, Julia Junqueira Alevi ¹, Daniel Cesaretto Cristal ¹, Giulia Montanari ¹, Cleber Galvão ^{3,*} and Kaio Cesar Chaboli Alevi ^{1,2,3}

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências, Rua Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Júnior, 18618-689, Botucatu, Brazil; denis.mello@alumni.usp.br (D.V.d.M.); lauracessretto@icloud.com (L.P.C.); juliaalevi6@gmail.com (J.J.A.); daniel.cristal@hotmail.com (D.C.C.); giuliamontanari@hotmail.com (G.M.); kaiochaboli@hotmail.com (K.C.C.A.)

² Laboratório de Entomologia em Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 715, 01246-904, São Paulo, Brazil; emergionhapulo@usp.br

³ Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Pavilhão Rocha Lima, sala 505, 21040-360, Rio de Janeiro, Brazil

* Correspondence: clebergalvao@gmail.com

Abstract: Chagas disease (CD) affects about eight million people worldwide. Brazil has the highest number of estimated cases and the largest number of deaths due to CD. Considering the recent outbreaks of oral CD involving at least 27 cases of acute CD in Pernambuco (PE) as well as 18 cases and 2 deaths in the Rio Grande do Norte (RN), we developed dichotomous keys for the identification of triatomine species in these Brazilian states based on cytogenetic data. All triatomine species could be distinguished by cytogenetic characteristics, emphasizing the importance of the newly developed taxonomic keys for the correct identification of triatomines from PE and RN, particularly for species that exhibit morphological similarities, such as *Triatoma brasiliensis* and *T. petrocchiae* (present in both states) and *T. maculata* and *T. pseudomaculata* (as *T. pseudomaculata* has been misidentified as *T. maculata* in PE and RN). These alternative keys are expected to provide a useful tool for the scientific community and, above all, health agents, aimed at preventing mistakes from occurring in the identification of the vectors present in PE and RN related to CD outbreaks caused by oral infection.

Keywords: triatominae; taxonomy; cytokey

Citation: de Mello, D.V.; Nhapulo, E.F.; Cesaretto, L.P.; Alevi, J.J.; Cristal, D.C.; Montanari, G.; Galvão, C.; Alevi, K.C.C. Dichotomous Keys Based on Cytogenetic Data for Triatomines Reported in Brazilian Regions with Outbreaks of Orally Transmitted Chagas Disease (Pernambuco and Rio Grande Do Norte). *Trop. Med. Infect. Dis.* **2023**, *8*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: 26 December 2022

Revised: 2 February 2023

Accepted: 3 February 2023

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chagas disease (CD) (also referred to as American trypanosomiasis) is a neglected disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) that affects about eight million people worldwide (although an estimated 70 million people are at risk of infection), resulting in approximately 10,000 deaths per year [1–3]. This disease is found mainly in endemic areas of 21 continental Latin American countries (where it kills more people each year than any other parasite-borne disease, including malaria [3,4]), although increasing cases have been reported in Canada and the United States of America, as well as in many European and some African, Eastern Mediterranean, and Western Pacific countries [1–3].

Brazil has the highest number of estimated cases and the largest number of deaths due to CD (7903 in 1990 and 6523 in 2019) [5]. CD can be transmitted by congenital transmission (transplacental), blood transfusions, organ transplantation, accidental laboratory exposure by triatomine vectors (Hemiptera: Triatominae), orally through breastfeeding, by the consumption of raw or undercooked meat from wild animals contaminated with *T. cruzi*, and by consumption of food that is contaminated with feces/urine from triatomines infected with the protozoan (such as juices and fruit pulp consumed in natura) [2]; the latter form of transmission is currently recognized as the main source of infection (especially in the Brazilian Amazon) [6,7]. However, it is worth mentioning that cases of oral transmission do not rule out the importance of triatomines, as food is often contaminated with *T. cruzi* from the intestines of insects [1].

The Triatominae subfamily comprises 157 species; all 154 living species are considered to be potential CD vectors [8–10]. More than 60 species are present in Brazil, including species belonging to the genera *Alberprosenia* Martínez & Carcavallo, 1977; *Belminus* Stål, 1859; *Microtriatoma* Prosen & Martínez, 1952; *Parabelminus* Lent, 1943; *Cavernicola* Barber, 1937; *Psammolestes* Bergroth, 1911; *Rhodnius* Stål, 1859; *Eratyrus* Stål, 1859; *Panstrongylus* Bergroth, 1879; and *Triatoma* Laporte, 1832, more than half of which are endemic [11]. The northeast region includes about 30 species belonging to the genera *Cavernicola* Barber, 1937; *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Parabelminus*, *Psammolestes*, *Rhodnius*, and *Triatoma* [12].

In the states of Pernambuco (PE) and Rio Grande do Norte (RN), where outbreaks of oral CD have occurred [13,14], 13 species [*Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811); *P. lutzi* Neiva & Pinto, 1926; *P. megistus* Burmeister, 1835; *P. tibiamaculatus* (Pinto, 1926); *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965; *Rhodnius nasutus* Stal, 1859; *R. neglectus* Lent, 1954; *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911; *T. melanocephala* Neiva & Pinto, 1923; *T. petrocchia* Pinto & Barreto, 1925; *T. pseudomaculata* Corrêa & Spínola, 1964; *T. rubrofasciata* (De Geer, 1773) and *T. sordida* (Stål, 1859)] and 9 species [*P. lutzi*, *P. megistus*, *P. tertius*, *R. nasutus*, *T. brasiliensis*, *T. melanocephala*, *T. petrocchia*, *T. pseudomaculata* and *T. rubrofasciata*] have been reported to date, respectively [15–17].

The correct identification of these insects contributes directly to vector control programs, allowing the prioritization of species of primary importance during epidemiological surveillance [18]. Until 2019, classification was mainly based on dichotomous keys based on morphological data [15,19]. However, in some cases, phenotypic characters are not informative (such as phenotypic plasticity and cryptic speciation [20]), and alternative dichotomous keys using cytogenetic data (CytoKey) have been proposed [21–24].

In Brazil, several outbreaks of acute CD have been reported in which groups of individuals gathered in the same place, ingested the same food, and became sick almost simultaneously, with fever and general manifestations of a systemic infection [25]. These outbreaks occurred because triatomines infected with *T. cruzi* or the feces of these infected vectors were processed together with food consumed in natura [26,27]. At the end of the 20th century, 50% of acute CD cases recorded in the Amazon region, for example, were attributed to oral transmission [28]; at the beginning of the 21st century, this rate reached 70% [27].

In the Brazilian Northeast, research on CD outbreaks is not prioritized compared with other areas of Brazil, even though outbreak events are serious [7]. Outbreaks caused by oral contamination have already been registered in Paraíba (by sugarcane juice ingestion) [26], Bahia (possibly associated with fatal cases) [29], Ceará (possibly due to the consumption of contaminated vegetable soup) [30], Pernambuco (PE) (due to the consumption of contaminated food or beverages at a religious event) [14], and RN (where 2 deaths occurred after the consumption of contaminated food) [13].

Considering the recent outbreaks caused by oral infection resulting in at least 27 cases of acute CD in PE [14] and 18 cases and 2 deaths in the RN [13], we developed dichotomous keys to assist in the identification of triatomine species from the states of PE and RN based on cytogenetic data.

2. Materials and Methods

Cytogenetic data reported in the literature—including the chromosome number (as determined by lacto-acetic orcein staining), constitutive heterochromatin pattern (determined by C-banding), and 45S rDNA localization (probe analyzed with fluorescent in situ hybridization-FISH)—for triatomines present in PE and RN were revisited [31–34]. An identification key was developed based on Borsatto et al. [21,22].

3. Results and Discussion

Based on the cytogenetic characteristics of triatomines, we present dichotomous keys (CytoKeys) for the states of PE (Table 1) and RN (Table 2). All triatomine species could be distinguished by cytogenetic characteristics (Tables 1 and 2).

Table 1. Dichotomous key for species from Pernambuco, based on cytogenetic data.

Identification Key (CytoKey)	
1. Karyotype with $2n = 21$ chromosomes ($18A + X_1X_2Y$)	<i>Panstrongylus megistus</i>
2. Karyotype with $2n = 23$ chromosomes ($20A + X_1X_2Y$)	3
3a. Prophase without heterochromatin blocks dispersed inside the nucleus	<i>Panstrongylus geniculatus</i>
3b. Prophase with heterochromatic blocks dispersed inside the nucleus	<i>Panstrongylus tibiamaculatus</i>
4. Karyotype with $2n = 25$ chromosomes ($22A + X_1X_2Y$)	<i>Triatoma rubrofasciata</i>
5. Karyotype with $2n = 24$ chromosomes ($20A + X_1X_2X_3Y$)	6
6a. 45S rDNA probe located in one autosomal pair	<i>Panstrongylus lutzi</i>
6b. 45S rDNA probe located in one X sex chromosome	<i>Triatoma melanocephala</i>
7. Karyotype with $2n = 22$ chromosomes ($20A + XY$)	8
8a. Prophase without heterochromatin blocks dispersed inside the nucleus	9
8b. Prophase with heterochromatic blocks dispersed inside the nucleus	10
9a. Chromocenter formed by a single heterochromatic corpuscle	<i>Psammolestes tertius</i>
9b. Chromocenter formed by three heterochromatic corpuscles	<i>Rhodnius neglectus</i>
10a. Chromocenter formed by XY sex chromosomes	<i>Rhodnius nasutus</i>
10b. Chromocenter formed by XY sex chromosomes and autosomes	11
11a. 45S rDNA probe located in one X sex chromosome	12
11b. 45S rDNA probe located in one autosomal pair	13
12a. Chromocenter formed by XY sex chromosomes and attached bivalent	<i>Triatoma petrocchiaie</i>
12b. Chromocenter formed by XY sex chromosomes and several bivalents	<i>Triatoma sordida</i>
13a. Heterochromatin in 3–4 pairs of autosomes	<i>Triatoma pseudomaculata</i>
13b. Heterochromatin in all autosomes	<i>Triatoma brasiliensis</i>

Species of the genus *Panstrongylus* could be easily differentiated by the number of chromosomes (Tables 1 and 2). *Panstrongylus geniculatus* and *P. tibiamaculatus*, which have the same number of chromosomes, could be distinguished by the constitutive heterochromatin pattern (Table 1). Species in the tribe Rhodniini could be distinguished by the heterochromatic pattern and by the composition of the chromocenter in prophase cells (Tables 1 and 2). Finally, to differentiate among *Triatoma* spp., several cytogenetic characters were needed: the number of chromosomes, 45S rDNA localization, and properties of constitutive heterochromatin in chromosomes and prophase cells (Tables 1 and 2).

Table 2. Dichotomous key for species from Rio Grande do Norte, based on cytogenetic data.

Identification Key (CytoKey)	
1. Karyotype with $2n = 21$ chromosomes ($18A + X_1X_2Y$)	<i>Panstrongylus megistus</i>
2. Karyotype with $2n = 25$ chromosomes ($22A + X_1X_2Y$)	<i>Triatoma rubrofasciata</i>
3. Karyotype with $2n = 24$ chromosomes ($20A + X_1X_2 X_3Y$)	4
4a. 45S rDNA probe located in one autosomal pair	<i>Panstrongylus lutzi</i>
4b. 45S rDNA probe located in one X sex chromosome	<i>Triatoma melanocephala</i>
5. Karyotype with $2n = 22$ chromosomes ($20A + XY$)	6
6a. Prophase without heterochromatin blocks dispersed inside the nucleus	<i>Psammolestes tertius</i>
6b. Prophase with heterochromatic blocks dispersed inside the nucleus	7
7a. 45S rDNA probe located in one autosomal pair	8
7b. 45S rDNA probe located in one X sex chromosome	9
8a. Heterochromatin in 3–4 pairs of autosomes	<i>Triatoma pseudomaculata</i>
8b. Heterochromatin in all autosomes	<i>Triatoma brasiliensis</i>
9a. Chromocenter formed by XY sex chromosomes	<i>Rhodnius nasutus</i>
9b. Chromocenter formed by XY sex chromosomes more autosomes	<i>Triatoma petrocchia</i>

Triatoma brasiliensis Neiva, 1911 and *T. petrocchia* (Pinto & Barreto, 1925) belong to the *T. brasiliensis* subcomplex [35,36] reported in both states (Tables 1 and 2). *Triatoma brasiliensis* is the most important vector of CD in semi-arid Brazil (frequently colonizing domiciles), and *T. petrocchia* has not been associated with major outbreaks to date, as it is rarely found in habitats related to the peridomicile or intradomicile [37]. These species live in sympatry on rocky outcrops (where infection with *T. cruzi* has been reported) [37]. They exhibit morphological similarities [19,38] and can be distinguished by the following characters: i. presence of light stains on the femurs of *T. petrocchia* [38]; ii. absence of a spongy pit in the tibiae of *T. petrocchia* males; iii. presence of a practically glabrous rostrum and shorter first antennal segment in *T. petrocchia*; and iv. membrane of hemelytra with a dark cloudy spot across the vein separating the two cells in *T. petrocchia* [19]. These subtle differences can result in taxonomic errors in entomoepidemiological surveys, emphasizing the importance of the taxonomic keys for correct species identification.

Cytogenetic studies have provided insight into reproductive [39–41], physiological [42,43], evolutionary [44–46], systematic [34,47], and taxonomic [33,36,48] aspects of Triatominae. Cytotaxonomy was initially developed in 1950, when Schreiber and Pellegrino [49] described some karyotypes of species from South America. Since then, Ueshima [50] characterized new karyotypes and, in addition to chromosome number, used meiosis and the heteropyknotic pattern to differentiate 20 species of triatomines. More recently, the constitutive heterochromatin pattern [32,51,52] and the distribution of 45S rDNA probes [33,34,47] have been used to differentiate CD vectors.

The first identification keys for triatomines based on cytogenetic data were proposed by Borsatto et al. [21,22], who developed keys for species from the states of Alagoas, Amapá, Ceará, Roraima, Santa Catarina, and São Paulo (differentiating species from the genera *Panstrongylus*, *Psammolestes*, *Rhodnius*, and *Triatoma*). Recently, Oliveira et al. [24] reported, for the first time, *T. infestans* (Klug, 1834) in the state of Espírito Santo and developed a key based on cytogenetic data for all species reported in the state (differentiating species from genera *Panstrongylus*, *Cavernicola*, *Rhodnius* and *Triatoma*). Furthermore, Gonzalez-Britz et al. [23] performed an entomoepidemiological study of *T. sordida* (Stål, 1859) in Paraguay and presented a key based on cytogenetic data for all triatomines present in this Latin American country (differentiating species from the genera *Panstrongylus*, *Psammolestes* and *Triatoma*).

Triatoma brasiliensis and *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 are the most abundant species in the states of PE and RN, where they are naturally infected by *T. cruzi* in anthropic areas [53,54]. Due to the morphological similarities between *T. pseudomaculata* and *T. maculata* (Erichson, 1848), until 1964 these taxa were considered the same species [55]. Lucena et al. [56] studied triatomines in Northeastern Brazil and reported the presence of *T. maculata* in PE and RN. However, the distribution of *T. maculata* in Brazil is restricted to Roraima [12,15], that is, its report in both states represents an error in the identification of *T. pseudomaculata* specimens. Although *T. maculata* is not included in the key (since it does not contribute to vector diversity in the RN), it can be easily differentiated by cytogenetic characteristics (*T. maculata*: 45S rDNA probe located in XY sex chromosomes; *T. pseudomaculata*: 45S rDNA probe located in one autosomal pair [47]).

4. Conclusions

We developed two dichotomous keys to assist in the correct identification of triatomines present in PE and RN, based on cytogenetic data. These alternative keys have practical implications for the scientific community and health agents, providing a basis for the prevention of errors in the identification of key vectors contributing to CD outbreaks caused by oral infection in these states.

Author Contributions: Conceptualization, D.V.d.M. and K.C.C.A.; methodology, D.V.d.M., E.F.N., L.P.C., J.J.A., D.C.C., G.M., C.G. and K.C.C.A.; formal analysis, D.V.d.M., E.F.N., L.P.C., J.J.A., D.C.C., G.M., C.G. and K.C.C.A.; resources, D.V.d.M., E.F.N., L.P.C., J.J.A., D.C.C., G.M., C.G. and K.C.C.A.; writing—original draft preparation, D.V.d.M. and K.C.C.A.; writing—review and editing, D.V.d.M., E.F.N., L.P.C., J.J.A., D.C.C., G.M., C.G. and K.C.C.A.; supervision, K.C.C.A.; project administration, D.V.d.M. and K.C.C.A.; funding acquisition, C.G. and K.C.C.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the São Paulo Research Foundation, Brazil (FAPESP), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil (CAPES)—Finance Code 001, National Council for Scientific and Technological Development, Brazil (CNPq) and Carlos Chagas Filho Research Foundation of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript.

Acknowledgments: We thank Gilmar Perbiche Neves for initial support in the execution of the project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- World Health Organization. Available online: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (accessed on 4 December 2022).
- Centers for Disease Control and Prevention. Available online: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html> (accessed on 4 December 2022).
- Drugs for Neglected Diseases Initiative. Available online: <https://dndi.org/diseases/chagas/facts/> (accessed on 4 December 2022).
- Lima, F.M.; Oliveira, P.; Mortara, R.A.; Silveira, J.F.; Bahia, D. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *N. Biotechnol.* **2010**, *27*, 837–843.
- Gómez-Ochoa, S.A.; Rojas, L.Z.; Echeverría, L.E.; Muka, T.; Franco, O.H. Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Glob. Heart.* **2022**, *17*, 59.
- Dias, J.C.P.; Vinhaes, M.C.; Silveira, A.C.; Schofield, C.J.; Cardoso, B.; Coura, J.R. Pesquisas prioritárias sobre doença de Chagas na Amazônia: Agenda de curto-médio prazo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2001**, *34*, 497–498.
- Monsalve-Lara, J.; Lilio, M.; Valença-Barbosa, C.; Thyssen, P.J.; Miguel, D.C.; Limeira, C.; Gadelha, F.R.; Fontes, F.V.H.M.; Pires-Silva, D.; Dornak, L.L.; et al. The risk of oral transmission in an area of a Chagas disease outbreak in the Brazilian northeast evaluated through entomological, socioeconomic and schooling indicators. *Acta Trop.* **2021**, *215*, 105803.

8. Alevi, K.C.C.; Oliveira, J.; Rocha, D.S.; Galvão, C. Trends in taxonomy of Chagas disease vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to integrative taxonomy. *Pathogens* **2021**, *10*, 1627.
9. Oliveira Correia, J.P.S.O.; Gil-Santana, H.R.; Dale, C.; Galvão, C. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky is a junior synonym of *Triatoma williamsi* Galvão, Souza and Lima. *Insects* **2022**, *13*, 591.
10. Gil-Santana, H.R.; Chavez, T.; Pita, S.; Panzera, F.; Galvão, C. *Panstrongylus noireau*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. *ZooKeys* **2022**, *1104*, 203–225.
11. Costa, J.; Dale, C.; Galvão, C.; Almeida, C.E.; Dujardin, J.P. Do the new triatomine species pose new challenges or strategies for monitoring Chagas disease? An overview from 1979–2021. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2021**, *116*, e210015.
12. Galvão, C.; Carcavallo, R.; Rocha, D.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* **2003**, *202*, 1–36.
13. Vargas, A.; Malta, J.M.A.S.; Costa, V.M.; Del Grande, L.; Alves, C.R.V.; Cordeiro, G.S.; Aguiar, L.M.A.; Percio, J. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. *Cad. Saúde Pública* **2018**, *34*, e00006517.
14. Sampaio, G.H.F.; Silva, A.N.B.D.; Brito, C.R.D.N.; Honorato, N.R.M.; Oliveira, L.M.; Câmara, A.C.J.D.; Galvão, L.M.D.C. Epidemiological profile of acute Chagas disease in individuals infected by oral transmission in northern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2020**, *53*, e20200088.
15. Galvão, C. *Vetores da Doença de Chagas no Brasil*, 1st ed.; Sociedade Brasileira de Zoologia: Curitiba, Brazil, 2014; 289p.
16. da Silva, A.N.B.; Diotaiuti, L.; Câmara, A.C.J.; Oliveira, P.I.C.; Galvão, L.M.C.; Chiari, E.; Souza, R.C.M. First report of *Psammolestes tertius* Lent & Jurberg, 1965 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Rio Grande do Norte state, Brazil. *Check List* **2018**, *14*, 1109–1113.
17. Silva, D.R.; Jurberg, J.; Silva, A.; de Farias, M.C.G.; Galvão, C. Registration of new geographical distribution of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille) 1811 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Brazil. *Rev. Patol. Trop.* **2016**, *45*, 323–326.
18. Carcavallo, R.U.; Jurberg, J.; Lent, H.; Noireau, F.; Galvão, C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements *Entom. Vect.* **2000**, *7*, 1–99.
19. Lent, H.; Wygodzinsky, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **1979**, *163*, 123–520.
20. Abad-Franch, F.; Pavan, M.G.; Jaramillo, N.; Palomeque, F.S.; Dale, C.; Chaverra, D.; Monteiro, F.A. *Rhodnius barretti*, a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from western Amazonia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2013**, *108*, 92–99.
21. Borsatto, K.C.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Alevi, K.C.C. Identification Key for the Chagas Disease Vectors of Five Brazilian States, Based on Cytogenetic Data. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 303–305.
22. Borsatto, K.C.; Reis, Y.V.; Garcia, A.C.C.; Sousa, P.S.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Alevi, K.C.C. CytoKey: Identification Key for the Chagas Disease Vectors of the Largest Brazilian Urban Center (Sao Paulo State), Based on Cytogenetic Data. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *101*, 113–115.
23. Gonzalez-Britz, N.E.G.; Alevi, K.C.C.; Caris-Garcia, A.C.; Martinez-Purroy, C.E.; Galvão, C.; Carrasco, H.J. Chagas disease vectors of Paraguay: Entomoepidemiological aspects of *Triatoma sordida* (Stal, 1859) and development of an identification key for Paraguayan triatomines based on cytogenetics data. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2021**, *105*, 130–133.
24. Oliveira, J.; Rosa, J.A.; Alevi, K.C.C. Chagas Disease Vectors of Espírito Santo, Brazil: First Report of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Triatominae) in the Brazilian State and Development of an Identification Key Based on Cytogenetic Data. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2021**, *104*, 653–655.
25. Ferreira, R.T.B.; Branquinho, M.R.; Cardarelli-Leite, P. Transmissão oral da doença de Chagas pelo consumo de açaí: Um desafio para a vigilância sanitária. *Vigil. Sanit. Deb.* **2014**, *2*, 4–11.
26. Shikanai-Yasuda, M.A.; Chapadeiro, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* **1991**, *33*, 351–357.
27. Shikanai-Yasuda, M.A.; Carvalho, N.B. Oral transmission of Chagas disease. *Clin. Infec. Dis.* **2012**, *54*, 845–852.
28. Benchimol-Barbosa, P.R. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int. J. Card.* **2006**, *112*, 132–133.
29. Dias, J.P.; Bastos, C.; Araújo, E.; Mascarenhas, A.V.; Netto, E.; Grassi, M.F.; Silva, M.; Tatto, E.; Mendonça, J.; Araújo, R.F.; et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, *41*, 296–300.
30. Cavalcanti, L.P.G.; Rolim, D.B.; Pires Neto, R.J.; Vilar, D.C.L.F.; Nogueira, J.O.L.; Pompeu, M.M.L.; Tiexeira, M.J.; Sousa, A.Q. Microepidemics of acute Chagas' disease by oral transmission in Ceará. *Cad. Saúde Colet.* **2009**, *17*, 911–921.
31. Alevi, K.C.C.; Moreira, F.F.F.; Jurberg, J.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Description of the diploid chromosome set of *Triatoma pintodiasi* (Hemiptera, Triatominae). *Genet. Mol. Res.* **2016**, *25*, 15.
32. Panzera, F.; Pérez, R.; Panzera, Y.; Ferrandis, I.; Ferreira, M.J.; Calleros, L. Cytogenetics and genome evolution in the subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Cytogenet. Genome Res.* **2010**, *128*, 77–87.
33. Panzera, F.; Pita, S.; Nattero, J.; Panzera, Y.; Galvão, C.; Chavez, T.; Rojas De Arias, A.; Cardozo Téllez, L.; Noireau, F. Cryptic speciation in the *Triatoma sordida* subcomplex (Hemiptera, Reduviidae) revealed by chromosomal markers. *Parasit. Vect.* **2015**, *8*, 495.

34. Pita, S.; Lorite, P.; Nattero, J.; Galvão, C.; Alevi, K.C.C.; Teves, S.C.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Panzera, F. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera-Triatominae). *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *43*, 225–231.
35. Oliveira, J.; Marcet, P.L.; Takiya, D.M.; Mendonça, V.J.; Belintani, T.; Barges, M.D.; Mateo, L.; Chagas, V.; Folly-Ramos, E.; Cordeiro-Estrela, P.; et al. Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the *Brasiliensis* subcomplex. *Acta Trop.* **2017**, *170*, 140–148.
36. Alevi, K.C.C.; Bittinelli, I.F.; Delgado, L.M.G.; Madeira, F.F.; Oliveira, J.; Lilioso, M.; Folly-Ramos, E.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Molecular cytotaxonomy of the *Triatoma brasiliensis* species subcomplex (Hemiptera, Triatominae). *Acta Trop.* **2020**, *201*, 105225.
37. Lima-Oliveira, T.M.; Fontes, F.V.H.M.; Lilioso, M.; Pires-Silva, D.; Teixeira, M.M.G.; Meza, J.G.V.; Harry, M.; Fileé, J.; Costa, J.; Valença-Barbosa, C.; et al. Molecular eco-epidemiology on the sympatric Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrochiae*: Ecotopes, genetic variation, natural infection prevalence by trypanosomatids and parasite genotyping. *Acta Trop.* **2020**, *201*, 105188.
38. Pinto, C.; Barreto, J.B. Uma nova espécie de “barbeiro” do Brasil, (*Triatoma petrochii* n.sp.). *Scienc. Med.* **1925**, *3*, 769.
39. Alevi, K.C.C.; Mendonça, P.P.; Pereira, N.P.; Fernandes, A.L.V.Z.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Analysis of spermiogenesis like a tool in the study of the triatomines of the *Brasiliensis* subcomplex. *Comp. Rendus Biolog.* **2013**, *336*, 46–50.
40. Alevi, K.C.C.; Guerra, A.L.; Imperador, C.H.L.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Biology of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae) During the Imaginal Molt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *94*, 689–690.
41. Alevi, K.C.C.; Augusto, Y.; Oliveira, J.; Belintani, T.; Silva, L.A.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Reproductive aspects of Chagas disease vectors (Hemiptera, Triatominae) with anatomical teratologies. *Acta Trop.* **2018**, *185*, 251–254.
42. Alevi, K.C.C.; Castro, N.F.C.; Lima, A.C.C.; Ravazi, A.; Morielli-Souza, A.; Oliveira, J.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Nucleolar persistence during spermatogenesis of the genus *Rhodnius* (Hemiptera, Triatominae). *Cell Biol. Int.* **2014**, *38*, 977–980.
43. Madeira, F.F.; Borsatto, K.C.; Lima, A.C.C.; Ravazi, A.; Oliveira, J.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Alevi, K.C.C. Nucleolar Persistence: Peculiar Characteristic of Spermatogenesis of the Vectors of Chagas Disease (Hemiptera, Triatominae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *95*, 1118–1120.
44. Ravazi, A.; Oliveira, J.; Campos, F.F.; Madeira, F.F.; Reis, Y.V.; Oliveira, A.B.B.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Rosa, J.A.; Galvão, C.; Alevi, K.C.C. 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. *Parasit. Vectors.* **2021**, *14*, 350.
45. Pinotti, H.; Oliveira, J.; Ravazi, A.; Madeira, F.F.; Reis, Y.V.; Oliveira, A.B.B.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Rosa, J.A.; Alevi, K.C.C. Revisiting the hybridization processes in the *Triatoma brasiliensis* complex (Hemiptera, Triatominae): Interspecific genomic compatibility point to a possible recent diversification of the species grouped in this monophyletic complex. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0257992.
46. Alevi, K.C.C.; Pinotti, H.; Araújo, R.F.; Azeredo-Oliveira, M.T.V.; Rosa, J.A.; Mendonça, V.J. Hybrid collapse confirm the specific status of *Triatoma bahiensis* Sherlock and Serafim, 1967 (Hemiptera, Triatominae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *98*, 475–477.
47. Pita, S.; Lorite, P.; Cuadrado, A.; Panzera, Y.; De Oliveira, J.; Alevi, K.C.C.; Rosa, J.A.; Freitas, S.P.C.; Gómez-Palacio, A.; Solari, A.; et al. High chromosomal mobility of rDNA clusters in holocentric chromosomes of Triatominae, vectors of Chagas disease (Hemiptera-Reduviidae). *Med. Vet. Entomol.* **2022**, *36*, 66–80.
48. Alevi, K.C.C.; Imperador, C.H.L.; Moreira, F.F.F.; Jurberg, J.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Differentiation between *Triatoma arthurneivai* and *Triatoma wygodzinskyi* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) using cytotaxonomy. *Gen. Mol. Res.* **2016**, *15*, gmr7869.
49. Schreiber, G.; Pellegrino, J. Eteropicnosi di autosomi come possibile meccanismo di speciazione. *Sci. Genet.* **1950**, *3*, 215–226.
50. Ueshima, N. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* **1966**, *18*, 97–122.
51. Alevi, K.C.C.; Oliveira, J.; Moreira, F.F.F.; Jurberg, J.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Chromosomal characteristics and distribution of constitutive heterochromatin in the *Matogrossensis* and *Rubrovaria* subcomplexes. *Infect. Gen. Evol.* **2015**, *33*, 158–162.
52. Alevi, K.C.C.; Ravazi, A.; Franco-Bernardes, M.F.; Rosa, J.A.; Azeredo-Oliveira, M.T.V. Chromosomal evolution in the *pallens* group (Hemiptera, Triatominae). *Gen. Mol. Res.* **2015**, *14*, 12654–12659.
53. Silva, L.R.S.; Silva, M.B.A.; Oliveira, G.M.A.; Medeiros, C.A.; Oliveira, J.B. Entomological surveillance of Chagas disease vectors in the municipalities of the VIII Regional Health Management of Pernambuco State, Brazil, from 2012 to 2017. *Rev. Pan. Amaz. Saude* **2021**, *12*, e202100858.
54. Barbosa-Silva, A.N.; Souza, R.C.M.; Diotaiuti, L.; Aguiar, L.M.A.; Câmara, A.C.J.; Galvão, L.M.C.; Chiari, E. Synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Infestation, colonization, and natural infection by trypanosomatids in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2019**, *52*, e20190061.
55. Corrêa, R.R.; Espínola, H.N. Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral, Ceará (Hemiptera, Reduviidae). *Arq. Hig. Saude Publ.* **1964**, *29*, 115–127.
56. Lucena, D. Estudo sobre a Doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Rev. Brasil. Mal. Trop.* **1969**, *22*, 3–173.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3.2 Capítulo publicado no livro “Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores”

NHAPULO EF, MELLO DM, REIS YV, ALEVI KCC. CytoKey: chaves dicotômicas desenvolvidas para identificar os vetores da doença de Chagas, a partir de dados citogenéticos. OLIVEIRA J, ALEVI KCC, CAMARGO LMA, MENEGUETTI DUO, eds. Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Vetores. Rio Branco, Brazil: Stricto Sensu Editora, p. 11–19, 2021. DOI: <https://doi.org/10.35170/ss.ed.9786586283587.06>

ATUALIDADES EM MEDICINA TROPICAL
NA AMÉRICA DO SUL:

VETORES



ISBN: 978-65-86283-58-7

Organizadores:

Jader de Oliveira

Kaio Cesar Chaboli Alevi

Luís Marcelo Aranha Camargo

Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

2021

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A886

Atualidades em medicina tropical na América do Sul : vetores / Jader de Oliveira ... [et al] (org.). – Rio Branco : Stricto Sensus, 2021.
345 p. : il.

ISBN: 978-65-86283-58-7

DOI: 10.35170/ss.ed.9786586283587

1. Medicina. 2. Tropical. 3. Vetores. I. Oliveira, Jader de.
II. Alevi, Kaio Cesar Chaboli. III. Camargo, Luís Marcelo
Aranha. IV. Meneguetti, Dionatas Ulises de Oliveira. V. Título.

CDD 22. ed. 616.9918

Bibliotecária Responsável: Tábata Nunes Tavares Bonin / CRB 11-935

O conteúdo dos capítulos do presente livro, correções e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

É permitido o download deste livro e o compartilhamento do mesmo, desde que sejam atribuídos créditos aos autores e a editora, não sendo permitido à alteração em nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.sseditora.com.br

CYTOKEY: CHAVES DICOTÔMICAS DESENVOLVIDAS PARA IDENTIFICAR OS VETORES DA DOENÇA DE CHAGAS, A PARTIR DE DADOS CITOGENÉTICOS

Emercio Felisberto Nhapulo¹, Denis Vinícius de Mello², Yago Visinho dos Reis² e Kaio Cesar Chaboli Alevi^{1,2,3}

1. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil;
2. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu, São Paulo, Brasil;
3. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Os triatomíneos são insetos hematófagos de grande importância para a saúde pública, pois são considerados como a principal forma de transmissão do agente etiológico da doença de Chagas (DC). A Organização Mundial de Saúde destaca que o controle de vetores é a principal medida para diminuir a incidência da DC. Com base nisso, fica evidente a importância de se conhecer mais sobre os triatomíneos, abordando questões biológicas, ecológicas, comportamentais, genéticas, bem como sistemáticas e taxonômicas. Por 225 anos (1773-1998), a descrição de espécies de vetores da DC foi realizada apenas com dados morfológicos e/ou morfométricos, o que levou ao desenvolvimento de diversas chaves dicotômicas, a partir desses caracteres. Apenas em 2019, chaves alternativas foram propostas, como, por exemplo, as chaves com dados citogenéticos. Considerando que a classificação taxonômica correta desses vetores é imprescindível para os estudos entomoepidemiológicos e, principalmente, que existem fatores, como espécies fenotipicamente similares ou, até mesmo, idênticas (espécies crípticas), que dificultavam a diferenciação de alguns táxons apenas pela morfologia, apresentamos um capítulo que discute, a partir de dados da literatura, questões relacionadas com o desenvolvimento de chaves dicotômicas a partir de dados citogenéticos e, principalmente, realiza uma compilação de todas as chaves presentes na literatura.

Palavras-chave: Triatominae, Taxonomia, Citotaxonomia e Novas abordagens.

ABSTRACT

Triatomines are hematophagous insects of great importance to public health, as they are considered the main form of transmission of the etiological agent of Chagas disease (CD). The World Health Organization highlights that vector control is the main measure to reduce the incidence of CD. Based on this, the importance of knowing more about triatomines is evident, covering biological, ecological, behavioral, genetic, as well as systematic and taxonomic issues. For 225 years (1773-1998), the description of CD vector species was

performed only with morphological and/or morphometric data, which led to the development of several dichotomous keys from these characters. Only in 2019, alternative keys were proposed, such as keys with cytogenetic data. Considering that the correct taxonomic classification of these vectors is essential for entomoepidemiological studies and, mainly, that there are factors, such as phenotypically similar or even identical species (cryptic species), which made it difficult to differentiate some taxa just by morphology, we present a chapter that discusses, from literature data, issues related to the development of dichotomous keys from cytogenetic data and, mainly, performs a compilation of all keys present in the literature. **Keywords:** Triatominae, Taxonomy, Citotaxonomy and New approaches.

1. INTRODUÇÃO

Os triatomíneos (Hemiptera, Triatominae) são insetos hematófagos de grande importância para a saúde pública, pois são considerados como a principal forma de transmissão do protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), o agente etiológico da doença de Chagas (DC) – doença negligenciada que atinge cerca de oito milhões de pessoas em todo o mundo e resulta em mais de 10 mil mortes por ano (CHAGAS, 1909; WHO 2021).

Esses vetores tem o hábito de defecar/urinar durante (espécies de maior importância epidemiológica) ou após (espécies de menor importância vetorial) o repasto sanguíneo e, caso estejam infectados com o *T. cruzi*, liberam o parasito nas fezes/urina (WHO, 2021). Uma vez que o parasito entra na corrente sanguínea, inicia-se o período de incubação e, em seguida, a fase aguda da doença (geralmente assintomática) (WHO, 2021). Decorrido esse período, inicia-se a fase crônica [que pode ser assintomática ou ocasionar distúrbios cardíacos e/ou gastrointestinais (RASSI JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca que o controle de vetores é a principal medida para diminuir a incidência da DC (WHO, 2021). Com base nisso, fica evidente a importância de se conhecer mais sobre os triatomíneos, abordando questões biológicas (CATALÁ; NOIREAU; DUJARDIN, 2017), ecológicas (GALVÃO; JUSTI, 2015), comportamentais (LAZZARI; LORENZO, 2009), genéticas (GOURBIÈRE et al., 2012), bem como sistemáticas e taxonômicas (GALVÃO, 2020).

A taxonomia de Triatominae foi iniciada em 1773, com a descrição de *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (como *Cimex rubro-fasciatus*) (DE GEER, 1773). Por 225 anos (1773-1998), a descrição de espécies de vetores da DC foi realizada apenas com dados morfológicos e/ou morfométricos (FRIAS; HENRY; GONZÁLEZ, 1998). Com base nisso,

diversos pesquisadores desenvolveram chaves dicotômicas para a correta identificação desses insetos, a partir desses caracteres (LENT; WYGODZINSKY, 1979; GALVÃO, 2014). Apenas em 2019, chaves alternativas foram propostas, como, por exemplo, as chaves com dados citogenéticos (BORSATTO et al., 2019; BORSATTO; AZEREDO-OLIVEIRA; ALEVI, 2019).

Considerando que a classificação taxonômica correta desses vetores é imprescindível para os estudos entomoepidemiológicos (uma vez que permite que os programas de controle de vetores diferenciem as espécies de importância primária e secundária para a transmissão da DC) (BORSATTO et al., 2019), apresentamos um capítulo que discute, a partir de dados da literatura, questões relacionadas com o desenvolvimento de chaves dicotômicas a partir de dados citogenéticos e, principalmente, realiza uma compilação de todas as chaves presentes na literatura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CHAVES DICOTÔMICAS A PARTIR DE DADOS CITOGENÉTICOS

As primeiras chaves dicotômicas desenvolvidas a partir de dados citogenéticos foram idealizadas por Borsatto, Azeredo-Oliveira e Alevi (2019). Para a proposta das chaves alternativas, os autores ressaltaram que, embora a taxonomia dos triatomíneos fosse embasada principalmente em caracteres morfológicos, existiam fatores, como espécies fenotipicamente similares ou, até mesmo, idênticas (espécies crípticas), que dificultavam a diferenciação de alguns táxons apenas pela morfologia (GALVÃO, 2014). Com base no exposto, Borsatto, Azeredo-Oliveira e Alevi (2019) propuseram cinco chaves de identificação para cinco estados brasileiros, a saber, Alagoas, Amapá, Ceará, Roraima e Santa Catarina.

Para o desenvolvimento das chaves, Borsatto, Azeredo-Oliveira e Alevi (2019) utilizaram diferentes caracteres citogenéticos, como cariótipo, padrão de heterocromatina constitutivas e localização de sondas de DNA r 45S. Diante das divergências cromossômicas observadas entre as espécies notificadas em cada um dos cinco estados do Brasil, foi possível desenvolver uma chave para cada estado. Esses caracteres estabelecidos mostram-se de grande importância taxonômica, pois, em geral, são espécie-específicos (PANZERA et al., 2010; PITA et al., 2016). No entanto, vale ressaltar que só é possível

desenvolver/utilizar esse tipo de chave se estudos citogenéticos forem/tiverem sido realizados [e, até o momento, existem mais de 50 espécies de triatomíneos que não foram estudadas citogeneticamente (PANZERA et al., 2021).

Combinando os caracteres citogenéticos estabelecidos acima com o comportamento meiótico dos cromossomos dos triatomíneos, Borsatto et al. (2019) desenvolveram uma chave para os vetores da DC notificados no estado de São Paulo e, mais recentemente, Oliveira, Rosa e Alevi (2021) desenvolveram uma chave para os triatomíneos do Espírito Santo. Borsatto, Azeredo-Oliveira e Alevi (2019) discutem que essas chaves alternativas são importantes porque a correta classificação dos triatomíneos auxilia no direcionamento das atividades dos programas de controle de vetores do Brasil e enfatizam a necessidade de ampliar os estudos citogenéticos na subfamília Triatominae para que chaves possam ser desenvolvidas para todos os estados brasileiros.

Recentemente, Gonzalez-Britez et al. (2021) desenvolveram uma chave para os triatomíneos notificados no Paraguai, a partir de dados citogenéticos. Para o desenvolvimento da chave, os autores combinaram os caracteres citogenéticos já utilizados nas chaves dos estados brasileiros (BORSATTO et al., 2019; BORSATTO; AZEREDO-OLIVEIRA; ALEVI, 2019; OLIVEIRA; ROSA; ALEVI, 2021) com a distribuição da riqueza de AT e CG nos cromossomos das espécies (que pode ser observada pela técnica de bandamento CMA₃/DAPI). Diferente do Brasil que, atualmente, apresenta 66 espécies de triatomíneos notificadas (COSTA et al., 2021), o Paraguai apresenta apenas 10 espécies (sendo nove já estudadas citogeneticamente) (GONZALEZ-BRITEZ et al., 2021). Diante disso, fica evidente a importância das chaves alternativas e, principalmente, a possibilidade de desenvolvê-las para diversos países da América Latina, desde que se conheçam as características citogenéticas dos triatomíneos.

2.2. COMPILAÇÃO DAS CHAVES DICOTÔMICAS DESENVOLVIDAS A PARTIR DE DADOS CITOGENÉTICOS

2.2.1. Chaves dicotômicas desenvolvidas por Borsatto, Azeredo-Oliveira e Alevi (2019)

2.2.1.1. Alagoas, Brasil

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Cariótipo com $2n = 21$ cromossomos ($18A + X_1X_2Y$) | <i>P. megistus</i> |
| 2. Cariótipo com $2n = 23$ cromossomos ($20A + X_1X_2Y$) | <i>T. tibiamaculata</i> |

3. Cariótipo com $2n = 24$ cromossomos ($20A + X_1X_2X_3Y$)	<i>P. lutzi</i>
4. Cariótipo com $2n = 25$ cromossomos ($22A + X_1X_2Y$)	<i>T. rubrofasciata</i>
5. Cariótipo com $2n = 22$ cromossomos ($20A + XY$)	6
6a. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	<i>P. tertius</i>
6b. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	7
7a. Heterocromatina em 3-4 pares de autossomos	<i>T. pseudomaculata</i>
7b. Heterocromatina em todos os autossomos	<i>T. brasiliensis</i>

2.2.1.2. Amapá, Brasil

1. Cariótipo com $2n = 23$ cromossomos ($20A + X_1X_2Y$)	<i>P. geniculatus</i>
2. Cariótipo com $2n = 22$ cromossomos ($20A + XY$)	3
3a. Sonda de DNAr 45S localizada no cromossomo X	<i>R. robustus</i>
3b. Sonda de DNAr 45S localizada nos cromossomos X e Y	<i>R. pictipes</i>

2.2.1.3. Ceará, Brasil

1. Cariótipo com $2n = 21$ cromossomos ($18A + X_1X_2Y$)	<i>P. megistus</i>
2. Cariótipo com $2n = 23$ cromossomos ($20A + X_1X_2Y$)	<i>P. geniculatus</i>
3. Cariótipo com $2n = 24$ cromossomos ($20A + X_1X_2X_3Y$)	<i>P. lutzi</i>
4. Cariótipo com $2n = 22$ cromossomos ($20A + XY$)	5
5a. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	<i>P. tertius</i>
5b. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	6
6a. Sonda de DNAr 45S localizada no cromossomo sexual X	<i>R. nasutus</i>
6b. Sonda de DNAr 45S localizada em autossomos	7
7a. Heterocromatina em 3-4 pares de autossomos	<i>T. pseudomaculata</i>
7b. Heterocromatina em todos os autossomos	<i>T. brasiliensis</i>

2.2.1.4. Roraima, Brasil

1. Cariótipo com $2n = 23$ cromossomos ($20A + X_1X_2Y$)	<i>P. geniculatus</i>
2. Cariótipo com $2n = 22$ cromossomos ($20A + XY$)	3
3a. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	<i>T. maculata</i>

3b. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	4
4a. Sonda de DNAr 45S localizada no cromossomo X	<i>R. robustus</i>
4b. Sonda de DNAr 45S localizada nos cromossomos X e Y	<i>R. pictipes</i>

2.2.1.5. Santa Catarina, Brasil

1. Cariótipo com $2n = 21$ cromossomos ($18A + X_1X_2Y$)	<i>P. megistus</i>
2. Cariótipo com $2n = 23$ cromossomos ($20A + X_1X_2Y$)	<i>T. tibiamaculata</i>
3. Cariótipo com $2n = 22$ cromossomos ($20A + XY$)	4
4a. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	<i>R. domesticus</i>
4b. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	<i>T. sordida</i>

2.2.2. Chave dicotômica desenvolvida por Borsatto et al. (2019)

2.2.2.1. São Paulo, Brasil

1. Cariótipo com $2n = 21$ cromossomos ($18A + X_1X_2Y$)	<i>P. megistus</i>
2. Cariótipo com $2n = 25$ cromossomos ($22A + X_1X_2Y$)	<i>T. rubrofasciata</i>
3. Cariótipo com $2n = 23$ cromossomos ($20A + X_1X_2Y$)	4
4a. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	<i>T. tibiamaculata</i>
4b. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	<i>P. geniculatus</i>
5. Cariótipo com $2n = 22$ cromossomos ($20A + XY$)	6
6a. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	7
6b. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo	8
7a. Heterocromatina em 3-4 pares de autossomos	<i>T. infestans</i>
7b. Heterocromatina em todos os autossomos	<i>T. sordida</i>
8a. Cromocentro formado por três corpúsculos heterocromáticos	9
8b. Cromocentro formado por apenas um corpúsculo	10
9a. Ausência de heterocromatina em todos os autossomos	<i>R. neglectus</i>
9b. Presença de heterocromatina em alguns autossomos	<i>R. domesticus</i>
10a. Sonda de DNAr 45S localizada nos autossomos	<i>T. wygodzinskyi</i>
10b. Sonda de DNAr 45S localizada nos cromossomos X e Y	<i>P. tertius</i>

2.2.3. Chave dicotômica desenvolvida por Oliveira, Rosa e Alevi (2021)

2.2.3.1. Espírito Santo, Brasil

- | | |
|---|-------------------------|
| 1. Cariótipo com $2n = 21$ cromossomos ($18A + X_1X_2Y$) | <i>P. megistus</i> |
| 2. Cariótipo com $2n = 22$ cromossomos ($20A + XY$) | 3 |
| 3a. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo | <i>C. pilosa</i> |
| 3b. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo | 4 |
| 4a. Heterocromatina em 3-4 grandes pares de autossomos | <i>T. infestans</i> |
| 4b. Presença de heterocromatina em alguns autossomos | <i>R. domesticus</i> |
| 5. Cariótipo com $2n = 23$ cromossomos ($20A + X_1X_2Y$) | 6 |
| 6a. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo | <i>P. geniculatus</i> |
| 6b. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo | <i>T. tibiamaculata</i> |
| 7. Cariótipo com $2n = 24$ cromossomos ($20A + X_1X_2X_3Y$) | <i>T. vitticeps</i> |

2.2.4. Chave dicotômica desenvolvida por Gonzalez-Britez et al. (2021)

2.2.4.1. Paraguai

- | | |
|--|---------------------|
| 1. Cariótipo com $2n = 21$ cromossomos ($18A + X_1X_2Y$) | <i>P. megistus</i> |
| 2. Cariótipo com $2n = 22$ cromossomos ($20A + XY$) | 3 |
| 3a. Prófase sem blocos de heterocromatina dispersos no núcleo | 4 |
| 3b. Prófase com blocos de heterocromatina dispersos no núcleo | 6 |
| 4a. Sonda de DNAr 45S localizada nos cromossomos X e Y | <i>P. coreodes</i> |
| 4b. Sonda de DNAr 45S localizada em um par de autossomos | 5 |
| 5a. Um par de autossomos com bloco CMA ₃ em uma extremidade | <i>T. guazu</i> |
| 5b. Sem blocos CMA ₃ nos autossomos | <i>T. guasayana</i> |
| 6a. Heterocromatina em 3-4 grandes pares de autossomos | 7 |
| 6b. Presença de heterocromatina em alguns autossomos | 8 |
| 7a. Cromossomo sexual X com heterocromatina | <i>T. infestans</i> |
| 7b. Cromossomo sexual X sem heterocromatina | <i>T. platensis</i> |
| 8a. Sonda de DNAr 45S localizada no cromossomo X | <i>T. sordida</i> |

- 8b. Sonda de DNAr 45S em um grande par de autossomos e no X *T. delpontei*
 9. Cariótipo com $2n = 23$ cromossomos ($20A + X_1X_2Y$) *P. geniculatus*

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados apresentados, fica evidente a importância das chaves com dados citogenéticos como alternativa para a correta identificação dos vetores da DC. Além disso, ressalta-se a importância de novos estudos citogenéticos nos triatomíneos para que novas chaves possam ser desenvolvidas para os outros estados brasileiros e, sobretudo, para os outros países da América Latina.

4. REFERÊNCIAS

- BORSATTO, K.C.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ALEVI, K.C.C. Identification Key for the Chagas Disease Vectors of Five Brazilian States, Based on Cytogenetic Data. **Am J Trop Med Hyg**, v. 100, p. 303-305, 2019.
- BORSATTO, K.C.; REIS, Y.V.; GARCIA, A.C.C.; SOUSA, P.S.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; ALEVI, K.C.C. CytoKey: Identification Key for the Chagas Disease Vectors of the Largest Brazilian Urban Center (São Paulo State), Based on Cytogenetic Data. **Am J Trop Med Hyg**, v. 101, p. 113-115, 2019.
- CATALÁ, S.S.; NOIREAU, F.; DUJARDIN, J.P. **Biology of triatominae**. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. American trypanosomiasis Chagas disease. One hundred years of research. Elsevier, Amsterdam, 2017.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159–218, 1909.
- COSTA, J.; DALE, C.; GALVÃO, C.; ALMEIDA, C.E.; DUJARDIN, J.P. Do the new triatomine species pose new challenges or strategies for monitoring Chagas disease? An overview from 1979-2021. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 116, p. e210015, 2021.
- DE GEER, C. **Mémoires pour servir à l’histoire des insectes**. Stockholm, 1773.
- FRIAS, D.A.; HENRY A.A.; GONZÁLES, C.R. *Mepraia gajardoi*: a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. **Rev Chil Hist.Nat**, v. 71, p. 177–188, 1998.
- GALVÃO, C. **Taxonomia dos vetores da doença de Chagas da forma à molécula, quase três séculos de história**. In: OLIVEIRA, J., ALEVI, K.C.C., CAMARGO, L.M.A.,

MENEGUETTI, D.U.O. Atualidades em medicina tropical no Brasil: vetores. Strictu Sensu Editora, 9-37, 2020.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil**. Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014.

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

GONZALEZ-BRITZ, N.E.G.; ALEVI, K.C.C.; CARIS-GARCIA, A.C.; MARTÍNEZ-PURROY, C.E.; GALVÃO, C.; CARRASCO, H.J. Chagas disease vectors of Paraguay: entomoepidemiological aspects of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) and development of an identification key for Paraguayan triatomines based on cytogenetics data. **Am J Trop Med Hyg**, v. 105, p. 130–133, 2021.

GOURBIÈRE, S.; DORN, P.; TRIPET, F.; DUMONTEIL, E. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. **Heredity**, v. 108, p. 190–202, 2012.

LAZZARI, C.R.; LORENZO, M.G. Exploiting triatomine behaviour: alternative perspectives for their control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 65–70, 2009.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bull Am Mus Nat Hist**, v. 163, p. 123–520, 1979.

OLIVEIRA, J.; ROSA, J.A.; ALEVI, K.C.C. Chagas Disease Vectors of Espírito Santo, Brazil: First Report of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Triatominae) in the Brazilian State and Development of an Identification Key Based on Cytogenetic Data. **Am J Trop Med Hyg**, v. 104, p. 653–655, 2021.

PANZERA, F.; PÉREZ, R.; PAZNERA, Y.; FERRANDIS, I.; FERREIRO, M.J.; CALLEROS, L. Cytogenetics and Genome Evolution in the Subfamily Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). **Cytogen Gen Res**, v. 128, p. 77–87, 2010.

PITA, S.; LORITE, P.; NATTERO, J.; GALVÃO, C.; ALEVI, K.C.C.; TEVES, S.C.; et al. New arrangements on several species subcomplexes of *Triatoma* genus based on the chromosomal position of ribosomal genes (Hemiptera - Triatominae). **Infect Genet Evol**, v. 43, p. 225–231, 2016.

RASSI JR, A.R.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388–1402, 2010.

WHO. **Chagas disease**. Disponível em < [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso 30/07/2021.

4. CONCLUSÃO

Com base nas chaves dicotômicas desenvolvidas com dados citogenéticos, todas as espécies de triatomíneos notificadas nos estados de PE e RN puderam ser diferenciadas. O desenvolvimento de chaves alternativas mostra-se de grande importância para a comunidade científica e, principalmente, os sanitaristas que atuam no controle de vetores desses estados, auxiliando-os na correta identificação de espécies que apresentam semelhanças morfológicas (como *Triatoma brasiliensis* e *T. petrocchiae*) e, principalmente, de espécies que já foram identificadas de forma errada (como *T. pseudomaculata* que já foi identificada como *T. maculata* em ambos os estados).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BENCHIMOL-BARBOSA, P.R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *International Journal of Cardiology*, v. 112, 132-133, 2006.

BORSATTO, K.C., et al. CytoKey: Identification Key for the Chagas Disease Vectors of the Largest Brazilian Urban Center (São Paulo State), Based on Cytogenetic Data. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, p. 113-115, 2019.

BORSATTO, K.C., et al. Identification Key for the Chagas Disease Vectors of Five Brazilian States, Based on Cytogenetic Data. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 100, p. 303-305, 2019.

BRITZ, N.E.G., et al. Chagas disease vectors of Paraguay: entomoepidemiological aspects of *Triatoma sordida* (Stål, 1859) and development of an identification key for Paraguayan triatomines based on cytogenetics data. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 105, p. 130-133, 2021.

CARCAVALLO, et al. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. Entomologia y Vectores, v. 7, p. 1-99, 2000.

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.

da 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, p. 1109–1113, 2018.

FUENTES-VICENTE, J.A., et al. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. Acta Tropica, v. 183, p. 23-31, 2018.

GALVÃO, C. Vetores da doença de chagas no Brasil. 2014.

GIL-SANTANA, H.R., et al. *Panstrongylus noireau*, a remarkable new species of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) from Bolivia. ZooKeys, v. 1104, p. 203–225, 2022.

LENT, H.; WYGODZYNISKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera – Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the American Museum of Natural History, v. 163, p. 123-520, 1979.

OLIVEIRA CORREIA, J.P.S.O., et al. *Triatoma guazu* Lent and Wygodzinsky is a junior synonym of *Triatoma williamsi* Galvão, Souza and Lima. Insects, v. 13, p. 591, 2022.

OLIVEIRA, J., et al. Chagas Disease Vectors of Espírito Santo, Brazil: First Report of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Triatominae) in the Brazilian State and Development of an Identification Key Based on Cytogenetic Data. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 104, p. 653-655, 2021.

SAMPAIO, G.H.F., et al. Epidemiological profile of acute Chagas disease in individuals infected by oral transmission in northern Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 53, p. e20200088, 2020.

SHIKANAI-YASUDA, et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, v. 33, p. 351-357, 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M.A., CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas disease. Clinical Infectious Diseases, v. 54, p. 845–852, 2012.

SILVA, D.R.; et al. Registration of new geographical distribution of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille) 1811 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Brazil. Revista de Patologia Tropical, v. 45, p. 323–326, 2016.

VARGAS, A. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. Caderno de Saúde Pública, v. 34, p. 1-8, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em 11 de maio de 2021.