

SILVIA MENEZES DOS SANTOS

**ESTUDO CITOGENÉTICO DE QUATRO ESPÉCIES DE
TRIATOMINAE (HEMIPTERA:REDUVIIDAE)**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Entomologia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S237e
2010

Santos, Silvia Menezes dos, 1975-

Estudo citogenético de quatro espécies de Triatominae
(Hemiptera: Reduviidae) / Silvia Menezes dos Santos.

– Viçosa, MG, 2010.
vii, 71f. : il. ; 29cm.

Texto em português e inglês.

Orientador: Silvia das Graças Pompolo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Hemíptera. 2. Inseto como transmissor de doenças.
3. Citogenética. 4. *Panstrongylus lutzi*.
5. *Rhodnius neglectus*. 6. *Rhodnius pictipes*.
7. *Triatoma vitticeps*. I. Universidade Federal de Viçosa. II.
Título.

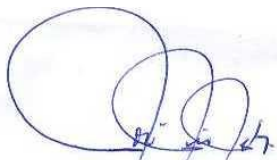
CPD 22. ed. 595.754

SILVIA MENEZES DOS SANTOS

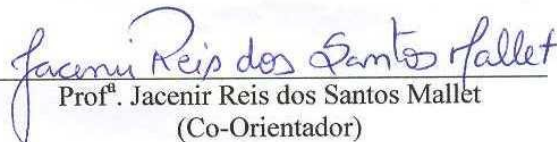
**ESTUDO CITOGENÉTICO DE QUATRO ESPÉCIES DE TRIATOMINAE
(HEMIPTERA:REDUVIIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

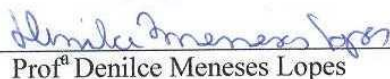
Aprovada em: 29 de setembro de 2010



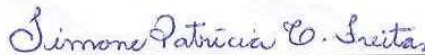
Prof. José Lino Neto
(Co-Orientador)



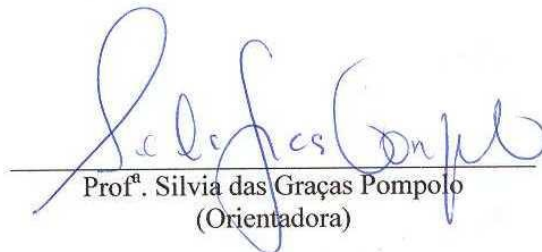
Prof.^a. Jacenir Reis dos Santos Mallet
(Co-Orientador)



Prof.^a Denilce Meneses Lopes



Dr.^a. Simone Patrícia Carneiro de Freitas



Prof.^a. Silvia das Graças Pompolo
(Orientadora)

Dedico essa tese, esse símbolo material de uma grande vitória, pois chegar até aqui foi uma vitória...dedico tudo isso a minha mãe, Magali Menezes dos Santos... a pessoa nesse tempo e espaço mais presente e importante em toda a minha vida...sempre ao meu lado, pronta a me estender a mão, sempre de pé me aplaudindo... sem a força dela eu não teria me aventurado a sair de casa pra fazer o doutorado tão longe, por medo... mas ela me deu coragem...coragem a seguir em frente, simplesmente porque tudo o que ela queria de mim era que eu fosse uma grande mulher, guerreira e corajosa, assim como ela... Não seria a metade do que sou em caráter e estrutura sem ela...

Meu grande alicerce!!!

Meu grande amor!!! À você todo o meu melhor...

Você que me deu tanta força na manhã em que se foi...à você dedico!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Academia...

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, na pessoa do prof^o Raul Narciso Guedes, pela valiosa oportunidade de aprendizado, pelo crescimento proporcionado e pela estreita e gratificante parceria;

À Capes pela bolsa e auxílio financeiro indispensáveis ao trabalho executado na Universidade Federal de Viçosa;

À minha orientadora Silvia das Graças Pompolo, por estar sempre ao meu lado, pelo seu inexorável senso de justiça, pela confiança, por ter me ensinado tanto nesses anos, por ter me ensinado a te admirar... pela relação maternal!!!

Às minhas co-orientadoras Jacenir Mallet e Teresa Cristina Monte, que foram minhas maiores incentivadoras a vir para Viçosa e descortinar um novo mundo, de conhecimento e de vida que se abriria para mim, sempre presentes nas horas de pedido de colo, e sempre exultantes nos momentos de conquistas. Por todo o cuidado maternal ao longo de todos esses anos!!!

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela contribuição irrestrita à ampliação de meus conhecimentos no mundo dos insetos.

Agradeço imensamente à mola-mestra da academia:

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação de Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Miriam Magalhães e Paula Costa, por todo o companheirismo e amizade, sempre muito solícitas nos momentos de dúvida, e nos salvando dos perigos da nossa vida acadêmica;

Aos funcionários do biotério do Departamento de Veterinária, Adão e Juliano, por terem me cedido camundongos para a alimentação das colônias de triatomíneos;

Às técnicas do setor de Morfologia, Bioquímica e Ultraestrutura de Artrópodes e Parasitos, Ana Paula Rufino e Simone Tevez pelo profissionalismo e dedicação com que cuidam das colônias de triatomíneos; assim como os queridos amigos do referido laboratório Catarina Macedo, Wagner Alexandre Costa, Ana Laura Carbajal, Dani Mizael, Suzete Oliveira, William Marques, Esther Lúcia, Simone Miranda, Margareth, Nathanielly Rocha, Nathaly, Cláudia Coelho,

Ao técnico e amigo Alex Bhering do laboratório de Histologia/DBG-UFV, pelo companheirismo, ajuda e momentos aleatórios;

Agradeço a mola-mestra da minha vida...meus amigos:

Aos amigos Sabrina Almeida (The Sabrayna), Antônia Van de Koken, Daniel Albeny, Luiza Barbosa, Alex Cunha, Cassiano Rosa, Roberta Andrade, Livia Athaide, Marcelo Pereira, Luiz Gustavo Soares, Raquel Fellet, João Ferreira, Claudinei Lima, Dalana Muscardi, Gibran Veríssimo, Paulo Cristaldo, Tatiana Marques, Carla Arce, Dihego Azevedo, e a tantos outros amigos queridos e não menos importantes que fiz em Viçosa, que me proporcionaram tantos momentos de alegria, de crescimento, de auto-conhecimento, que me deram toda a força necessária pra continuar seguindo em frente nos momentos mais difíceis... Um grande encontro!!! Uma grande família se formou...escolhida pelo coração e pela sinergia!!! Muita sinergia!!! Tantas doces lembranças que estarão sempre comigo... onde quer que eu vá!!!!

Aos amigos Simone Freitas, Edalton Silva, Nildmar Honório...amigos de toda uma vida... quem sabe até de outras, um dos laços mais fortes, mais fraternais..coisa de alma..amigos que fazem a aúrea ficar azul e a vida mais completa...que mesmo de longe fazem chegar até aqui uma força e uma segurança de marejar os olhos....Minha vida é mais feliz por saber que tenho vocês por “perto”...”*Por você faria isso mil vezes...*”

Ao Qualis A Cilada's Group International Research, em especial aos membros, Lilian Cruz, Jane Moreira, Vinícius Albano, Maria do Carmo Madu Madureira, Alípio, Mariana Lana, Marcelo de Liu, Riviane Bellenand, e ao nosso mentor espiritual Clóvis Neves, O Lobo do Mar... amigos tão queridos e bastante diferenciados, que me ensinaram o verdadeiro jeito mineiro de ser: a pagar pau para crispas de sol, a como ser mineiro na praia, a dar muito mais valor pra uma Itaipava -2°C, o verdadeiro sentido da palavra idiota, a como estar falando no gerúndio de uma forma bem sutil e descontraída...mas principalmente a ser muito mais feliz...é impossível não ser muito mais alegre e ficar muito mais leve perto de vocês!!!!...

Aos amigos que já passaram por aqui, mas que ficarão pra sempre no meu coração: Carina Mews, Marco Aurélio, Angela Almeida, César Francischetti, Helton Nonato, Marcos Lhano, Janina Carvalho,

Aos amigos do laboratório de Citogenética de Insetos, Danon Cledes, Maykon Passos e em especial a Luisa Campos por todo o incentivo, companheirismo e momentos de descontração no laboratório;

Aos queridíssimos alvinegros Rita e Carlinhos do eterno trailer, amigos fiéis e verdadeiros fornecedores de alegria dos nossos momentos de relaxamento na hora do cafezinho;

À querida figura ilustre de Viçosa, Moreira, vulgo Geraldo, por tantos momentos de muita alegria e socialização em seu tão aconchegante bar-da praça;

Agradeço à base de toda a minha vida...

À toda a minha família, minhas amadas avó e irmã, a todos eles... que sempre deixam tão claro o tanto de orgulho que sentem por mim, o quanto me amam, e que sempre estarão ao meu lado aconteça o que acontecer...minha família é como uma torcida organizada de um time de futebol muito legal...estão sempre lá, torcendo muito, sofrendo junto nos momentos mais complicados e dramáticos, nem piscam, mesmo a distância, mas quando acontece um lance sensacional, os gols, as vitórias, eles vibram, vibram muito, como se fosse com eles...e mesmo perdendo ou ganhando, eles estarão lá...sempre estarão lá!!!! Os meus amores!!!!

Aos amados Vivian Monte, Yasmin Monte, Iuri Monte, Maria Gabriela Monte, Pedro Henrique Monte, Karolina Monte... sobrinhos tortos... amor certo... meu lado materno exerço com eles... e meu lado criança também...

À espiritualidade amiga, ao grande poder soberano do Cosmos, que possui muitos nomes por aí, mas eu, particularmente, costumo chamar de Deus...agradeço por todas as bênçãos, todos os anjos enviados na forma de amigos, por toda a proteção e direção...Pela minha vida, feliz, alegre e muito abençoada!!!!

Enfim...

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, fizeram parte desta minha caminhada... deixando-a mais leve e feliz, ou me fazendo aprender a caminhar de uma forma mais dura... agradeço a todos que ajudaram a me tornar uma pessoa melhor!!!

BIOGRAFIA

Sílvia Menezes dos Santos, filha de Sylvio Antonio dos Santos (*in memorian*) e Magali Menezes dos Santos (*in memorian*), natural do estado do Rio de Janeiro, aos 25 de setembro de 1975. Em fevereiro de 2000, graduou-se em Ciência Biológicas pela Universidade do Grande Rio.

De junho de 1996 a dezembro de 2000 foi bolsista de iniciação científica no laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos – IOC/Fiocruz, sob a orientação do prof. Elias Seixas Lorosa.

No período de outubro de 2001 a novembro de 2003, cursou o mestrado no curso de Biologia Celular e Molecular – IOC/Fiocruz, sob orientação do Dr. François Noireau.

Em outubro de 2006 ingressou no curso de doutorado do programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade de Viçosa, submetendo-se a defesa de tese em outubro de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	20
RESULTADOS	21
CAPÍTULO 1	23
Abstract	24
Introduction	25
Material and Methods	27
Results	28
Discussion	30
References	35
CAPÍTULO 2	45
Abstract	46
Introduction	47
Material and Methods	48
Results	50
Discussion	51
References	55
CONCLUSÃO GERAL	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

SANTOS, Silvia Menezes dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Estudo citogenético de quatro espécies de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae).** Orientadora: Silvia das Graças Pompolo. Co-Orientadores: José Lino Neto, Jacenir dos Santos Mallet, Teresa Cristina Monte Gonçalves e José Eduardo Serrão.

A subfamília Triatominae possui descritas 141 espécies de triatomíneos (Juberg *et al.*, 2009; Schofield & Galvão, 2009), sendo todas capazes de transmitir o parasito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. Embora nem todas as espécies apresentem importância epidemiológica como transmissores desse patógeno, muitas são consideradas vetores secundários ou ocasionais, como acontece com *Triatoma vitticeps*, *Panstrongylus lutzi*, *Rhodnius pictipes* e *Rhodnius neglectus*. Em geral, os Heteropteros são caracterizados citogeneticamente por possuírem cromossomos holocêntricos onde o centrômero não possui diferenciação morfológica, e encontra-se distribuído ao longo do cromossomo. Como verificado no presente trabalho, *R. pictipes* apresentou número diplóide de 22 cromossomos, com 20 autossomos e dois sexuais denominados de XY, que manteve o padrão típico da tribo Rhodnini. Em *T. vitticeps* os resultados encontrados corroboram com aqueles da literatura, onde essa espécie apresentou número diplóide de 24 cromossomos e o sistema sexual observado foi $X_1X_2X_3Y$. O mesmo resultado foi encontrado em *P. lutzi*, a única espécie onde o sistema de cromossomos sexuais diferiu daqueles encontrados habitualmente neste gênero (X_1X_2Y). Os resultados encontrados nesse trabalho obtidos por bandeametno C, corroboram com a hipótese de que na Ordem Heteroptera os cromossomos apresentam pequenas quantidades de heterocromatina, e essas bandas são encontradas preferencialmente nas extremidades desses cromossomos. A partir deste estudo pode-se inferir que o maior nível de variação das características meióticas ocorreu em *Triatoma*, seguido de *Panstrongylus*, e a menor variação ocorreu em *Rhodnius*, que é um gênero bastante homogêneo em termos morfológicos e de comportamento meiótico. Estes resultados podem corroborar com a teoria de que *Panstrongylus* e *Triatoma* pertencentes a tribo Triatomiini, são gêneros mais próximos, e, por outro lado, divergentes de *Rhodnius*, tribo Rhodniini, de acordo com estudos realizados nos âmbitos molecular, enzimáticos, morfológicos e taxonômicos, assim como estudos ecológicos dentro da subfamília Triatominae.

ABSTRACT

SANTOS, Silvia Menezes dos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Cytogenetic study in four species of Triatominae (Heteroptera-Reduviidae)**. Adviser: Silvia das Graças Pompolo. Co-Advisers: José Lino Neto, Jacenir dos Santos Mallet, Teresa Cristina Monte Gonçalves and José Eduardo Serrão.

The subfamily Triatominae possesses 141 reported species (Juberg *et al.*, 2009; Schofield & Galvão, 2009), where all are capable of transmitting the parasite *Trypanosoma cruzi*, an etiological agent of Chagas disease. Although not all species present epidemiological importance as transmitters of this pathogen, many are considered secondary or occasional vectors, as occurs in *Triatoma vitticeps*, *Panstrongylus lutzi*, *Rhodnius pictipes* and *Rhodnius neglectus*. In general the Heteroptera are cytogenetically characterized by possessing holocentric chromosomes where the centromere do not show morphological differences, and are found distributed along the chromosome. As verified in the present study, *R. pictipes* presented a diploid number of 22 chromosomes, with 20 autosomes and two sex chromosomes denominated XY, which maintain the pattern typical for the tribe Rhodnini. In *T. vitticeps* the encountered results corroborate with those of literature, where this species presented a diploid number of 24 chromosomes and the observed sex system was $X_1X_2X_3Y$. Results encountered in this study for C banding agreed with the hypothesis that in the order Heteroptera the chromosomes present small quantities of heterochromatin, and these bands are preferentially encountered at the extremities of these chromosomes. From this study it can be inferred that the greatest level of variation in the meiotic characteristics occurred in *Triatoma* followed by *Panstrongylus*, and the smallest variation occurred in *Rhodnius* which is a quite homogeneous genus in morphological terms and meiotic behavior. These results may corroborate with the theory that *Panstrongylus* and *Triatoma* belonging to the tribe Triatomiini, are the closest genera, and on the other hand, divergent of *Rhodnius*, tribe Rhodniini, according to the performed molecular, enzymatic, morphologic and taxonomic studies, as well as ecological studies within the subfamily Triatominae.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Características gerais dos Triatomíneos e sua relação com a doença de Chagas

Os triatomíneos pertencem à Ordem Hemiptera, subordem Heteroptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Lent & Wygodzinsky, 1979). A Ordem Hemiptera compreende insetos com um par de asas anteriores do tipo hemiélitro, um par de asas posteriores membranosas e um aparelho bucal do tipo picador-sugador. Este grupo de insetos está incluso numa das Ordens mais antigas, cujos restos fossilizados foram datados entre 232 a 280 milhões de anos (Schofield, 1994).

Não se sabe ao certo o número de espécies que constituem esta Ordem, porém existem mais de 25.000 espécies descritas. Os membros da Ordem Hemiptera são diversificados em relação à morfologia e aos seus hábitos. Embora a maioria seja terrestre, existem muitas espécies que vivem e reproduzem-se no meio aquático. A maioria dos hemípteros são fitófagos, de importância para a agricultura, pois causam grandes danos ao cultivo de plantas (Schaefer & Panizzi, 2000). Outros possuem hábitos predadores, existindo ainda aqueles que são hematófagos que compreendem um pequeno grupo dentro dessa Ordem. Os triatomíneos são Reduviídeos de grande importância médica, pois se alimentam do sangue de vertebrados e são capazes de albergar em seu trato digestivo, consequentemente transmitir através de suas fezes, o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, agente etiológico da doença de Chagas.

Além dos triatomíneos, os cimiécidos (percevejos de cama) e os polictenídeos (ectoparasitas de morcegos) são também hematófagos, porém, não estão diretamente envolvidos na transmissão de patógenos ao homem. Atualmente a subfamília Triatominae está dividida em seis tribos baseado em características morfológicas: Triatomini, Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini, Alberproseniini e Linshcosteusini, subdividindo-se em 19 gêneros e 141 espécies válidas (Schofield & Galvão, 2009; Jurberg *et al.*, 2009), sendo todas elas potenciais transmissoras do parasito *T. cruzi*. No entanto, somente algumas espécies são consideradas bons vetores da doença de Chagas, devido ao alto grau de adaptação às habitações humanas, antropofilia, pequeno intervalo de tempo entre repasto e defecação, assim como bom desenvolvimento das formas infectantes do parasito no intestino do inseto. Segundo Sherlock *et al.* (1998), já foram relatadas 107 espécies natural ou experimentalmente infectadas por *T. cruzi*.

Os triatomíneos são facilmente identificados pela morfologia do seu rostro que se mantém fletida ventralmente sob a cabeça e o protórax. Essa estrutura é caracterizada por possuir uma conexão membranosa entre os 2º e 3º segmentos que permite uma flexão no ato de sugar, também por possuírem o abdômen com onze segmentos, lateralmente identificáveis, entre os tergitos e os esternitos, pelos conexivos, que permitem distender o abdômen acumulando maior quantidade de sangue em seus repastos (Rey, 1991).

A principal característica biológica dessa subfamília, como já mencionado anteriormente, é o hematofagismo (Lima, 1940). As fêmeas necessitam de repasto sangüíneo para o amadurecimento de seus folículos ovarianos (Rey,

1991), porém com relação aos machos, não se conhece qual a necessidade fisiológica do hematofagismo. Na epidemiologia da doença de Chagas, o fato de ambos os sexos, assim como todos os estágios de desenvolvimento serem hematófagos duplica o potencial de transmissão do patógeno pelos triatomíneos (Brenner & Andrade, 1979).

Os triatomíneos provavelmente evoluíram a partir de grupos de mais de uma linhagem de reduvídeos predadores. Inicialmente na sua evolução esses insetos se alimentavam de pequenos animais invertebrados que habitavam o ninho de aves como larvas de outros insetos e aranhas. É possível que, num primeiro momento, a hematofagia fosse opcional, onde eles se alimentavam desses vertebrados recém nascidos, uma vez que sua saliva ainda não possuía propriedades anestésicas. No entanto, ainda pode-se observar o comportamento predatório em algumas espécies de triatomíneos. Por exemplo, Lorosa e colaboradores (2000) observaram a manutenção do ciclo biológico completo em *Triatoma rubrovaria* e *Triatoma circummaculata*, exclusivamente alimentados de hemolinfa de baratas, evidenciando que os Triatominae sejam filogeneticamente descendentes de predadores. O comportamento de canibalismo também pode ser observado em triatomíneos, o que pode ser um estágio transicional entre hábitos predadores e hematófagos. Observações de ninfas se alimentando de outras ninfas em colônias de laboratório já foram feitas (Tartarotti et al., 2006). Tal comportamento de cleptohematofagia pode ocorrer em *Belminus herreri* que já foi observado sugando o sangue de espécimes do gênero *Rhodnius* recém alimentados. Todas essas observações reforçam a teoria de que esse grupo de insetos seja descendente de predadores, sugerindo também que a hematofagia é

uma característica recente nos triatomíneos e que as adaptações a esse hábito continuam ocorrendo (Tartarotti *et al.*, 2006).

As diferenças nos hábitos e na morfologia, entre os triatomíneos e outros reduvídeos predadores, são pequenas, o que pode corroborar com o argumento de que Triatominae seja um grupo recente (Tartarotti *et al.*, 2006). Adicionalmente, segundo Schofield e colaboradores (1999), a evolução da condição de insetos predadores para insetos hematófagos está intimamente ligada a uma gama de mudanças morfológicas, comportamentais e demográficas associadas com três fatores primordiais: exploração do sangue de vertebrado como fonte de alimentação, adaptação ao habitat do hospedeiro e a progressiva dependência do hospedeiro como um meio de dispersão pelo transporte passivo.

A doença de Chagas, que foi descrita por Carlos Chagas em 1909, continua sendo um dos maiores problemas sanitários da América Latina, embora as medidas de controle baseadas na eliminação de colônias domésticas e peridomésticas dos vetores e a vigilância dos bancos de sangue tenham conseguido diminuir a incidência de aproximadamente 70% nos países do Cone Sul. A doença continua afetando mais de 15 milhões de pessoas, e aproximadamente 60 milhões de pessoas vivem em áreas de risco na América Latina (WHO/CTD, 2003). No Brasil, estima-se que mais de quatro milhões de pessoas encontram-se infectados pelo parasito *T. cruzi* numa área endêmica que se estende do Piauí ao Rio Grande do Sul (Vinhaes & Dias, 2000).

A doença de Chagas pode ser considerada uma antroponose resultante das alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente e das desigualdades econômicas. Segundo Vinhaes & Dias (2000), o parasito *T. cruzi* vivia restrito ao

ambiente silvestre, circulando entre mamíferos através do processo alimentação/defecação do inseto vetor ou também, muito comumente, por via oral, ou seja, pela ingestão de triatomíneos e mamíferos infectados. O homem ao invadir esses ecótopos, se incluiu no ciclo epidemiológico da doença, oferecendo a esses hemípteros abrigos propícios à sua instalação, como, por exemplo, casas de pau-a-pique e lugares de criação de animais como galinheiros e currais. As condições econômicas e sociais associadas à moradia e educação precárias sugerem a dimensão social desse problema de saúde pública.

Todos esses processos contribuíram para que os triatomíneos apresentassem uma ampla distribuição geográfica, principalmente no Continente Americano, onde se tem relato de espécies desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina, com forte incidência no Brasil. Algumas espécies de triatomíneos também podem ser encontradas em partes da África, Ásia e Austrália, embora elas não tenham importância epidemiológica, já que não há registros de *T. cruzi* no velho mundo (Schofield, 1994).

Várias espécies de triatomíneos adaptaram-se ao domicílio humano, tornando-se assim exponenciais vetores do *T. cruzi*. O controle da doença de Chagas depende primariamente da interrupção do ciclo de transmissão pela eliminação das populações domésticas das principais espécies vetoras. O sucesso das intervenções de controle é potencializado por algumas características básicas dos triatomíneos que os tornam especialmente vulneráveis, como por exemplo, eles são insetos de reprodução lenta, com pouca capacidade de dispersão e também apresentam baixa variabilidade gênica populacional (Noireau *et al.*, 2005).

Segundo Dias e Diotaiuti (1998), conforme sua importância epidemiológica os triatomíneos podem ser classificados dependendo do grau de associação com o homem. De acordo com esses autores as espécies definidas como primárias, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma infestans*, colonizam permanentemente as habitações humanas, usualmente em alta densidade, são claramente antropofílicas e apresentam significativo índice de infecção natural por *T. cruzi*. Além dos vetores primários, muitas outras espécies de triatomíneos têm mostrado tendência sinantrópica, sendo assim, de acordo com a amplitude da sua área de distribuição, seu potencial de colonização das habitações humanas e comprovada capacidade vetorial, essas espécies originalmente silvestres são denominadas espécies secundárias, como *Triatoma brasiliensis* e *Panstrongylus megistus*, ou candidatas vetoras como *Triatoma sordida* e *Triatoma pseudomaculata*. As espécies secundárias são geralmente autóctones da região e capazes de invadir e colonizar as habitações na ausência de espécies primárias (Dias e Diotaiuti, 1998). Sendo nativas e ubíquas, elas ocupam geralmente ecótopos naturais e artificiais perto das casas, estando associadas a animais silvestres e peridomésticos e exibem diferentes graus de antropofilia. Em situações particulares, elas podem fundar grandes colônias dentro dos domicílios, sendo eficazes vetoras na transmissão do *T. cruzi* ao homem. As espécies candidatas vetoras invadem as estruturas do peridomicílio, mas não são capazes de colonizar as habitações humanas, dessa forma o mecanismo de adaptação desses insetos aos ecótopos artificiais continuam pouco conhecidos, embora as mudanças ambientais causadas pelo homem e que conseqüentemente danificam os ecótopos

naturais dos triatomíneos, pareça promover a dispersão desses insetos e favorecer o processo sinantrópico das espécies silvestres (Noireau *et al.*, 2005).

Triatoma infestans (Klug, 1834) foi por muitos anos a principal espécie vetora da doença de Chagas no Brasil. Isto se deve, principalmente, pela sua íntima associação com habitações humanas. Devido a esse fato, uma série de ações, que tinham como objetivo eliminar esse vetor primário da doença de Chagas, tanto do ambiente doméstico quanto do peridoméstico, e controlar a transmissão transfusional desta doença, foram estabelecidas através da colaboração entre o Brasil e mais cinco países sul americanos (Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai). Este programa criado em 1991 foi denominado Iniciativa do Cone Sul para eliminação do *T. infestans* (Dias & Schofield, 1999; Schofield, 2000).

De 1991 a 1997 as ações de controle sobre *T. infestans* obtiveram um impacto evidente sobre a transmissão da doença de Chagas em uma série de localidades antes consideradas altamente endêmicas. No Brasil o programa alcançou sucesso marcante, com dez dos doze estados endêmicos do país com a transmissão vetorial e transfusional controladas (WHO, 2001). Estes resultados apresentaram índices econômicos significativamente positivos sob o ponto de vista médico e social (Dias & Schofield, 1999). Entretanto, o impacto sobre as demais espécies de triatomíneos foi menos satisfatório, permitindo que algumas delas reinfestassem as habitações tratadas (Vinhaes & Dias, 2000). Nos anos recentes houve um aumento nos relatos de outras espécies colonizando domicílios e na maioria dos casos essa nova infestação envolve espécies

secundárias, anteriormente consideradas características do ambiente silvestre (Schofield *et al.*, 1999).

Essas espécies de origem silvestre e que são atualmente capturadas em ambiente domiciliar, assumem importância epidemiológica na transmissão humana da doença de Chagas, como acontece com *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964. Esta espécie representa 24% dos triatomíneos capturados no nordeste brasileiro, o que evidencia sua importância epidemiológica naquela região considerada como o seu epicentro de dispersão (Vinhaes & Dias, 2000).

A profilaxia da doença de Chagas pode ser otimizada quando associada a dados biológicos desses insetos, que informam sobre a distinção entre espécies silvestres de baixo risco e espécies domiciliadas nocivas, hábitos e horários de hematofagia, capacidade reprodutiva, resistência a inseticidas, ciclo evolutivo, reservatórios silvestres e domésticos do agente etiológico, bem como as interrelações entre espécies e gêneros estudados no contexto evolutivo, por meio de ensaios citogenéticos que comparam padrões cromossômicos que podem ser aplicados à filogenia dos triatomíneos.

1.2 Citogenética na subfamília Triatominae

Triatominae é um grupo de espécies hematófagas com excepcional interesse citogenético (Lent & Wygodzinsky, 1979). Os cromossomos de heteropteras são caracterizados como holocêntricos por não possuírem centrômeros com diferenciação morfológica, esse se encontra distribuído ao longo do cromossomo. E, ainda, uma forma não usual de meiose, onde a segregação dos cromossomos

sexuais é pós-reducional (Barth, 1956; Ueshima, 1966). Esse tipo de cromossomo foi definido de acordo com seu comportamento durante estudos de fragmentação com raios X em *Euchistus tritigmus*, *Euchistus servus* e *Solubea pugnas* (Pentatomidae, Heteroptera), onde os autores constataram alta incidência de rearranjos estruturais, e passaram a observar o comportamento desses fragmentos durante a meiose. Dessa forma, eles observaram que esses fragmentos se mantinham no complemento cromossômico ao longo de muitas gerações de espermatogônias e que, fragmentos livres também eram capazes de participar das divisões meióticas, esses resultados indicam que esses fragmentos cromossômicos se perpetuavam durante a meiose, evidenciando a natureza holocêntrica destes. Deve-se ressaltar ainda, o fato de que em cromossomos monocêntricos, fragmentos acêntricos regularmente falham na sua orientação na placa metafásica (Hughes-Schrader & Schrader, 1961).

Buck (1967) observou, através de estudos de microscopia eletrônica, que os cromossomos mitóticos em *Rhodnius prolixus* apresentam um cinetócoro com a superfície lisa ao longo de toda a cromátide. Os microtúbulos são inseridos ao longo deste cinetócoro e as cromátides-irmãs segregam em paralelo durante a anáfase mitótica (movimento holocinético). O comportamento meiótico, por outro lado, apresenta diferenças notáveis. Estudos ultraestruturais revelaram que os cinetócoros estão ausentes e os microtúbulos são inseridos diretamente na cromatina. Nas primeira e segunda divisões, a atividade cinética está restrita ao final do cromossomo (Schrader, 1935; González-García *et al.*, 1996).

Tradicionalmente, os complementos de cromossomos de Triatomíneos são descritos de acordo com seu número e tamanho (Ueshima, 1966; 1979), apesar

da natureza holocêntrica desses cromossomos e seu pequeno tamanho dificultarem a detecção de reordenamentos ou mudanças em sua estrutura. Considerando o número cromossômico, estes insetos constituem um grupo muito homogêneo, já que o número diplóide ($2n$) de cromossomos possui pouca variação (21 a 25 cromossomos nos machos). A maioria dos triatomíneos estudados apresentaram 20 autossomos, com exceção de três espécies: *Panstrongylus megistus* e *Triatoma nitida* que possuem 18, e *Triatoma rubrofasciata* que possui 22 autossomos. Esta última é a única com origem no velho mundo, sendo morfologicamente bem diferente das demais espécies analisadas até o momento (Dujardin *et al.*, 2000).

A variação no número de cromossomos em triatomíneos se deve principalmente a presença de distintos sistemas sexuais. Múltiplos sistemas de cromossomos sexuais é muito comum na ordem Heteroptera, em relação a outros grupos de insetos, o que pode estar relacionado ao fato desses cromossomos serem holocêntricos. Quando acontecem múltiplos sistemas sexuais em insetos, como nas ordens Orthoptera e Díptera, usualmente existe uma tendência a diminuir o número de autossomos, assim como aumentar o número de cromossomos sexuais. Mas em Heteroptera, não há aparente relação entre o número de autossomos e a presença de múltiplos mecanismos de cromossomos sexuais (Ueshima, 1966). Na evolução dos mecanismos sexuais, o papel da fragmentação foi levantado por Ueshima (1966), sugerindo que esse rearranjo é a maior fonte de aparecimento desses diferentes mecanismos sexuais em Heteroptera. Hughes-Schrader & Schrader (1961) induziram artificialmente fragmentos de cromossomo sexuais em Pentatomidae, dando suporte a idéia que

uma simples fragmentação está envolvida na evolução de um sistema sexual múltiplo.

A subfamília Triatominae apresenta, em machos, três sistemas sexuais: XY, X_1X_2Y e $X_1X_2X_3Y$, sendo que um quarto mecanismo sexual ($X_1X_2Y_1Y_2$) foi sugerido para *Mepraia spinolai* (Frías & Atria, 1998). Em *Triatoma* os sistemas sexuais são variáveis, apresentando os três primeiros mecanismos. Por outro lado, as espécies, até o momento analisadas, pertencentes aos outros gêneros apresentam um único mecanismo. Como acontece com as espécies de *Rhodnius* (sistema XY), *Panstrongylus* e *Eratyrus* (sistema X_1X_2Y) (Panzer et al., 1998).

Ueshima (1979) sugere que 22 (20 autossomos + XX/XY) seja o número primitivo dentro dessa subfamília, e que as fissões e fusões cromossômicas são os mecanismos que originam espécies com distintos números de autossomos e cromossomos sexuais. A ocorrência de fusões detectada pela primeira vez em Triatominae foi em um indivíduo de *Mepraia gajardoi* (Perez et al, 2004). A relativa homogeneidade do complemento cromossômico em Triatominae parece indicar que rearranjos em cromossomos nessa subfamília não são tão comuns. A natureza holocêntrica e a diferença de comportamento nos autossomos e cromossomos sexuais em triatomíneos resultam em cromossomos com má funcionabilidade em indivíduos com rearranjos, que aumenta o número de gametas não viáveis nesse grupo (Pérez et al, 2004).

Até agora as técnicas de bandeamento e o estudo do comportamento cromossômico durante a prófase meiótica têm sido de grande valia para uma análise profunda deste grupo cariologicamente homogêneo. Especialmente importante é o estudo das regiões heterocromáticas, revelado pela técnica de

bandeamento C (Summer, 1972). Essas regiões estão presentes num grande número de espécies de plantas e animais, como blocos heterocromáticos fixos ou polimórficos, distribuídos através do genoma (King, 1993). As espécies de triatominae são um exemplo típico (Schreiber & Pellegrino, 1950; Panzera *et al.*, 1995, 1997; Pérez, 1996). Um caráter comum as espécies estudadas até agora é a presença de heterocromatina no cromossomo Y. Além disso, algumas espécies têm heterocromatina em autossomos e no cromossomo X. A presença de C-heterocromatina autossômica é particularmente comum nas espécies de *Triatoma*. O total de heterocromatina autossômica varia de 0%, sendo o cromossomo Y o único heterocromático, a 45% do complemento, como observado em *Triatoma delpontei* (Panzera *et al.*, 1995). Diferenças no padrão obtido com banda C incluem a presença de um número variável de autossomos com regiões heterocromáticas, bem como a distribuição de bandas C com diversos tamanhos em um ou ambos extremos do cromossomo (Panzera *et al.*, 1992, 1995, 1997).

A heterocromatina também influencia no comportamento meiótico e mitótico do cromossomo. Na primeira prófase meiótica, as regiões heterocromáticas se associam formando cromocentros (Solari, 1979; Panzera *et al.*, 1992, 1995). Na maioria das espécies há um único cromocentro formado exclusivamente pelos cromossomos sexuais. Em outras espécies, autossomos participam em números e arranjos variáveis formando um ou vários cromocentros. Esta variação é usada como um marcador cromossomal importante para caracterizar diferentes espécies.

1.3 Meiose invertida em Heteroptera

A primeira divisão meiótica em sistemas monocêntricos é caracterizada pela orientação bipolar dos bivalentes com os dois cinetócoros irmãos migrando para o mesmo pólo, dessa forma, a primeira divisão meiótica é reducional. Subsequentemente, durante a segunda divisão meiótica, cinetócoros irmãos de um dos bivalentes orienta-se para pólos opostos e segregam equacionalmente. Esta sequência, que é considerada padrão, não é seguida por todas as espécies. Em muitas espécies de Heteroptera, essa sequência meiótica é invertida para os cromossomos sexuais. Os univalentes sexuais segregam equacionalmente durante a primeira divisão meiótica e reducionalmente na segunda. Não se sabe, até o momento, se essa sequência é seguida pelos autossomos, e os resultados até então obtidos, são baseados em observações especulativas (Pérez *et al.*, 1997).

Na metáfase I, os cromossomos sexuais se separam e não formam um verdadeiro bivalente, uma vez que não há presença de quiasmas entre eles. Aparentemente, seu eixo longo fica perpendicular a placa equatorial. Desse modo, as cromátides de cada cromossomo sexual migram para os pólos opostos na anáfase I, caracterizando uma segregação equacional. Na prometáfase II, as cromátides podem ser observadas individualizadas, entretanto, apresentam uma associação “ponta-a-ponta” na metáfase II, com seus eixos longos perpendiculares à placa equatorial, formando um pseudobivalente. Então, a segregação de cada cromossomo sexual para os pólos opostos acontece na anáfase II (Pérez *et al.*, 1997)

As observações feitas por Pérez e colaboradores (1997) corroboram com os resultados para outras espécies de heterópteros. Por outro lado, os autosossomos não seguem a mesma sequência de meiose que caracteriza os univalentes sexuais. Eles se comportam de uma maneira similar aos cromossomos monocêntricos. Assim, o modo alternativo de segregação observado na anáfase I deixa claro que a clássica distinção entre segregação reducional e equacional não é aplicado nesse caso. Os cromossomos holocêntricos com atividade cinética restrita nem sempre reduzem o mesmo segmento cromossômico como os cromossomos monocêntricos. Isso depende de qual extremidade cromossômica está dirigida a segregação dos bivalentes na anáfase I.

É importante ressaltar que as combinações genéticas resultantes, tanto da sequência padrão quanto daquela descrita para heterópteros são a mesma. Dessa forma, nenhuma delas oferece aumento na variabilidade meiótica. Assim, algumas espécies de heteróptera desenvolveram um mecanismo meiótico especial que produz os mesmos resultados daqueles presentes em espécies com cromossomos monocêntricos. Nesses sistemas, a sequência de segregação cromossômica através da meiose não é um evento meiótico fundamental. Existem sugestões de que seja necessária a supressão de estruturas cinetocóricas em heterópteros para permitir a terminalização dos quiasmas (Comings & Okada, 1972). Entretanto, em *T. infestans* essa terminalização não ocorre, existindo dois diferentes modos de orientação dos bivalentes na metáfase I. Sendo assim, a ausência de estruturas cinetocóricas em cromossomos holocêntricos meióticos não está fundamentalmente associada a terminalização dos quiasmas. A perda de cinetócoros em posições estabelecidas nos cromossomos permite duas possíveis

orientações dos bivalentes durante a primeira divisão meiótica. Essa situação possibilita a alternância da atividade cinética nas duas extremidades durante ambas as divisões meióticas (Pérez *et al.*, 1997).

1.4 Citotaxonomia em Triatominae

A citogenética pode ser utilizada para a análise de populações de uma mesma espécie ou de espécies com graus variados de similaridade. Em triatomíneos este tipo de análise tem permitido diferenciar populações de *T. infestans* (Panzer *et al.*, 1992). Essa espécie mostra uma variação muito acentuada na quantidade de heterocromatina, que reflete em seu conteúdo de DNA. Na Bolívia, as populações andinas mostram um elevado percentual de heterocromatina (40-50% do complemento cromossômico), localizada em quase todos os seus 22 cromossomos. Por outro lado, as populações não andinas mostram menor quantidade heterocromática (24-30%), distribuídas em três pares cromossômicos e no cromossomo Y. Outros estudos também foram realizados com essa espécie, como a análise de 170 espécimes de *T. infestans* do Uruguai que levou a caracterização e diferenciação de populações naturais. Esta variação envolve diferenças na quantidade e localização das bandas C nos três maiores pares autossômicos, produzindo diferenças estatisticamente significativas nas frequências de alguns padrões cromossômicos do sudoeste (Região 1, fronteira com Argentina), e nordeste (Região 2, fronteira com Brasil) daquele país (Panzer *et al.*, 1992; Pérez, 1996).

Os estudos citogenéticos de populações de *T. infestans* tornaram-se muito importantes pela sua alta incidência como vetor da doença de Chagas e sua ampla distribuição geográfica. Análises de populações naturais do Paraguai e criação de laboratórios da Argentina, Brasil e Chile revelaram uma ampla variação da heterocromatina C nessa espécie (Arias *et al.*, 1990; Pérez *et al.*, 1991).

Esta variação de bandas C entre essas populações estaria vinculada a mudanças ambientais e de comportamento relacionadas ao processo de domiciliação desse inseto (Panzera *et al.*, 1992). Outro caso de variação populacional foi detectado em *Panstrongylus geniculatus*, onde as populações provenientes de diferentes estados da Colômbia são extremamente polimórficas (Pérez *et al.*, 2002). Variações intraespecíficas também foram relatadas em *Mepraia spinolai* (Schofield *et al.*, 1998).

Além de detectar a variação intraespecífica, também já foi observada diferenciação de espécies e tendências evolutivas, através de análises detalhadas do comportamento dos cromossomos meióticos e técnicas de bandeamento dentro da subfamília Triatominae (Panzera *et al.*, 1996). A variação cromossômica detectada em *Triatoma sordida* foi um indicativo de sua heterogeneidade como espécie, e utilizada como argumento para elevar em nível de espécie uma população de *T. sordida*, denominada atualmente de *Triatoma garciabesi* (Panzera *et al.*, 1997; Jurberg *et al.*, 1998). Por outro lado, a citogenética pode ser utilizada para corroborar com o *status* de espécie de alguns grupos incertos, tal como *T. patagonica*, ou para sugerir o *status* subespecífico, como em *Triatoma melanosoma* (Monteiro *et al.*, 1999), ou em *Panstrongylus herreri* e *Panstrongylus lignarius* (Pérez *et al.*, 2002).

Os estudos citogenéticos são também importantes para identificar fenômenos de hibridização na natureza, particularmente em ambientes modificados pelo homem. Esses híbridos apresentam cromossomos heteromórficos, como consequência da divergência cariotípica das espécies parentais, e muitos deles exibem alterações em sua fertilidade como resultado de erros na segregação meiótica (Scvortzoff *et al.*, 1995).

É interessante destacar que as características citogenéticas parecem ser independentes de certas variações morfológicas intraespecíficas que podem dificultar a identificação de determinada espécie. As análises de Panzera e colaboradores (1995) permitiram identificar, em populações da Bolívia, como *T. delpontei*, uma espécie de havia sido classificada erroneamente como *T. platensis*. Apesar de sua semelhança morfológica e a presença de determinadas áreas de indivíduos com caracteres intermediários, suas características cromossômicas são estáveis e completamente diferentes entre ambas as espécies. Esses resultados foram confirmados por estudos isoenzimáticos mostrando a eficácia da análise citogenética na solução de problemas taxonômicos e evolutivos (Pereira *et al.*, 1996).

Outras técnicas de citogenética, como coloração com fluorocromos e hibridização *in situ*, poderiam fornecer novas informações para esclarecer a relação taxonômica e filogenética entre as espécies de triatomíneos. Estes estudos tem sido complementados recentemente pela medição da quantidade de DNA por citometria de fluxo e pela identificação molecular das sequências de DNA associadas com as regiões heterocromáticas (Pérez *et al.*, 2003). Toda essa

variabilidade permite utilizar a citogenética como uma forte ferramenta para realizar estudos taxonômicos e evolutivos.

1.5 Evolução Cromossômica em Triatominae

A análise global das características citogenéticas em Triatominae corrobora a hipótese de que existam distintas linhagens cromossômicas dentro desse grupo de insetos. Por exemplo, as características cromossômicas similares entre as espécies da tribo Rhodniini, a qual inclui os gêneros *Psammolestes* e *Rhodnius*, sugerem uma origem monofilética para essa tribo. Pelo contrário, no gênero *Triatoma*, a extensa variação observada em distintos caracteres cromossômicos apóia a existência de diferentes linhas de evolução, com graus muito variáveis de diferenciação cromossômica, segundo o grupo de espécies já estudado. O gênero *Panstrongylus* mostra uma variação maior que a apresentada pela tribo Rhodniini, porém menos acentuada que aquela detectada em *Triatoma* (Pérez *et al.*, 2002).

As análises citogenéticas indicam que diferentes grupos de triatomíneos podem mostrar taxas de evolução cromossômica muito variáveis, as quais poderiam estar ligadas a diferentes tempos de divergências, a distintas pressões e/ou adaptações ecológicas sobre suas populações, ou, até mesmo a propriedades intrínsecas de seus próprios cariótipos. Alguns grupos estreitamente relacionados apresentam uma grande similaridade ou identidade total em suas características cromossômicas, como acontece nas espécies do complexo “*phyllosoma*”, e aquelas dos complexos “*brasiliensis*”, “*guazu*” e “*rubrovaria*” (Panzera *et al.*,

2000). Por outro lado, outros grupos de espécies filogeneticamente próximos apresentam divergências cromossômicas, como é o caso das espécies do complexo “protacta” e do complexo “infestans” (Panzeria *et al.*, 1995).

Finalmente, é necessário enfatizar que a maioria dos agrupamentos de espécies se baseia na análise de caracteres morfológicos, os quais não necessariamente refletem parentesco evolutivo (Dujardin *et al.*, 1999). Sendo assim, com o intuito de estabelecer os grupos de espécies filogeneticamente relacionadas, e compreender a evolução desse importante grupo de insetos de interesse médico, é necessário realizar análises citogenéticas, conjuntamente com estudos morfológicos, biogeográficos, ecológicos e moleculares.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar o ciclo meiótico dos cromossomos holocêntricos em espécies da subfamília Triatominae, pertencentes aos principais gêneros de importância epidemiológica.

2.2 Específicos

2.1.1 Analisar comparativamente as diversas fases da espermatogênese em espécies de triatomíneos, utilizando a técnica citogenética de coloração convencional;

2.1.2 Analisar e comparar o padrão de distribuição das regiões de heterocromatina nos cromossomos meióticos das espécies estudadas, através da técnica de bandeamento C;

2.1.3 Buscar, por meio da correlação de diferenças e semelhanças da estrutura cromossômica, o entendimento dos processos de evolução e adaptação ocorridos nos três principais gêneros de Triatominae.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo, foram dispostos na forma de três capítulos:

Capítulo 1:

Meiotic behavior of sex chromosomes in three species of Triatominae (HETEROPTERA-REDUVIIDAE). Submetido para o periódico *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

Capítulo 2:

Variation of heterochromatin in three Triatominae species (Reduviidae: Heteroptera) using the C banding technique. Submetido para o periódico *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*

Capítulo 1

Meiotic behavior of sex chromosomes in three species of
Triatominae (HETEROPTERA-REDUVIIDAE).

Meiotic behavior of sex chromosomes in three species of Triatominae (HETEROPTERA-REDUVIIDAE)

Silvia Menezes dos Santos¹, Teresa Cristina Monte Gonçalves², Jacenir Reis dos Santos-Mallet², Silvia das Graças Pompolo³

¹Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Universidade Federal de Viçosa. Avenida PH Rolfs, s/n Campus Universitário, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil ²Setor de Entomologia Médica e Forense, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz ³Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa

Financial support: Capes

+ Corresponding author: silvia.santos@ufv.br

Abstract

Triatominae are characterized by the holokinetic nature of their chromosomes, where the centromere does not possess morphological differentiation, encountered distributed along the chromosome. Various studies have demonstrated intra- and inter-specific variations utilizing cytogenetics and the detailed analysis of the chromosomal behavior during meiosis. Among Triatominae, various characteristics such as the chromosomal number, system of sex determination and comparative size of the autosomes has showed to be useful for differentiation of species. In this study, the meiotic cycle of three Triatominae species was characterized, *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923), *Rhodnius pictipes* Stål, 1872 and *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) by means of conventional staining with Giemsa, with the intent of contributing to the better understanding of the chromosomal behavior of the group. The genus *Triatoma* showed a greater cytogenetic variation, followed by *Panstrongylus*, and *Rhodnius* presented the smallest variation, which may characterize it as a homogenous genus both in morphological aspects as meiotic behavior.

Keywords: *Panstrongylus lutzi*, *Rhodnius pictipes*, *Triatoma vitticeps*, meiotic behavior, molecular taxonomy.

Introduction

The subfamily Triatominae possesses 141 reported species (Jurberg et al. 2009, Schofield & Galvão 2009), where all are capable of transmitting the parasite *Trypanosoma cruzi*, an etiological agent of the Chagas disease. Although not all species have epidemiological importance in transmission of his pathogen, many are considered secondary or occasional vectors (Schofield et al. 2006).

Among these, *Triatoma vitticeps* (Stål 1859), which occurs in regions of the Atlantic rainforest is frequently encountered in the domicile presenting high rates of infection of this parasite (Dias et al. 1989, Gonçalves et al. 1998, Santos et al. 2005).

Panstrongylus lutzi (Neiva & Pinto 1923) species native of the Caatinga (Brazilian Northeast), where it is considered a peridomestic species, since are often found in chicken coops. Despite the fact that species could be found inside the buildings, until the moment there were no records about their colonization inside the houses (Freitas et al. 2004).

Different from these species, *Rhodnius pictipes* Stål 1872 is considered a wild species, endemic of the Brazilian Amazon region, where it inhabits palm trees and via dispersion by flight invades homes, attracted by the light for feeding; this behavior is considered the principal source of the transmission of Chagas disease in the region (Coura et al. 1999, Abad-Franch et al. 2005, Fé et al. 2009).

In general, Heteroptera are cytogenetically characterized by the holokinetic nature of their chromosomes, where the centromere does not has morphological differentiation and is encountered distributed along the chromosome, in this case,

holocentric chromosomes (Hughes Schrader & Schrader 1961, Pérez et al. 2000). In the majority of this group, these chromosomes show a peculiar behavior during meiosis, in which the first meiotic division is reductional for the autosomes and equational for the sex chromosomes (Ueshima 1966, González-García et al. 1996).

The majority of studies involve comparative investigations by means of conventional staining of the Triatominae chromosomes. The considered criteria for comparison are basically the number and morphology of the chromosomes, as well as its disposition in the metaphase plate. Data resulting from these investigations provide essential support in respect to the chromosomal evolution of these insects.

The fomentation of cytogenetic techniques and the detailed analysis of chromosome behavior during meiosis have provided characteristics for differentiation among species, intra and interspecific variations, as well as relative evolutionary studies (Panzera et al. 1992, Panzera et al. 1995). Several characteristics such as the chromosome number, the sex determination system and the comparative size of autosomes have shown to be used for to differentiate Triatominae species. The analysis of such characteristics allowed the differentiation of morphologically similar species such as those belonging to the complex *maculata*, where *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma arthurneivai* were separated base on the differentiated meiotic behavior of their chromosomes (Santos et al. 2007).

The objective of the present study was to characterize the meiotic cycle of three triatominae species *P. lutzi*, *T. vitticeps* and *R. pictipes*, with the intention of contributing to a better understanding of chromosomal behavior of the group.

Material and Methods

Specimen of *P. lutzi*, *R. pictipes* and *T. vitticeps*, were obtained from colonies maintained at the Laboratory of Leishmaniosis Transmitters, Sector of Medical and Forensic Entomology, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, respectively from the cities of Várzea Alegre (CE), Rio Bonito (RJ) and Oriximiná (PA).

For the cytogenetic study the gonads of ten individuals of each species were analyzed, including fifth stage nymphs, whose sex was determined by the genital plates, being adult males. The preparation of testicle sections was done according to the methodology adopted from Imai et al. (1988), employed for the first time in insects with holocentric chromosomes. The dissection of the insects was made under a stereomicroscope for removal of the testicle in a physiological Ringer solution for insects to avoid dryness of the structure. The material was transferred to a clean histological slide in an inclined position for removal of the Ringer solution, and drops of the fixative solution I (water: ethanol: acetic acid, 4:3:3) were applied; the slide was transferred to a stereomicroscope, two drops of fixative solution I were applied over the organ and its dissociation was initiated with the aid of two stiletos; before complete drying of the material, two drops of the fixative solution II (ethanol: acetic acid, 1:1) were added to the material

followed by two drops of fixative solution III (100% acetic acid). For removal of the excess of each fixative solution, pieces of filter paper were positioned along the border of the slides. The slides were dried at room temperature and after 24 hours stained with Giemsa, diluted in Sörensen buffer pH 6.8 (1:30, respectively), for five minutes at room temperature to obtain the meiotic profile of each species.

The meiotic figures were observed and captured with the aid of an Olympus BX 60 microscope, with objective of 100X linked to a Q Color 3 Olympus® image capturing system.

Results

Panstrongylus lutzi – Showed a diploid number of 24 chromosomes, with 20 autosomes and four sex chromosomes denominated $X_1X_2X_3Y$. During meiotic prophase I, the sex chromosomes remained close to one another forming four heteropycnotic chromocenters in zygotene (Fig.1A) or a single chromocenter in pachytene and diplotene (Fig.1B and C). Still in the diplotene phase, all bivalent autosomes show evident chiasmata (Fig.1C). In metaphase I the four sex chromosomes are shown separated: the three X chromosomes were the smallest and were isopycnotic in relation to the Y chromosome (Fig. 1D). The autosomes have two larger bivalents, where the rest showed no significant difference in size. In anaphase I, an equational segregation for sex chromosomes and a reductional segregation was observed for the autosomes (Fig.1E). In metaphase II (Fig.1F)

the sex chromosomes showed to be associated in the center of the metaphase plate.

Rhodnius pictipes – Showed a diploid number of 22 chromosomes, with 20 autosomes and two sex chromosomes denominated XY. In zygotene (Fig. 2A) and pachytene (Fig. 2B) two positive constituent heteropycnotic chromocenters are observed, not associated with any autosome. This characteristic is maintained until diplotene (Fig. 2C), in which the sex chromosomes are invariably associated and more condensed in relation to the bivalent autosomal bivalents. The chiasmata can be seen in only some bivalents (Fig. 2C). In metaphase I, the sex chromosomes are separated and located in the vicinity of the spindle, where the Y chromosome can be distinguished, smaller in relation to the X chromosome (Fig. 2D), which appears to be heteropycnotic. The autosomes show no large variation in size. In metaphase II the sex chromosomes are located in the center of the ring forming a pseudo-bivalent, each with one chromatid (Fig. 2E). In anaphase II the autosomes have a slower migration in direction of the poles of the cell in relation to the sex chromosomes (Fig. 2F).

Triatoma vitticeps – Showed a diploid number of 24, with 20 autosomes and four sex chromosomes denominated $X_1X_2X_3Y$. From the beginning of meiotic prophase I (Fig. 3A) until the end of diplotene (Fig. 3C) a single heteropycnotic chromocenter formed by the association of the sex chromosome was observed, which apparently appears to be the union of two or three pairs of autosomes; still in this phase chiasmata in all bivalents is verified (Fig. 3C). In Figure 3B a small decondensation of the autosomal bivalents is observed, characterizing the diffuse stage. In this stage the nucleus increases in size and the sex chromosomes remain

highly condensed. In metaphase I the four sex chromosomes are clearly visible and separated in the vicinity of the spindle (Fig. 3D). The three X chromosomes are smaller than the chromosome complement (Fig. 3D), maintaining a stability in size between its autosomes and showing only one bivalent greater than the others. Metaphase II (Fig. 3E) exhibits a typical disposition of the autosomes in the ring with the four sex chromosomes in the center forming a pseudo-tetravalent. In anaphase II (Fig. 3F), the X and Y chromosomes migrate to opposite poles of the cell.

Discussion

Insects of the orders Heteroptera and Lepidoptera, as well as other taxonomic groups including Nematoda and some arachnids, has a special chromosome type known as holocentric chromosomes, which show various differential characteristics in relation to its orientation and segregation during meiosis (Pérez et al. 1997). Cytogenetic studies done with insects of the subfamily Triatominae have shown to be very effective tools for understanding the taxonomy and systematics of this group, despite the holocentric nature of these chromosomes and their small size which complicate the detection of rearrangement or changes in its structure (Pérez et al. 2003).

Analysis of the cytogenetic characteristics of Triatominae supports the hypothesis of existence of two distinct chromosomal lines within these subfamily. For example, the similar chromosomal characteristics between species

of the tribe Rhodniini, and this includes the genera *Psammolestes* and *Rhodnius*, suggesting a monophyletic origin for this tribe (Crossa et al. 2002). However, in the genus *Triatoma*, an extensive variation is observed in distinct chromosomal characteristics suggesting that there are different lines of evolution, with extremely different degrees of chromosomal differentiation depending on the group of species considered. In Triatominae, the number of autosomes is very homogeneous, only three of the 70 species studied yet do not showed the autosomal complement typical of 20 autosomes: *Panstrongylus megistus* and *Triatoma nitida* reduce their autosomes to 18 and *Triatoma rubrofasciata* increase to 22 (Dujardin et al. 2000). This suggests that 20 autosomes would be the probably state in the immediate ancestral of the group and that chromosomal rearrangements with fissions and fusions modified the autosomal complement of this species (Ueshima 1966). *T. vitticeps*, *R. pictipes* and *P. lutzi*, the species studied in the present work, presented 20 autosomes in their respective chromosomal complements, the same number as the majority of species making up this group.

The variation in the chromosomal number is principally due to the presence of distinct systems of sex determination (Panzera et al. 1998, Ueshima 1966). Relative homogeneity of the chromosomal complement of Triatominae indicates that chromosomal rearrangements are not very common within this subfamily, and that other systems are produced from the fragmentation of the original X chromosome (Pérez et al. 2004). Triatominae may present three sex systems in males: XY, X_1X_2Y and $X_1X_2X_3Y$ (Ueshima 1966). The tribe Rhodniini is that maintained most homogeneous, where the only observed system in all studied

species is XY (Panzera et al. 1996, Pérez et al. 2003), as verified in the present study in *R. pictipes*, which maintains the typical pattern of this tribe. On the other hand, the tribe Triatomini presents the greatest variability in relation to the encountered sex systems, where in *Triatoma* it is possible to verify all previously cited sex systems. The results obtained in the present study for *T. vitticeps* corroborated with those encountered by Severi-Aguiar et al. (2006), where the observed sex system was $X_1X_2X_3Y$. The same result was encountered in *P. lutzi*, the only species where the chromosomal sex systems differed from those habitually encountered in this genus (X_1X_2Y) (Crossa et al. 2002).

Holokinetic organization of the chromosomes is accompanied by innumerable notable deviations of conventional meiosis. The most accentuated difference may be the modification of the meiotic sequence for the sex sequence, with a first equational meiotic division followed by a second reductional division. In many insects with holocentric chromosomes, such as Coccoidea and Heteroptera the meiotic division is inverted (Bongiorni et al. 2004). In Triatominae, sex chromosomes follow a different mode of segregation. In metaphase I, they are individualized and do not form a true bivalent, however chiasmata do not occur between them. The chromatids of each chromosome sex group migrate to the opposite poles in anaphase I, configuring an equational segregation. The sex chromatids are observed individually in prometaphase II, however they showed a “point-to-point” association in metaphase II, with their long axes perpendicular to the equatorial plate. During anaphase II, the chromatids of the sex chromosomes segregate to the opposite poles (Solari 1979, Pérez et al. 1997). It is important to emphasize that the genetic combinations resultant of both the

meiotic sequence pattern and that described for Heteroptera is the same. Therefore, neither offers an increase in meiotic variability since this classification is done based on a cytological and not a genetic point of view (Bongiorni et al. 2004).

In Triatominae, as in other Heteroptera (Ueshima 1966), the development of meiosis varies significantly among species. This variation is fundamentally due to the distinct associations that the chromosomes exhibit during the meiotic prophase of the male. These associations occur in positive heteropycnotic regions, which may be present both in the autosomes and sex chromosomes. In general, each species show a constant number of heteropycnotic chromosomes as well as a specific association type among them. For example, *T. sordida* and *T. patagonica*, species which show very similar karyotypes, has different and specific associations which allows their differentiation when only observing meiotic nuclei in the initial prophase (Panzera et al. 1997).

The existence of heteropycnotic associations during the prophase is one of the most marking characteristics of meiosis in Triatominae (Tavares & Azeredo-Oliveira 1997), where the sex chromosomes during the prophase form one or more chromocenters. In all the species studied in this work, the sex chromosomes showed to be heteropycnotic during the meiotic prophase, however in each of the species the sex chromosomes exhibited distinct behaviors. During meiotic prophase these chromosomes were observed to be proximate forming heteropycnotic chromocenters, where this characteristic continues until diplotene for the species *R. pictipes*; or also uniting this last phase and forming a single chromocenter as occurs in *P. lutzii*. However, sex chromosomes of *T. vitticeps*

showed to be intimately associated forming a single chromocenter from the initial prophase until diplotene, where in this phase the association of two or three autosome pairs is presented.

According to Panzera et al (1995) a variable number of autosomes may participate in association with the chromocenter, in the species whose chromosomes has heteropycnotic blocks. This happens once formation of the chromocenter approaches the space near the autosome pairs with heterochromatic blocks during the meiotic and mitotic prophase (Tavares & Azeredo-Oliveira 1997)

From this study it can be inferred, as previously observed in other works, that the greatest level of variation in the meiotic characteristics occurred in *Triatoma* followed by *Panstrongylus*, and the smallest variation occurred in *Rhodnius* which is a quite homogeneous genus in morphological terms and meiotic behavior. These results may corroborate with the theory that *Panstrongylus* and *Triatoma* belonging to the tribe Triatomiini, are the closest genera, and on the other hand, divergent of *Rhodnius*, tribe Rhodniini, according to the performed molecular, enzymatic, morphologic and taxonomic studies, as well as ecological studies within the subfamily Triatominae (Schofield & Galvão 2009).

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Vinícius Albano Araújo for his help in construction of the plates. To Dr. Simone Patrícia Carneiro de Freitas and Dr.

Riviane Hora-Bellenand for their valuable comments during elaboration of this manuscript.

References

- Abad-Franch F, Palomeque FS, Aguilar HM, Miles MA 2005. Field ecology of sylvatic *Rhodnius* populations (Heteroptera, Triatominae): risk factors for palm tree infestation in western Ecuador. *Trop Med Int Health* 10(12): 1258-1266.
- Bongiorni S, Fiorenzo P, Pippoletti D 2004. Inverted meiosis and meiotic drive in mealybugs. *Chromosoma* 112: 331-341.
- Coura JR, Junqueira AC, Boia MN, Fernandes O 1999. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 379-384.
- Crossa RP, Hernández M, Caraccio MN, Rose V, Valente SA, Valente VC, Mejía JM, Angulo V, Ramírez CM, Roldán J, Vargas F, Wolff M, Panzera F 2002. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 2: 47:56.

- Dias JCP, Feitosa VR, Ferras Filho A, Rodrigues VLC, Alencar SA, Sessa PA 1989. Fonte alimentar e potencial vetorial do *Triatoma vitticeps* com relação a doença de Chagas Humana no estado do Espírito Santo, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 165-173.
- Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. *Acad R Sci d'Outre-Mer* 24: 1-162.
- Fé NF, França MS, Carvalho-Costa FA 2009. Reassessing the entomological investigation around the first autochthonous case of Chagas disease in Western Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(1): 121-123.
- Freitas SPC, Freitas ALC, Gonçalves TCM 2004. Occurrence of *Panstrongylus lutzi*, in peridomiliary áreas, State of Ceará, Brazil. *Rev Saude Publica* 38(4): 579-580.
- Gonçalves TCM, Victório VMN, Jurberg J, Cunha V 1998. Biologia de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em condições de laboratório (Hemiptera:Triatominae). I. Ciclo Evolutivo. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 519-523.
- González-garcía JM, Antonio C, Suja JA, Rufas JS 1996. Meiosis in holocentric chromosomes: Kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends

of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Res* 4: 124-132.

Hughes-Schrader S, Schrader F 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma*, 12: 327-350.

Imai HT, Taylor RW, Crosland MWJ, Crozier RH 1988. Modes of spontaneous evolution in ants with reference to minimum interaction hypothesis. *Jpn J Genet* 63: 159-185.

Jurberg J, Rocha DS, Galvão C 2009. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop* 9(1): 123-128.

Panzer F, Alvarez F, Sanchez-Rufas J, Pérez R, Suja JA, Scvortzoff E 1992. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera-Reduviidae). *Genome* 35: 1068-74.

Panzer F, Pérez R, Panzer Y, Alvarez F, Scvortzoff E, Salvatella R 1995. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). *Chromosome Res* 3: 143-150.

- Panzera F, Pérez R, Hornos S, Panzera Y, Cestau R, Delgado V, Nicolini P 1996. Chromosome numbers in the Triatominae (Hemiptera- Reduviidae): a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91(4): 515-518.
- Panzera F, Hornos S, Pereira J, Cestau R, Canale D, Diotaiuti L, Dujardin JP, Perez R 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg* 57: 732-739.
- Panzera F, Scvortzoff E, Pérez R, Panzera Y, Hornos S, Cestau R, Nicolini P, Delgado V, Alvarez F, Mazzella M, Cossio G, Martinez M, Salvatella R 1998. Cytogenetics of Triatomines. In RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg H Lent, *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas* Rio de Janeiro Editora Fiocruz, p. 621-664.
- Pérez R, Panzera F, Page J, Suja J, Rufas J 1997. Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res* 5: 47-56.
- Pérez R, Rufas JS, Suja JA 2000. Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 8: 17-25.

- Pérez R, Hernández M, Rose V, Calleros L, Panzera F 2003. Citotaxonomía y evolución cromosómica en Triatominae, insectos vectores de la enfermedad de Chagas (Heteroptera – Reduviidae). *Entomol Vect* 10(4): 543-550.
- Pérez R, Calleros L, Rose V, Lorca M, Panzera F 2004. Cytogenetic studies on *Mepraia gajardoi* (Heteroptera: Reduviidae). Chromosome behavior in a spontaneous translocation mutant. *Eur J Entomol* 101: 211-218.
- Santos CB, Ferreira AL, Leite GR, Ferreira GEM, Rodrigues AAF, Falqueto A 2005. Peridomiciliary colonies of *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) infected with *Trypanosoma cruzi* in rural areas of the state of Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 471-473.
- Santos SM, Lopes CM, Dujardin JP, Panzera F, Pérez R, Carbajal de La Fuente AL, Pacheco RS, Noireau F 2007. Evolutionary relationships based on genetic and phenetic characters between *Triatoma maculata*, *Triatoma pseudomaculata* and morphologically related species (Reduviidae: Triatominae). *Infect Genet Evol* 7: 469-475.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 21: 583-588.
- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* 110: 88-100.

- Severi-Aguiar GDC, Lourenço LB, Bicudo HEMC, Azeredo-Oliveira MTV
2006. Meiosis aspects and nucleolar activity in *Triatoma vitticeps*
(Triatominae, Heteroptera). *Genetica* 126: 141-151.
- Solari J 1979. Autossomal synaptonemal complexes and sex chromosomes
without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma*
72: 225-240.
- Tavares MG, Azeredo-Oliveira MTV 1997. Cytogenetic studies on holocentric
chromosomes of five species of triatominae (Heteroptera: Reduviidae).
Cytobios 89: 51-61.
- Ueshima N 1966. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera).
Chromosoma. 18: 97-122.

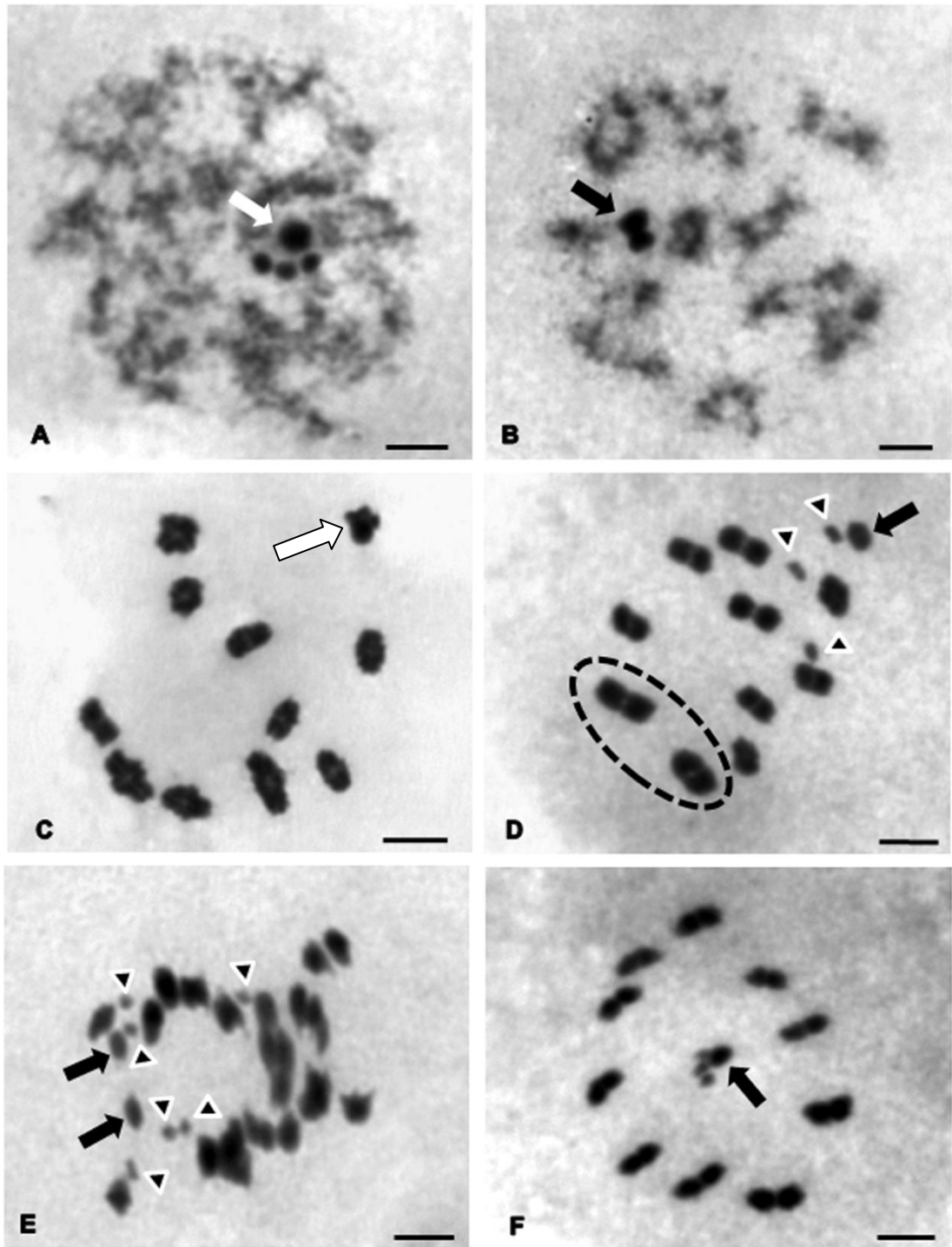


Figure 1: *Panstrongylus lutzi* Meiose of the male ($2n = 20A + X_1X_2X_3Y$). (A) Zygotene with four heteropycnotic chromocenters (Arrow). (B) Pachytene with a single chromocenter formed by the sex chromosomes (arrow). (C) Diplotene. Some bivalents presenting evident chiasmata and the sex chromosomes forming an association (arrow) (D) Metaphase I. Chromosomes $X_1X_2X_3$ (arrowheads) and Y chromosome (arrow). The dashed circle indicates two larger bivalents. (E) Anaphase I. Equational division of the sex chromosomes indicating the chromosomes $X_1X_2X_3$ (arrowheads) and the Y chromosome (arrow). (F) Metaphase II. The arrow indicates the sex chromosomes forming a pseudo-tetravalent. Bar = $5\mu\text{m}$ Staining with Giemsa.

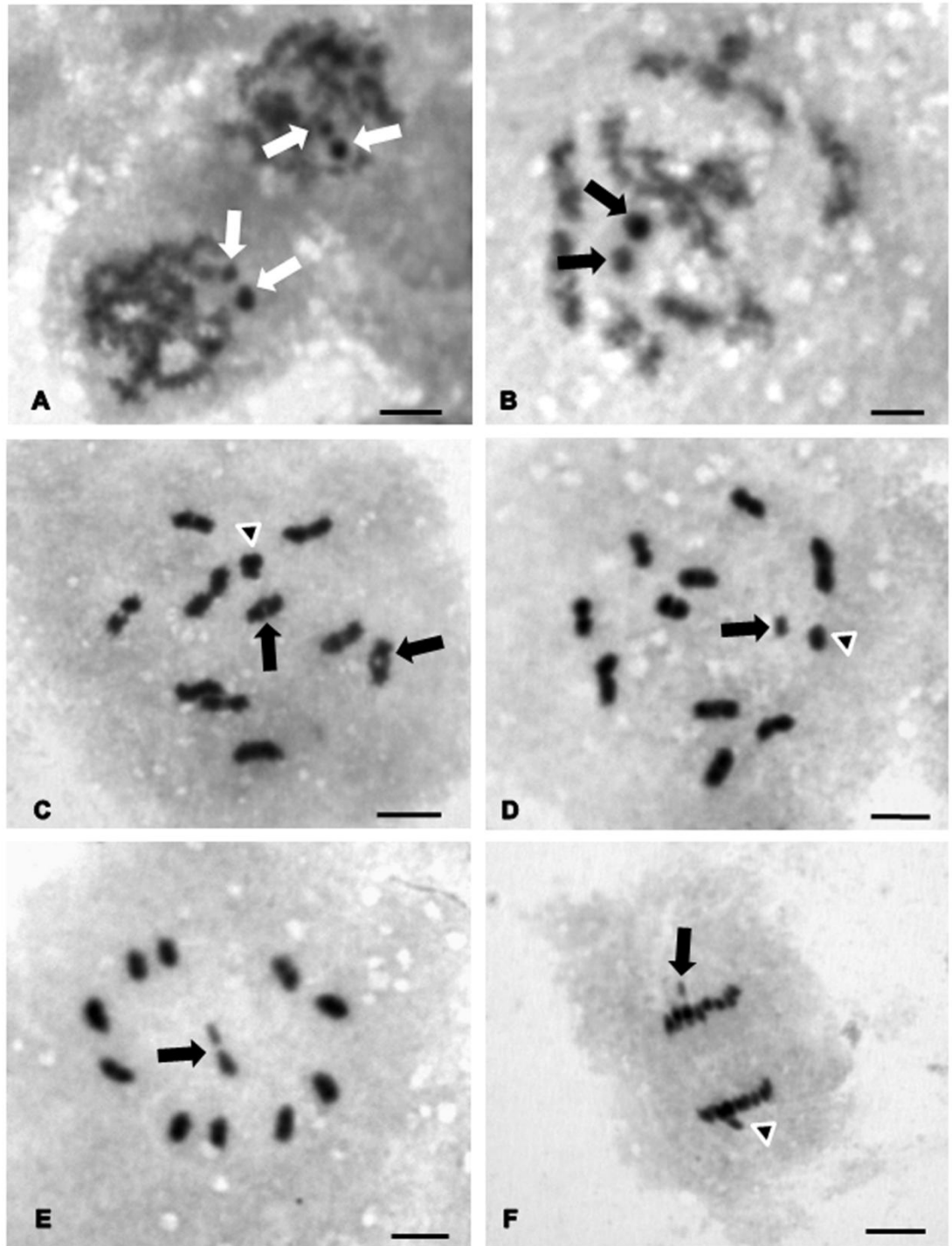


Figure 2: *Rhodnius pictipes* Meiosis of the male. ($2n=20A+XY$) In Zygotene (A) and Pachytene (B) the arrows indicate the formation of two chromocenters. (C) Diplotene. Single chromocenter formed by the sex chromosomes (arrowhead) and few autosomes presenting evident chiasmata (arrows). (D) Metaphase I. Sex chromosomes in the periphery of the spindle, showing the Y chromosome (arrow) and the X chromosome (arrowhead). (E) Metaphase II. Sex chromosomes in the center of the ring, forming a pseudo-bivalent (arrow). (F) Anaphase II with reductional division of the X (arrowheads) and Y sex chromosomes (arrow). Bar = $5\mu\text{m}$ Staining with Giemsa.

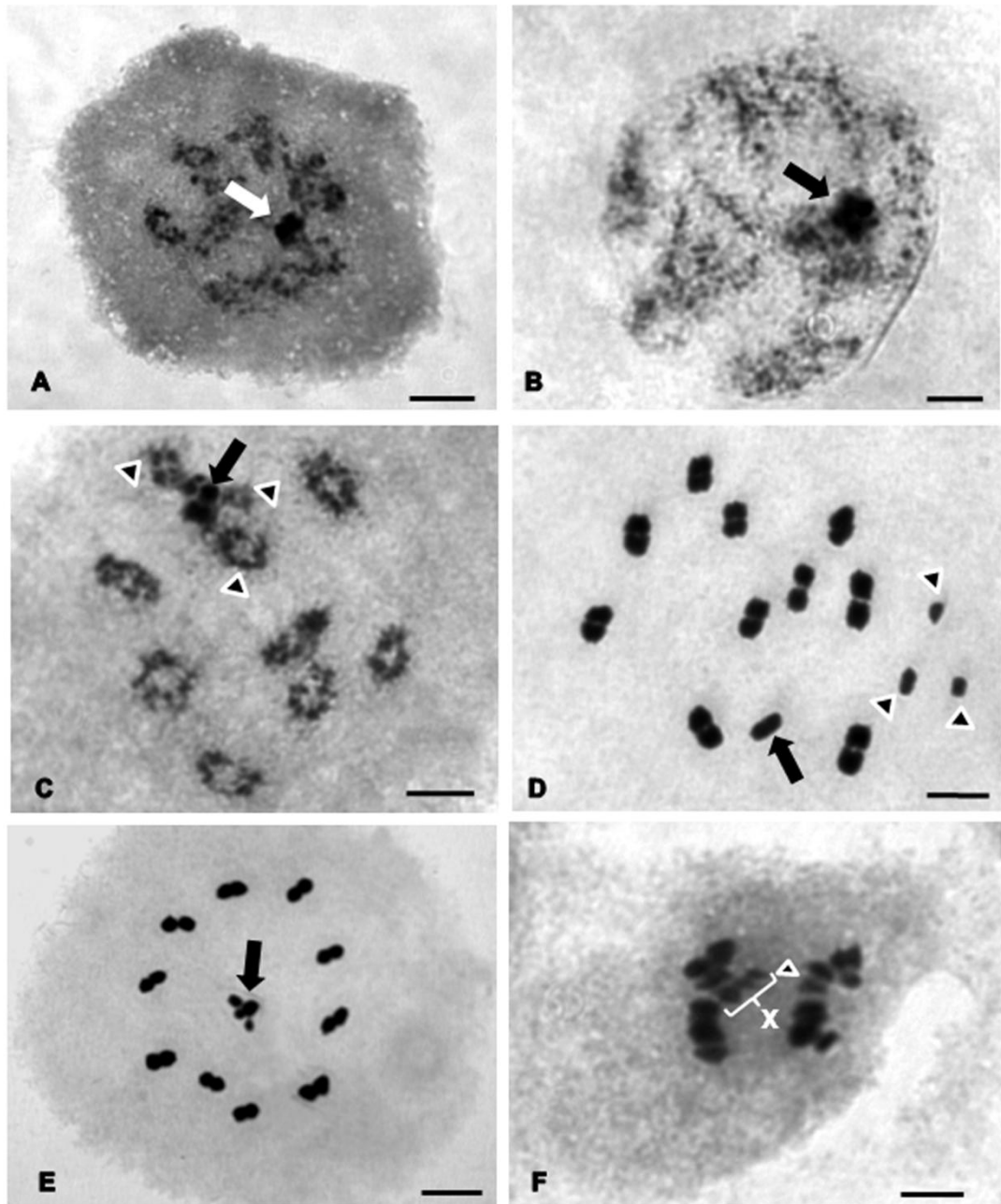


Figure 3: *Triatoma vitticeps* Meiosis of the male. ($2n=20A+X_1X_2X_3Y$). In Pachytene (A) and the diffuse stage (B) the arrows indicate the formation of a chromocenter. (C) Diplotene with the chromocenter (arrow) associated with two or three bivalents (arrowheads). (D) Metaphase showing the Y chromosome (arrow) and the X chromosomes (arrowheads). (E) Metaphase II. Associated sex chromosomes (arrow) in the middle of the ring formed by the autosomes. (F) Anaphase II showing the Y chromosome (arrowhead). Bar = 5 μ m Staining with Giemsa.

Capítulo 2

Variation of heterochromatin in three Triatominae species
(Reduviidae: Heteroptera) using the C banding technique

**Variation of heterochromatin in three Triatominae species
(Reduviidae: Heteroptera) using the C banding technique**

Santos, SM¹, Gonçalves TCM², Lopes CM², Reis JMS² & Pompolo, SG³

¹Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. Universidade Federal de Viçosa. Avenida PH Rolfs, s/n Campus Universitário, 36570-000 Viçosa, MG, Brasil ²Setor de Entomologia Médica e Forense, Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz ³Departamento de Biologia Geral. Universidade Federal de Viçosa

Financial support: Capes

+ Corresponding author: silvia.santos@ufv.br

Abstract

Application of banding techniques and detailed analysis of chromosomal behavior during male meiosis has showed an extensive and surprising cytogenetic variation. The application of the C band technique has allowed for observation of a large chromosomal variation in triatomines, principally involving changes in quantity, arrangement and behavior of heterochromatin both on the inter-specific and population levels, thus providing important indications of evolution in some taxa. The intention of this study was to perform a study on the distribution pattern of heterochromatin bands in meiotic cells of testicles from the species *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923), *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 and *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) in order to provide chromosomal characteristics for the cytogenetic study of these species. The C banding patterns during meiotic chromosomal behavior showed that the three species possess different heterochromatin quantities and distribution. However, all individuals of each species presented only one C banding pattern. These differences in heterochromatic content were clearly observed during the meiotic prophase.

Keywords: *Panstrongylus lutzi*, *Rhodnius neglectus*, *Triatoma vitticeps*, cytogenetics, C banding, molecular taxonomy.

1. Introduction

The function of heterochromatin, which is composed of highly repetitive DNA sequences, in meiotic cells appears to be related to the formation of chiasmata since crossing-over rarely occurs in heterochromatin regions (John & Miklos, 1979; Sumner, 1990a).

In Brazil, cytogenetic analysis of triatomines began when Shreiber and Pellegrino (1948) studied the karyotype of eleven species belonging to this group. Since then, cytogenetic studies of these insects have been focused on conventional chromosome staining techniques (Shreiber & Pellegrino, 1951; Barth, 1956a; Ueshima, 1966).

However, the number of techniques which detect heterochromatic regions in metaphasic chromosomes are innumerable, where the most commonly used is the technique of C band as described by Sumner (1972), specific for heterochromatin, which after treatment is stained with Giemsa (Guerra, 1988).

Tavares & Azeredo-Oliveira (1997) discussed the necessity of using different staining techniques to obtain more detailed chromosomal characteristics in triatomines. The application of banding techniques and detailed analysis of chromosomal behavior during male meiosis has shown an extensive chromosomal variability, as well as allow its observation in triatomines, which principally involve changes in quality, arrangement and behavior of the heterochromatin both at the interspecific and population levels and thus providing important indications of evolution of some taxa (Panzera *et al.*, 1995; Panzera *et al.*, 1998; Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997).

Thus, the objective of this study was to analyze the profile of heterochromatin band distribution in meiotic testicle cells of the species *Panstrongylus lutzi* (Neiva & Pinto, 1923), *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 and *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) in order to provide chromosomal characteristics for the cytogenetic study of these species.

2. Material and Methods

Specimen of the studied species *P. lutzi*, *R. neglectus* and *T. vitticeps* were provided from the colonies maintained at the Laboratory of Leishmaniasis Transmitters, Sector of Medical and Forensic Entomology, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, originating from the respective locations of Várzea Alegre (CE), São Salvador (TO), Rio Bonito (RJ), all located in the Brazilian territory. For the cytogenetic study the gonads of ten individuals from each species were analyzed, including fifth stage nymphs, which were determined to be adult males by analyzing the genital plates.

2.1 Acquisition of testis sections

Preparation was done according to the methodology adapted by Imai *et al.* (1988). The technique utilized consisted of dissection of the sterilized insects under a stereomicroscope for removal of the testis which was maintained in insect Ringer physiological solution. The membrane which involves the testis was

removed and the testis follicles distended, not allowing the structure to dry. After, the material was transferred to a clean histological slide in an inclined position for removal of the Ringer solution. Two drops of fixative solution I (water: ethanol: acetic acid, 4:4:3) were added to the organ and its dissociation was initiated with the aid of two stiletos; before the material completely dried, two drops of fixative solution II (ethanol: acetic acid, 1:1) were added to the material followed by two drops of fixative III (100% acetic acid). For removal of the excess of each fixative solution, pieces of filter paper were positioned along the border of the slides. The slides were dried at room temperature for 24 hours to evaporate the fixative solution.

2.2. C band technique

C banding was performed according to the technique described by Summer (1972) with some modifications, as follows:

After the slides are sufficiently dry, they were immersed in three baths:

- 1 – Hydrochloric acid 1M bath for 15 minutes;
- 2 – Barium hydroxide 5% bath for 10 minutes;
- 3 – Bathed in 2XSSC pH7 (salt solution) at 60°C for 30 minutes

After these procedures the slides were stained with Giemsa 5%. The meiotic figures were observed and captured with the aid of an Olympus BX 60 microscope, with a 100X objective connected to a Q Color 3 Olympus® capture system.

3. Results

P. lutzi and *T. vitticeps* males presented the same number of complete diploid chromosomes ($2n=24$), while *R. neglectus* presented $2n=22$, consisting of 20 autosomes and four sex chromosomes ($X_1X_2X_3Y$), and 20 autosomes and a pair of sex chromosomes (XY), respectively.

C band patterns during meiotic chromosomal behavior showed that the three species possess different quantities and distribution of heterochromatin. However, all individuals of each species presented only one C band pattern. These differences in the heterochromatic content were clearly observed during the meiotic prophase.

In the meiotic prophase of the *P. lutzi* individuals analyzed, including initial and final phases such as the diplotene, a heterochromatic chromocenter can be observed, formed by the sex chromosomes and also some positive points for banding (Figs. 1A,B,C,D). However, in the meiotic metaphasic autosomes they are shown to be completely euchromatic, i.e., the autosome pairs do not present markings for the C band, while in the sex chromosomes only Y presents marking for heterochromatin (Figs. 1E,F).

In *R. neglectus*, in the initial meiotic prophase, some positive heterochromatin points can be observed (Figs. 2A,B) where the sexes form a single chromosome. In diplotene, the sex chromosomes can be visualized separately, and some autosome pairs present markings on their extremities (Figs.

2C,D). Two pairs of autosomes present terminal heterochromatin points during metaphase I and II of this species, the phase in which the Y chromosome showed to be marked with a band (Figs. 2E,F).

Phases of the meiotic prophase of *T. vitticeps* (Figs. 3A,B,C,D) presented few heterochromatin points, where it can be seen that only the meiotic metaphase of these individuals presents two pairs with heterochromatic markings on their extremities (Figs. 3E,F). *T. vitticeps* presented a smaller quantity of heterochromatin when compared to *R. neglectus*. Also in this species, all sex chromosomes (X1X2X3Y) are heterochromatic positive (Figs. 3E,F).

4. Discussion

The results of the present study, obtained by C banding in chromosomes of *P. lutzi*, *R. neglectus* and *T. vitticeps*, corroborate with those of Camacho et al. (1985) where the authors inferred that chromosomes of Heteroptera present small quantities of heterochromatin, and these bands are preferentially encountered at the extremities of these chromosomes.

The quantity of heterochromatin and its position differ from species to species. Even between very close species, different numbers and location of heterochromatin bands, as well as different quantities of heterochromatin may be observed (Sumner, 1990a).

Our results show the presence of small heterochromatin bands near the telomeric region of two autosomal pairs in *R. neglectus* and *T. vitticeps*.

Contrarily, *P. lutzii* did not show heterochromatic bands in metaphases I and II although in the initial prophase and diplotene small positive C band points were observed, which may be related to the high degree of condensation of metaphasic chromosomes, thus complicating the visualization of very small heterochromatic regions. Similar results were observed by Pérez et al. (1992) in five triatomine species, where *Rhodnius nasutus* and *Triatoma pseudomaculata* reveal some autosomes with heterochromatine terminal points, while *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus* and *Triatoma matogrossensis* did not present heterochromatic blocks.

Contrarily, large quantities of heterochromatin have been observed in other species, including *Triatoma infestans* (Solari, 1979; Azeredo-Oliveira, 1990; Panzera et al., 1995), *Triatoma platensis* (Panzera et al., 1995) and *Triatoma delpontei* (Panzera et al., 1995). These large quantities may have evolved in particular regions of the chromosome where they have specific functions. Since heterochromatin shows species-specific variable distribution in relation to the position of the telomeric regions, this pattern determines a specific heterochromatin content for each species (Tavares & Azeredo-Oliveira, 1997).

According to Tavares and Azeredo-Oliveira (1997), based on the heterochromatin content it was possible to separate triatomine species in three distinct groups: (a) species with heterochromatin blocks in all autosomal pairs; (b) species with heterochromatic blocks in some autosome pairs; (c) and species without heterochromatic blocks in the autosomes. Therefore, the observation of these and other triatomine species may contribute to a better understanding of the function of heterochromatin in this group of insects.

Condensation of chromatin may be responsible for the difficulty in detecting C bands during the metaphase in organisms with holocentric chromosomes. However, in all triatomine species which possess blocks heterochromatin, has a tendency to be located in similar places at the extremities of homologous and non-homologous chromosomes (Heitz, 1933).

According to Crossa et al. (2002), the analysis of C banding patterns and behavior of the chromosomes during meiosis shows a large level of variability between species of the genus *Panstrongylus*, thus, three different groups can be identified: *Panstrongylus megistus* is inserted in the first group due to the fact that it has the unusual number of 18 autosomes; the second group includes the species *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus herreri*, *Panstrongylus lignarius* and *Panstrongylus rufotuberculatus*, where in four species the majority of autosomes present terminal heterochromatin regions; and the third group compound only of the specie *Panstrongylus tupynambai* which shows the autosomes without heterochromatic regions. The present study was the first to submit *P. lutzi* to treatment by C banding, and according to our results, this species resembles, as demonstrated by the heterochromatic patterns encountered in the different meiotic phases, those species belonging to the second group of species studied within the *Panstrongylus* sp.

In general, the level of cytogenetic variation in *Panstrongylus* is less than that observed in *Triatoma*, but considerably greater than that presented by *Rhodnius*. In *Triatoma*, the heterochromatic regions show different behaviors depending on the species analyzed, possibly reflecting the polyphyletic nature of this genus extension (Dujardin et al., 2000). In some *Triatoma* species,

particularly those of the complex “infestans” (*Triatoma melanosoma*, *Triatoma infestans*, *Triatoma platensis*, and *Triatoma delpontei*), the heterochromatic regions are generally associated in the prophase forming a single chromocenter (Panzer *et al.*, 1995). In others, the heterochromatic points appear dispersed throughout the nucleus and multiple chromocenters are formed, as occurs in *Triatoma barberi*, *Triatoma rubrofasciata*, *Triatoma tibiamaculata*, *Triatoma brasiliensis* (Panzer *et al.*, 2000) and in some species of the complex *sordida* (Panzer *et al.*, 1997), and also as can be observed in *T. vitticeps*, the species studied in this work. This type of behavior is only observed in *Panstrongylus*, suggesting a common origin of this chromatin for all species of this genus already studied. Contrarily, the cytogenetic variation observed in *Panstrongylus* is substantially greater than that observed in *Rhodnius*, which is a very homogeneous genus in terms of number and chromosomal behavior. This may endorse the strict relationship between *Panstrongylus* and *Triatoma*, and the divergence existent between the two genera and *Rhodnius*. This is in accordance with the current classification of tribes within Triatominae (Crossa *et al.*, 2002; Dujardin *et al.*, 2000).

However, Gómez-Palacio *et al.* (2008) detected an important variation in the quantity of heterochromatin in *Rhodnius pallescens* which had not been reported for any of the 12 *Rhodnius* species previously submitted to cytological studies (Dujardin *et al.*, 2002). This indicates that although the chromosomal number is stable in this genus, the karyotype may suffer important changes in heterochromatic patterns as can be observed in other Triatominae species. The variation analysis of detected heterochromatin proposes the identification of two

distinct cytotypes (A and B) in *R. pallescens*, which is used as a genetic marker for analysis of variability within this species (Gómez-Palacio *et al.*, 2008).

Acknowledgements

The authors are grateful to Sr. Lindemberg Caranha de Sousa, managing technician of the Entomology Program - SESA/CE, for the assistance in collecting *Panstrongylus lutzi* in the state of Ceará; also to Dr. Simone Patrícia Carneiro de Freitas for the valuable comments in elaboration of this manuscript.

5. References

- Azeredo-Oliveira MTV 1990. Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera). Tese de Doutorado. São José do Rio Preto, 250 pp. IBILCE/UNESP.
- Barth R 1956a. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). VI. Estudo comparativo sobre a espermiocitogênese das espécies mais importantes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 54: 599-620.
- Camacho JPM, Belda J, Cabrero J 1985. Meiotic behavior of holocentric chromosomes of *Nezara viridula* (Insecta, Heteroptera) analysed by C-banding and silver impregnation. *Can J Genet Cytol* 27: 491-497.
- Crossa RP, Hernández M, Caraccio MN, Rose V, Valente SAS, Valente VC, Mejía JM, Angulo VM, Ramírez CMS, Roldán J, Vargas F, Wolff M,

Panzer F 2002. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution* 2: 47-56.

Dujardin JP, Schofield CJ, Panzer F 2000. Les Vecteurs de la Maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Classe des Sciences naturelles et médicales, NS, 24 (5) 162pp.

Dujardin JP, Schofield CJ, Panzer F 2002. Los vectores de la enfermedad de Chagas. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, 189pp.

Gómez-Palacio A, Jaramillo-Ocampo N, Triana-Chávez O, Saldaña A, Calzada J, Pérez R, Panzer F 2008. Chromosome variability in the Chagas disease vector *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae, Rhodniini). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(2): 160-164.

Heitz E 1933. Die Herkunft der Chromocentren. *Planta* 18: 571-636.

John B, Miklos GLG 1979. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *International Review of Cytology* 58, 1-114.

Guerra M 1988. Introdução à Citogenética Geral. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 142p.

- Panzer F, Pérez R, Panzer Y, Alvarez F, Scvortzoff E, Salvatella R 1995. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Heteroptera-Reduviidae). *Chromosome Research* 3: 143-150.
- Panzer F, Hornos S, Pereira J, Cestau R, Canale D, Diotaiuti L, Dujardin JP, Pérez R 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatominae bugs (Hemiptera, Reduviidae). *Am J Trop Med Hyg* 57(6): 732-739.
- Panzer F, Pérez R, Nicolini P, Hornos S, Costa J, Borges E, Diotaiuti L, Schofield CJ 2000. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (hemíptera-Reduviidae-Triatominae). *Cad Saúde Pública* 16(2): 83-88.
- Pérez R, Panzer Y, scafiezzo S, Mazzella MC, Panzer F, Dujardin J, Scvortzoff E 1992. Cytogenetics as a tool for triatominae species distinction (Hemiptera:Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87:353-61.
- Shreiber G, Pellegrino J 1948. Cytogenetical studies on Brazilian Hemiptera. *Hereditas* 656 (VIIIth International Congress of genetics, Stockholm, 1948).
- Shreiber G, Pellegrino J 1951. Análise citológica e cariométrica da ação da colchicina sobre a espermatogênese dos hemípteros. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 49: 513-42.

Solari AJ 1979. Autosomal synaptonemal complexes and sex chromosomes without axes in *Triatoma infestans* (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* 72: 225-40.

Sumner ATA 1990a. C-banding and related methods. In: *Chromosome banding*. Boston, Unwin Hyman, cap.4, p.39-68.

Tavares MG, Azeredo-Oliveira MTV 1997. Cytogenetic studies on holocentric chromosomes of five species of triatomines (Heteroptera: Reduviidae). *Cytobios* 89: 51-61.

Ueshima N 1966. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae, Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97-122.

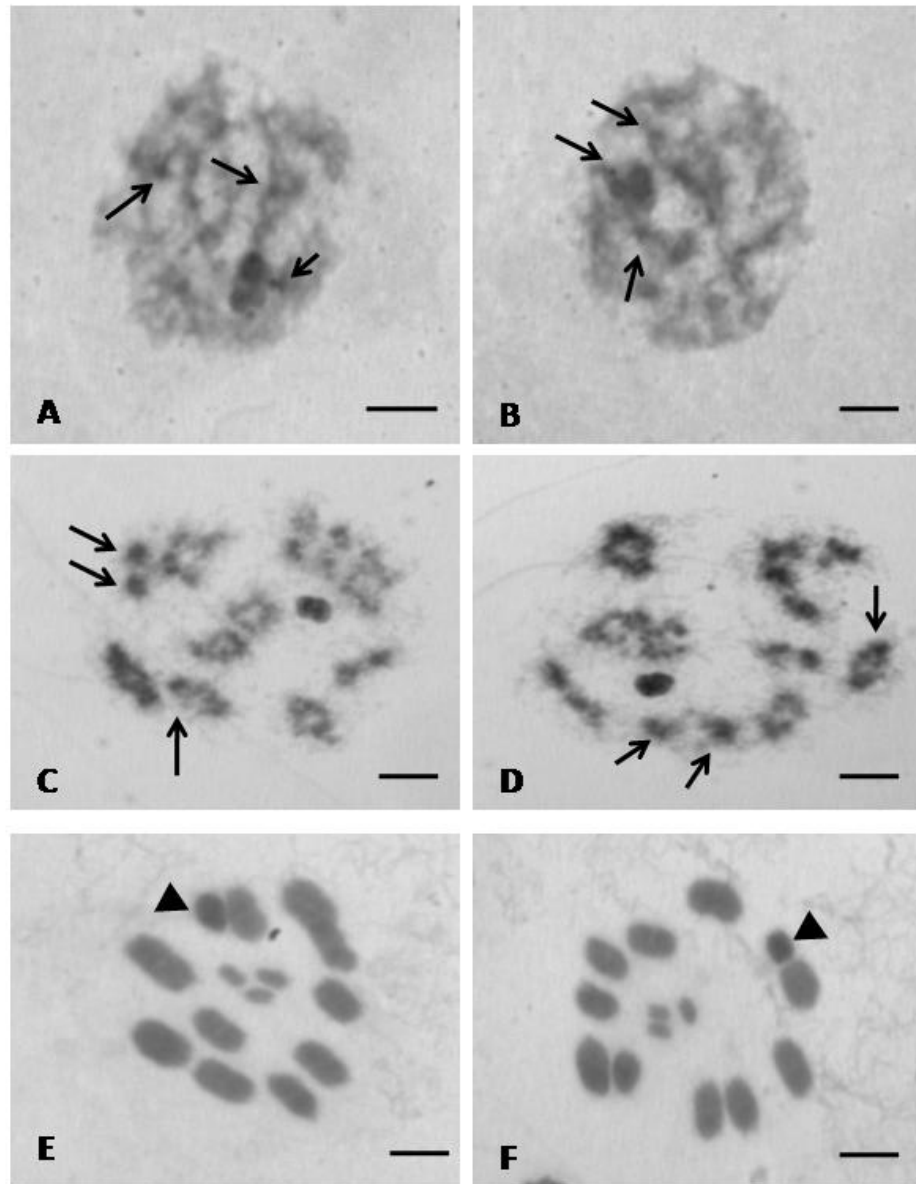


Figure 1: *Panstrongylus lutzi* Meiosis of the male ($2n = 20A + X_1X_2X_3Y$) C Band technique. (A-B) Zygotene with few positive heterochromatic points (arrows). (C-D) Diplotene with bivalents positively marked for heterochromatin (arrows). (E-F) Metaphase I. Arrowheads indicating the heterochromatic Y chromosome. Bar = $5\mu m$. Staining with Giemsa.

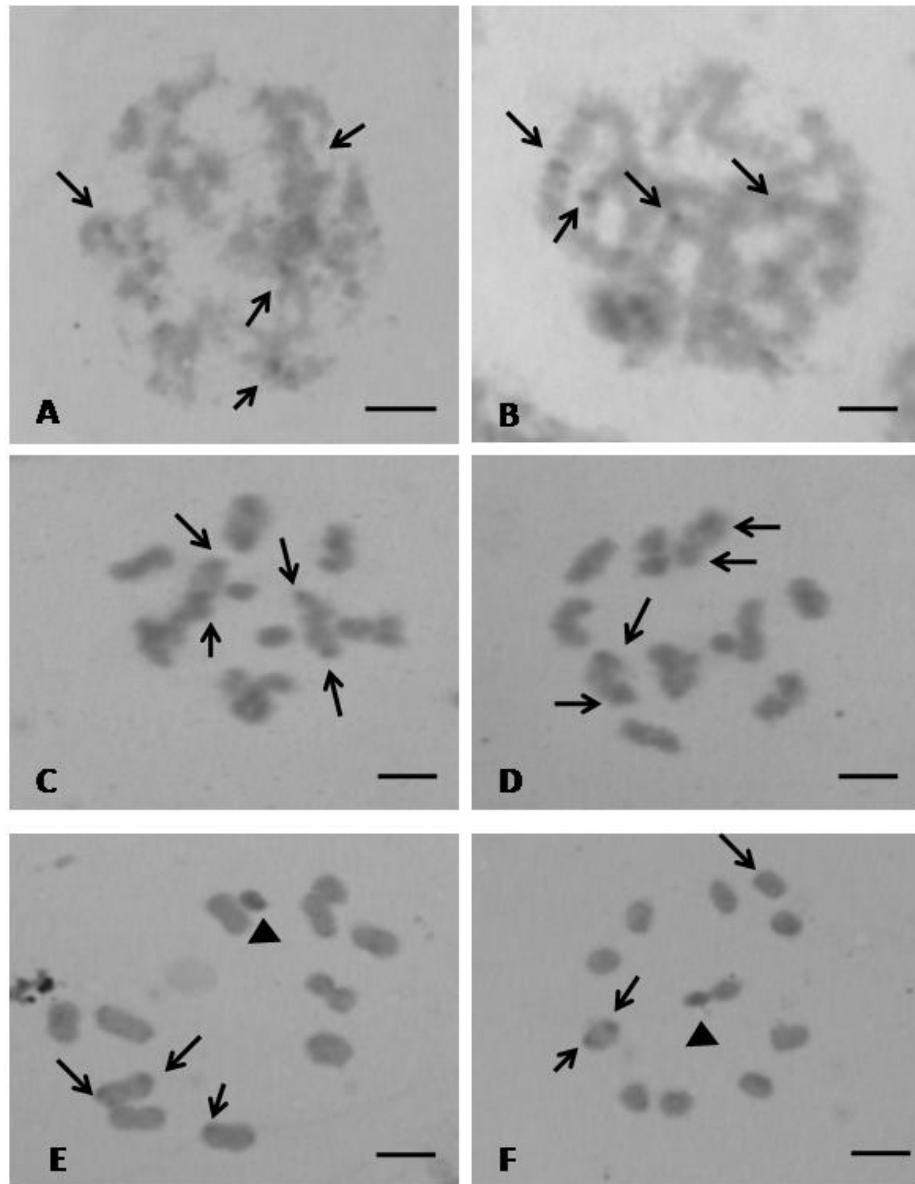


Figure 2: *Rhodnius neglectus* Meiosis of the male ($2n = 20A+ X_1X_2X_3Y$) C Band technique. (A-B) Zygotene with positive heteropyknotic points (arrows). (C-D) Diplotene with bivalents positively marked for heterochromatin (arrows). (E-F) Metaphases I and II. Arrowheads indicating the heterochromatic Y chromosome; autosomes with heterochromatic points at the extremities. Bar = $5\mu\text{m}$. Staining with Giemsa.

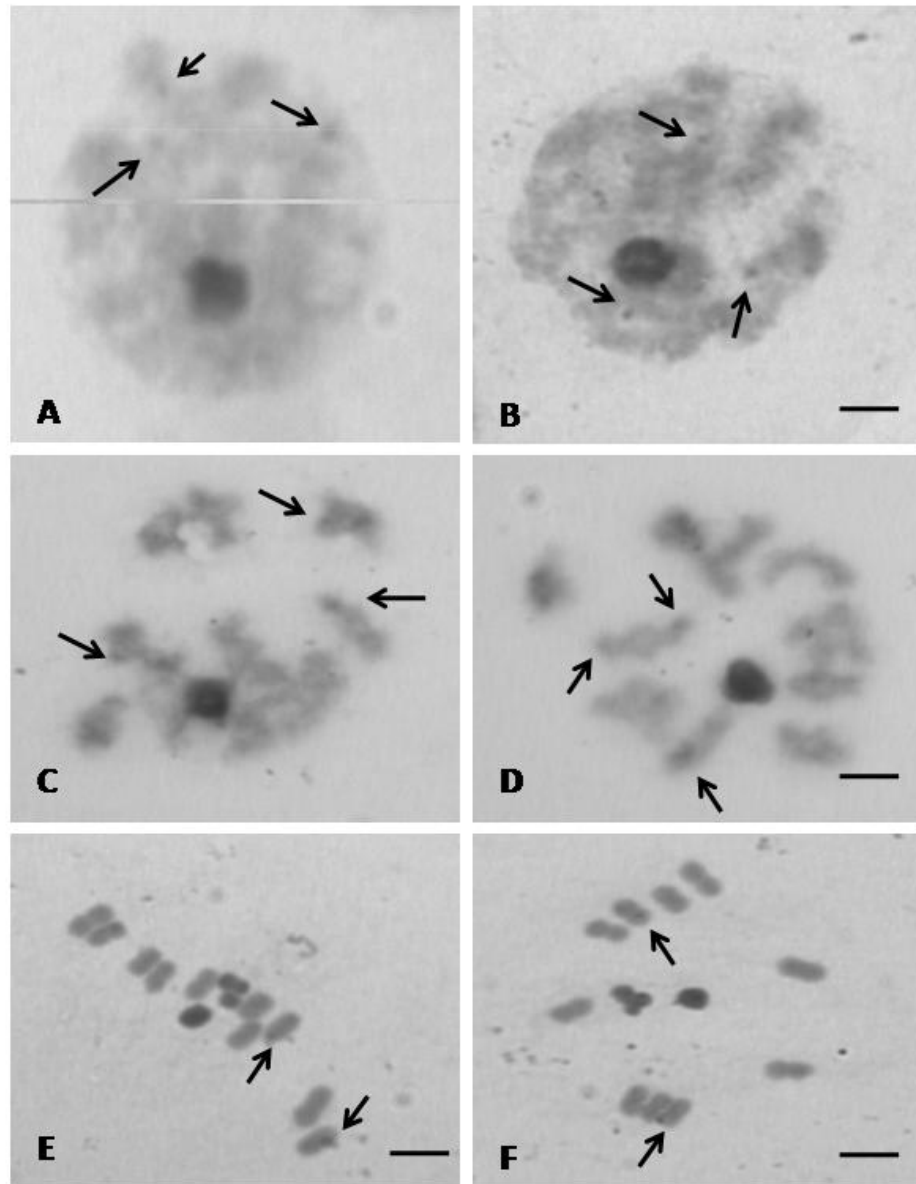


Figure 3: *Triatoma vitticeps* Meiosis of the male ($2n = 20A + X_1X_2X_3Y$) C Band technique. (A-B) Zygotene with positive heteropyknotic points (arrows). (C-D) Diplotene with bivalents positively marked for heterochromatin (arrows). (E-F) Metaphase I. Arrows indicating bivalents with heterochromatic points at the extremities. Bar = $5\mu\text{m}$ Staining with Giemsa.

4. CONCLUSÃO GERAL

As espécies estudadas citogeneticamente no presente trabalho, *Triatoma vitticeps*, *Rhodnius pictipes*, *Panstrongylus lutzi*, apresentaram o mesmo número autossômico encontrado para a maioria das espécies estudadas dentro da subfamília Triatominae, 20 autossomos em seus respectivos complementos cromossômicos;

Com relação aos cromossomos sexuais, *R. pictipes* e *T. vitticeps* apresentaram padrões esperados para suas respectivas tribos, uma vez que Rhodniini possui um padrão típico de XY, e Triatomiini é uma tribo mais heterogênea, apresentando maior variabilidade de sistemas sexuais em suas espécies;

P. lutzi apresentou sistema sexual diferenciado em relação àqueles já encontrados habitualmente no gênero *Panstrongylus* ($20A+X_1X_2X_3Y$);

Todas as espécies estudadas apresentaram meiose invertida, como observado para a maioria das espécies de Heteroptera, onde os cromossomos sexuais realizam primeira divisão meiótica equacional, seguida por uma segunda divisão reducional;

Em todas as espécies estudadas neste trabalho, os cromossomos sexuais mostraram-se heteropicnóticos durante a prófase meiótica, exibindo comportamentos distintos entre as espécies; dessa forma, em *R. pictipes* os cromossomos foram observados próximos, formando cromocentros heteropicnóticos; em *P. lutzi* os cromossomos sexuais são observados associados formando um único cromocentro;

Os cromossomos sexuais de *T. vitticeps* mostraram-se intimamente associados formando um único cromocentro, onde, na fase de diplóteno, apresentou associação com dois ou três pares de autossomos;

Os cromossomos das espécies de Triatominae estudadas por bandeamento C apresentaram pequenas quantidades de heterocromatina, e essas bandas são encontradas preferencialmente nas extremidades dos cromossomos;

O maior nível de variação das características meióticas ocorreu em *Triatoma vitticeps*, seguido de *P. lutzi*, e a menor variação ocorreu em *R. pictipes*;

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias AR de, Hirai H, Ascurra M 1990. Karyotype variation in the Triatominae subfamily. A study on *Rhodnius neglectus* (lent 1954) and *Triatoma infestans* (Klug 1834). Ed. M. Kawabata & M. Sakamoto. Asunción Paraguay. *Annual Reports of the Research Institute of Health Science* 14: 113-127.
- Baccetti B 1972. Insect sperm cell. *Adv Insect Physiol* 9: 315-397.
- Baccetti B, Dallai R, Rosati F 1969. The spermatozoon of Arthropoda III. The lowest holometabolic insects. *J Microsc* 8: 233-248.
- Bahadur J 1975. Histology of the male reproductive organs of a bug, *Halys dendra* F. (Hemiptera, Pentatomidae). *Zool Pooloniae* 24: 311-318.
- Bailey WJ, Nuhardiyati MSI 2005. Copulation, the dynamics of sperm transfer in female refractoriness in the leafhopper *Balclutha incisa* (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae). *Physiol Entomol* 30: 343-352.
- Bao SN; Souza W 1994. Structural specialization in the flagellum of the spermatozoon of the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue Cell* 26: 299-308.
- Barth R 1956. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). X parte: Espermiohistogênese do *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 56: 577-599.
- Barth R 1958. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). IX: Vaso deferente e mesadêneas de *Triatoma infestans*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 56: 209-238.
- Bems HW, Tahmisian TN, Devine RL, Anderson E 1956. Electron microscope studies on the dictyosomes and acroblasts in the male germ cells of the cricket. *J Biophys Biochem Cytol* 2: 123-130.

- Beserra EB, Querino RB, Parra JRP 2003. Ocorrência de ginandromorfismo em *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Neotrop Entomol* 32(3): 507-509.
- Buck RC 1967. Mitosis and meiosis in *Rhodnius prolixus*. The fine structure of the spindle and diffuse kinetochore. *J Ultrastruc Res* 18: 489.
- Carayon J 1944. Sur lês génitiaux males dês réduviidés. *Bull Soc Zool France* 69: 219-224.
- Carcupino M; Kathirithamby J; Mazzini M 1998. Testis morphology and spermatogenesis in two species of *Elenchus* (Strepsiptera: Elenchidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 27: 9-19.
- Comings DE, Okada TA 1972. Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis and absent in meiosis. *Chromosoma* 37: 177-192.
- Chawanji AS; Hodgson NA; Villet MH 2006 Sperm morphology in five species of cicatettine cicadas (Hemiptera: Cicadomorpha: Cicadidae). *Tissue Cell* 38: 373-388.
- Chawanji AS; Hodgson NA; Villet MH; Sanbornand AF; Phillips PK 2007 Spermiogenesis in three species of cicadas (Hemiptera: Cicadidae). *Acta Zool.* 88: 337-348.
- Costa J; Barth OM; Marchon-Silva V; Almeida CE; Freitas-Sibajev MGR; Panzera F. 1997a. Morphological studies on *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) genital structure and eggs different chromatic forms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92: 493-498.
- Costa J; Freitas-Sibajev MG; Marchon-Silva V; Pires MG; Pacheco RS. 1997b. Isoenzymes detect variation in populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92: 459-464.
- Costa J; Almeida CE; Dujardin JP; Beard CB. 2003. Crossing experiments detect genetic incompatibility among populations of *Triatoma brasiliensis*

- Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 637-639
- Dagg JL 2003. Copula duration and sperm economy in the large thistle aphid, *Uroleucon cirsii* (Hemiptera: Aphididae). *Eur. J. Entomol.* 100: 201-203.
- Dias JCP, Diotaiuti L 1998. Vectores secundarios de la enfermedad de Chagas em el Brasil y perspectivas para su control. In: Guhl F and Jaramillo CA (Ed.). Curso Taller. Control de Tripanosomiasis Americana y Leishmaniosis: aspectos Biológicos, Genéticos y Moleculares. Corcas Editores Ltda, Santafé de Bogotá, D.C., Colômbia, p. 154-159.
- Dias JCP, Schofield CJ 1999. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. I):103-121.
- Dujardin JP, Panzera F, Schofield CJ 1999. Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1): 223-228.
- Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F 2000. Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. *Acad R Sci d'Outre-Mer* 24: 1-162.
- Freitas SPC, Santos-Mallet JE, Serrão JE, Lorosa ES, Gonçalves TCM 2007. Morphometry of the testis follicles in *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) (Hemiptera, Triatominae) *Animal Biology* 57: 393-400.
- Frias D, Átria J 1998. Chromosomal variation, macroevolution and possible parapatric speciation in *Mepraia spinolai* (Porter) (Hemiptera:Reduviidae). *Genet Mol Biol* 21(2): 179-184.
- Galvão C, Angulo VM 2006. *Belminus corredori*, a new specie of Bolboderini (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) from Santander, Colombia. *Zootaxa* 1241:61-68.
- 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 nomenclature and taxonomic notes. *Zootaxa* 202: 1-36.
- González-García JM, Antonio C, Suja JA, Rufas JS 1966. Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents of *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Research* 4: 124-132.
- Hughes-Schrader S, Schrader F 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12: 327-350.
- Jurberg J, Galvão C, Lent H, Monteiro F, Lopes CM, Panzera F, Pérez R 1998. Revalidação de *Triatoma garciabesi* Carcavallo, Cichero, Martínez, Prosen & Ronderos, 1967 (Hemiptera-Reduviidae). *Entomol Vect* 5: 107-122.
- Jurberg J, Rocha DS, Galvão C 2009. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Milles, 1977 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Biota Neotrop* 9(1):123-128.
- King M 1993. Evolution. In: **The role of chromosomal change**. Cambridge University Press. pp. 336.
- Lent H, Wygodzinsky P 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 163: 127-520.
- Lent H, Jurberg J, Galvão C 1994. Revalidação do gênero *Mepraia* Mazza, Garjado & Jorg, 1940 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 347-352.
- Lima, AC 1940. Hemípteros. *Insetos do Brasil*. Escola Nacional de Agronomia. 2º tomo.
- Lorosa ES, Jurberg J, Souza ALA, Vinhaes MC, Nunes IM 2000. Hemolinfa de dictyoptera na manutenção do ciclo biológico silvestre de *Triatoma rubrovaria* (Blanchard, 1843) e *Triatoma circummaculata* (Stal, 1859) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vect* 3: 287-296.
- Mazza S, Jorg ME, Gajardo R 1940. Debatida posición sistemática de um triatomídeo chileno. *Miss Estud Patol Reg Arg Publ* 50: 34pp.

- Monteiro F, Pérez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield CJ, Beard C 1999. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *Triatoma melanosoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1): 229-238.
- Noireau F, Carbajal-de-la-Fuente AI, Lopes CM, Diotaiuti L 2005. Some considerations about the ecology of Triatominae. *An Acad Bras Cienc* 77(3): 1-6.
- Panzera F, Pereira J, Pereira A, Alvarez F, Dutour R, Pérez R, Salvatella R, Scvortzoff E 1988. Genetic polymorphism in triatominae species from Uruguay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83(1): 191.
- Panzera F, Alvarez F, Sanchez-Rufas J, Pérez R, Suja JA, Scvortzoff E, Dujardin JP, Estramil E, Salvatella R 1992. C-heterocromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera- Reduviidae). *Genome* 35: 1068-1074.
- Panzera F, Pérez R, Panzera Y, Alvarez F, Scvortzoff E, Salvatella R 1995. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera-Reduviidae). *Chromosome Research* 3: 143-150.
- Panzera F, Hornos S, Pereira J, Cestau R, Canale D, Diotaiuti L, Dujardin JP, Pérez R 1997. Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera-Reduviidae). *American J Trop Med Hyg* 57 (6): 732-739.
- Panzera F, Scvortzoff E, Pérez R, Panzera Y, Hornos S, Cestau R, Nicolini P, Delgado V, Alvarez F, Mazzella M, Cossio G, Martinez M, Salvatella R 1998. Cytogenetics of Triatomines. In RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg H Lent, *Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas* Rio de Janeiro Editora Fiocruz, p. 621-664.
- Panzera F, Pérez R, Nicolini P, Hornos S, Costa J, Borges E, Diotaiuti L, Schofield C 2000. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma*

brasiliensis Neiva, 1911 (Heteroptera-Reduviidae-Triatominae). *Cad Saúde Pública* 16(2): 83-88.

Panzer F 1996. Estudios cromosómicos em Triatomíneos. In: **Proceedings International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae**. pp. 78-80. Eds: CJ Schofield, JP Dujardin & J Jurberg. Published by INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos). México. pp. 1-116.

Pereira J, Dujardin JP, Salvatella R, Tibayrenc M 1996. Phylogenetic relationships about *T. infestans* and related sylvatic species of Uruguay. *Heredity* 77: 47-54.

Pérez R, Panzer F, Scvortzoff E, Hornos S, Bellizzi S, Scafiezzo S, Salvatella R 1991. Variaciones de heterocromatina C en *Triatoma infestans* procedentes de Argentina y Chile. Abstract X Cong. Latinoam. Parasit., Mont., pp. 143.

Pérez R 1996. Análisis cariológico de espécies del gênero *Triatoma* (Hemiptera-Reduviidae), com ênfasis em *Triatoma infestans*, principal vector de La Enfermedad de Chagas em El Uruguay. Master Thesis. Faculty of Sciences. Univ. of Uruguay. 130 pp.

Pérez R, Panzer F, Page J, Suja J, Rufas J 1997. Meiotic behavior of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* 5: 47-56.

Pérez R, Hernández M, Caraccio MN, Rose V, Valente A, Valente V, Moreno J, Angulo V, Sandoval M, Roldán J, Vargas F, Wolff M, Panzer F 2002. Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infect Genet Evol* 2: 47-56.

Pérez R, Hernández M, Rose V, Calleros L, Panzer F 2002. Citotaxonomía y evolución cromosómica en Triatominae, insectos vectores de La enfermedad de Chagas (Heteroptera-Reduviidae). *Entomol Vect* 10(4): 543-550.

Pérez R, Hernández M, Rose V, Calleros L, Panzer F 2003. Citotaxonomía y evolución cromosómica en Triatominae, insectos vectores de la enfermedad de Chagas (Heteroptera – Reduviidae). *Entomol Vect* 10(4): 543-550.

- Pérez R, Calleros L, Rose V, Lorca M, Panzera F 2004. Cytogenetic studies on *Mepraia gajardoi* (Heteroptera: Reduviidae). Chromosome behavior in a spontaneous translocation mutant. *Eur J Entomol* 101: 211-218.
- Rey L 1991. Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África, p. 128-153. In *Parasitologia*. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 2ª Edição.
- Schaefer CW, Panizzi AR 2000. Heteroptera of economic importance. CRC Press. Boca Raton. London, New York, Washington DC.
- Schofield CJ 1994. *Triatominae: biology and control*. Eurocommunica Publications Ed., West Sussex, U.K.: 80.
- Schofield CJ, Apt W, Sagua H, Panzera F, Dujardin JP 1998. Alary polymorphism in *Triatoma spinolai* and its possible relationship with demographic strategy. *Medical & Veterinary Entomology* 12: 30-38.
- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP 1999. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(Suppl 1): 375-378.
- Schofield CJ 2000. *Trypanosoma cruzi* – The vector-parasite paradox. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 535-544.
- Schofield CJ, Galvão C 2009. Classification, evolution and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* 110:88-100.
- Schrader F 1935. Notes on mitotic behaviour of long chromosomes. *Cytologia* 6: 422.
- Schreiber G, Pellegrino J 1950. Eteropicnosi di autosomi come possible meccanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici). *Sci Genet* 3: 215-226.
- Scvortzoff E, Martínez M, Beltrame B 1995. Análisis citogenético de algunos híbridos de *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera-Reduviidae). *Bol Soc Zool Uruguay* 9: 79-90.
- Silva FP, Schreiber G 1971. Morfologia comparada nos canalículos testiculares da subfamília Triatominae como caráter taxonômico. *Arq. Mus. Nac.* 58: 275-276.

- Sherlock IA, Carcavallo RU, Galindez-Girón I 1998. List of natural and experimental flagellate infection in several Triatominae species. Lista de infecções naturais e experimentais por flagelados em diversas espécies de triatomíneos. In: *Atlas of Chagas disease vectors in the Americas. Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas*. Vol.I, Editores RU Carcavallo, I Galindez- Girón, J Jurberg, H Lent. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro: 289-298.
- Sumner AT 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304-306.
- Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV, Ceron CR 2006. Phylogenetic approach to the study of triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Braz J Biol* 66 (2B): 703-708.
- Tores JB; Zanuncio JC 2001 Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae), *Biocontrol*, 46: 469-480.
- Ueshima N 1966. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae: Hemiptera). *Chromosoma* 18: 97-122.
- Ueshima N 1979. Insecta 6. Hemiptera II: Heteroptera. In: **Animal Cytogenetics**. Ed. B. John. Gebruder Borntraeger. Berlin, Stuttgart.
- Vinhaes MC, Dias JCP 2000. Doença de Chagas no Brasil. *Cad Saúde Pública* 16(Sup. 2): 13-34.
- WHO 2001. *Control of Chagas disease*. Technical Report Series no. 811, Geneva: 95.
- WHO/CTD (2003). <http://who.int/ctd/chagas>