

UNIVERSITAT  
DE  
VALÈNCIA



FACULTAD  
DE  
FARMACIA

## TESIS DOCTORAL

### PROGRAMA DE DOCTORADO “PARASITOLOGÍA HUMANA Y ANIMAL”

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA  
Y PARASITOLOGÍA

### ANÁLISIS POBLACIONAL Y FILOGEOGRÁFICO DE VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN PERÚ BASADO EN ANÁLISIS MULTIGÉNICOS DEL ADN RIBOSOMAL Y MITOCONDRIAL

por

**LUCÍA MARÍA MATEO ARENAS**

Directores

**Dra. MARÍA DOLORES BARGUES CASTELLÓ**

Profesora Catedrática de Parasitología

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología

Facultad de Farmacia, Universitat de València

**Dr. Dr. h. c. SANTIAGO MAS COMA**

Profesor Catedrático de Parasitología

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología

Facultad de Farmacia, Universitat de València

Valencia, Octubre de 2017



DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I PARASITOLOGÍA

Los abajo firmantes Dra. MARÍA DOLORES BARGUES CASTELLÓ Y Dr. Dr.h.c. SANTIAGO MÁ-S-COMA, Profesores Catedráticos del Área de Parasitología del Departamento de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València, por la presente:

**CERTIFICAN:** que Dña LUCÍA MARÍA MATEO ARENAS ha realizado íntegramente el trabajo experimental titulado “ANÁLISIS POBLACIONAL Y FILOGEOGRÁFICO DE VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN PERÚ BASADO EN ANÁLISIS MULTIGÉNICOS DEL ADN RIBOSOMAL Y MITOCONDRIAL” en el Departamento de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València con el fin de optar al Grado de Doctora en Farmacia.

Y para que así conste a los efectos oportunos,

firman la presente 6 de Octubre de 2017, Valencia

Fdo: Dra. M.D. Bargues Castelló

Fdo: Dr.h.c. Santiago Mas Coma



“Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede”.

Jacques Yves Cousteau (1910-1997)



## RESUMEN

MATEO L., 2017 - ANÁLISIS POBLACIONAL Y FILOGEOGRÁFICO DE VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN PERÚ BASADO EN ANÁLISIS MULTIGÉNICOS DEL ADN RIBOSOMAL Y MITOCONDRIAL. TESIS DOCTORAL (DIRS. DRA. M.D. BARGUES, DR. S. MAS-COMA), FACULTAD DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, (VALENCIA, ESPAÑA), 272 pp.

La enfermedad de Chagas, cuyo agente causal es *Trypanosoma cruzi*, constituye un grave problema de salud pública en toda Latinoamérica. La principal forma de transmisión es la vectorial, de la que son responsables hemípteros reduvidos de la subfamilia Triatominae adaptados a los hábitats doméstico y peridoméstico. Puesto que el parásito se mantiene en un ciclo zoonótico silvestre y es imposible de eliminar, la principal forma de lucha contra la transmisión vectorial consiste en la eliminación de las poblaciones domiciliadas del vector. Los estudios moleculares constituyen una herramienta de gran utilidad a la hora de planificar las campañas de control vectorial, puesto que permiten conocer y comprender la estructura poblacional y los procesos de dispersión y adaptación de estos insectos. Entre los principales países endémicos para esta parasitosis, se encuentra Perú, donde se han descrito 19 especies de triatominos, muchas de las cuales son reconocidos vectores de la enfermedad de Chagas. La presente Tesis Doctoral tiene como principal objetivo el haplotipaje molecular multigénico de las principales especies de vectores de Chagas en Perú de los géneros *Triatoma* y *Panstrongylus*. Se ha realizado además, un estudio de genética poblacional de la especie *T. infestans* y un estudio filogenético de especies del género *Panstrongylus*. *T. infestans* es el vector mejor adaptado al ambiente doméstico y el responsable de la mitad de los casos humanos de la enfermedad de Chagas en todo el mundo. Esta especie presenta una clara estructuración poblacional, de acuerdo a su variabilidad genética, que la separa en dos grupos ampliamente extendidos en Latinoamérica: el grupo Andino y el no-Andino. Los *T. infestans* analizados de Perú proceden de ambientes rurales e incluso urbanos y se integran dentro del grupo Andino. El haplotipaje molecular multigénico se ha hecho mediante marcadores del ADN ribosomal (ITS-1, 5.8S, ITS-2) y del ADN mitocondrial (16S, ND1, COI y Cyt *b*). Para ello, se han estudiado 129 ejemplares de *T. infestans* de los cuales: 113 son de Perú; 12 de Bolivia, 2 de Argentina y 2 de Chile. No se han encontrado diferencias genéticas ni en el estudio por altitudes geográficas

desde los 432 a los 2.979 metros sobre el nivel del mar, ni en el estudio por departamentos de Perú. Destaca la uniformidad genética de *T. infestans* en Perú, no habiéndose detectado variabilidad de haplotipos en los marcadores utilizados con la excepción del marcador COI, el único que mostró variabilidad (3 haplotipos) y que podría estar relacionada con resistencias a los insecticidas. Se aporta por primera vez, la secuencia completa del gen *Cyt b* para esta especie. Los test de neutralidad muestran que *T. infestans* ha sufrido una fuerte reducción poblacional, debido a las campañas de control pero que actualmente está en expansión. En cuanto al estudio de especies del género *Panstrongylus* se han analizado los mismos marcadores que en *T. infestans* de un total de 168 especímenes: 51 de *P. chinai*; 14 de *P. geniculatus* y 103 de *P. herreri*. En el estudio del ADNr se han detectado grandes diferencias relacionadas con minisatélites que pueden ser consecuencias de retenciones de polimorfismos de un ancestro común. En el estudio del ADNmt se ha obtenido por primera vez, la secuencia completa del gen *Cyt b* en especies el género *Panstrongylus*. No se han observado diferencias genéticas entre poblaciones domésticas y peridomésticas, indicando que existe flujo genético entre ambos ecotopos. En el estudio filogenético de *Panstrongylus* los árboles obtenidos con marcadores ribosomales evidencian su utilidad en la separación de especies con elevado soporte estadístico. Los marcadores mitocondriales no alcanzan resolución a nivel específico pero sí, a nivel poblacional. Las matrices combinadas con secuencias obtenidas del *GenBank* muestran claras incongruencias que evidencian confusiones de clasificación taxonómica o bien, posibles hibridaciones.

**Palabras clave:** enfermedad de Chagas, Perú, Triatominae, haplotipaje molecular, ADNr (ITS-1, 5.8S, ITS-2), ADNmt (16S, ND1, COI, *Cyt b*), genética poblacional, filogenia, filogeografía.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, y como no podía ser de otra forma, les doy las gracias a mis directores, la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Bargues Castelló, Profesora Catedrática del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, y el Dr. Santiago Mas Coma, Profesor Catedrático del mismo Departamento, por acogerme en su grupo de investigación y por la confianza que depositaron en mi para la realización de este trabajo. A la Dra. Bargues quiero agradecerle la paciencia y el apoyo en todos los pasos de la preparación de esta Tesis y todo el conocimiento y experiencia transmitidos tanto en ciencia como en los problemas cotidianos del día a día. Al Dr. Mas Coma por hacerme ver la Parasitología de una forma mucho más global donde las enfermedades se deben afrontar desde numerosos frentes.

Al resto de docentes del Departamento de Parasitología, que han participado en mi formación en el XXVI Master Internacional de Enfermedades Parasitarias Tropicales y los cursos del Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal: Dra. M<sup>a</sup> Adela Valero, Aleixandre, Dr. J. Guillermo Esteban Sanchís, Rafael Toledo Navarro, Carla Muñoz Antolí-Candela, Dr. Marius Fuentes i Ferrer, Dra M<sup>a</sup> Teresa Galán Puchades, Dr. Antonio Marcilla Díaz y María Trelis Villanueva.

Al Dr. Abraham Cáceres del Departamento Académico de Microbiología Médica, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en Lima, Perú agradecerle todo el esfuerzo y dedicación utilizados para la recolección y muestreo de todas las especies de vectores implicadas en la enfermedad de Chagas estudiados en la presente Tesis. Me gustaría agradecer su apoyo incondicional y su valiosa colaboración a lo largo de tantos años con la Unidad de Parasitología Sanitaria de nuestra Universidad. Esta Tesis es uno de los resultados obtenidos de esta fructífera colaboración entre ambas Instituciones. Ahora que finalizo la Tesis valoro el incalculable valor biológico del material del que he tenido la suerte de disponer sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

A la Dra. Amparo Martínez Ramírez, Sección de Secuenciación de ADN y Proteínas del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCIE), Universitat de València, por su amabilidad y su paciencia.

Por supuesto, agradecer al personal de secretaria Clemente Bañuls Rodilla y Luisa Goicoechea, por la ayuda recibida siempre que la he necesitado.

A mis compañeros de laboratorio, por haberme acogido con tanto cariño, tanto los que ya no están como los que siguen luchando por la ciencia. Al Dr. Patricio Artigas que ha sido un pilar para mí y un gran guía científico y administrativo, pero sobretodo ha sido un amigo, muchas gracias por tu paciencia y por toda la ayuda prestada no hay suficientes napolitanas de chocolate para devolverte los favores. Al Dr. David Osca porque no se cómo he podido vivir sin su ayuda todos estos años, gracias por tu paciencia y sobretodo por tu tiempo gracias a ti he podido poner el broche final. Al Dr. Messaoud Khoubbane y al Dra. Ros Mary Flores por los consejos y el gran apoyo que me han dado. A mi hermana-parásita la Dra. Vívian Chagas porque has sido mi mitad y mi compañera durante esta etapa que hemos compartido, esta Tesis es de las dos, gracias por TODO.

A las “parasitocas”: Dra. Vívian Chagas, Dra. M<sup>a</sup> José Irisarri, Dra. Alba Cortés, Dra. Raquel Peixoto, casi Dra. Sonia Adam, M<sup>a</sup> Ángeles Martínez, Dra. Alicia Galiano, casi Dra. Carla Quesada y Dra. Ángela Debenedetti. Por hacer que cada día fuera genial, por las risas, por las charlas, por la complicidad... Y al resto de miembros del “despachito” Marta Reguera, Rodrigo Stheek, Ray Seguí y Paloma Pérez.

A mis compañeros de piso y familia de Doctores: la Dra. Natalia Martínez mi brújula desde Babysol sin ti no se dónde estaría, a la Dra. Cristina Mulet por vivir tanto juntas, Dr. Daniel Pérez, Dra. Vivían Chagas y a mi Dra. Silvia Mateo que es mi favorita y la mejor de todos.

A mi familia, gracias por dejarme vivir esta experiencia sin vosotros jamás hubiera podido llegar hasta aquí, gracias por vuestro apoyo y por los ánimos y el cariño que siempre habéis tenido conmigo. En especial a mis padres, por ayudarme tanto y a mi hermana, la que siempre sonrío. Y como no, a mi marido por su infinita paciencia y comprensión, por cuidar de mi y permitirme alcanzar mis metas.

A mis amigas de toda la vida, en especial a los dos lados del triángulo Ale y Aida que han estado tendiéndome la mano todo este tiempo y animándome para conseguir mis metas.

Este estudio se ha llevado a cabo gracias a las financiaciones proporcionadas por distintos proyectos y programas de diferentes organismos e instituciones:

- Prevención y Control de Enfermedades Tropicales Importadas y Reemergentes de Elevado Impacto. Red Colaborativa de Enfermedades Tropicales (Collaborative Research Network on Tropical Diseases RICET). Financiado por: Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa RETICS, VI PN de I+D+i, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (Coordinated by Centro Nacional de Medicina Tropical del Instituto Carlos III).
- Epidemiología molecular de vectores de interés en Salud Pública y sus relaciones con los cambios climático y global. (Molecular Epidemiology of Vectors of Public Health Interest and Their Relationships with Climatic and Global Changes). Financiado por: Generalitat Valenciana - Ayudas para grupos de investigación de excelencia- programa PROMETEO 2012.
- Enfermedad de Chagas en Perú: estudio multidisciplinar de la transmisión vectorial. Financiado por: Universitat de València, Vicerectorado de Internacionalización y Cooperación, Valencia, España.
- Epidemiología molecular en la emergencia de enfermedades de transmisión vectorial: los vectores en el riesgo de introducción y expansión. Financiado por: Generalitat Valenciana, Consellería de Educación, Investigación Cultura y Deporte, Dirección General de Investigación y Ciencia - Ayudas para grupos de investigación de excelencia- programa PROMETEO 2016.
- Red de Investigación Colaborativa en Enfermedades Tropicales (RICET). Financiado por: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, ISCIII, Acción Estratégica en Salud 2013-2016, Programa Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS), Madrid, España.



## ÍNDICE

Índice .....	15
Índice de Tablas .....	21
Índice de figuras .....	33

### Capítulo 1. Introducción. La enfermedad de Chagas y su situación actual en Perú .....

43

1.1	La enfermedad de Chagas .....	45
1.1.1	Características generales de la enfermedad .....	45
1.1.2	Etiología, agente causal .....	46
1.1.3	Ciclo biológico .....	47
1.1.4	Epidemiología, clínica, diagnóstico y tratamiento.....	49
1.1.5	Control de la enfermedad de Chagas .....	55
1.1.5.1	Campañas de control vectorial.....	56
1.2	Vectores de la enfermedad de Chagas: subfamilia Triatominae .....	60
1.2.1	Clasificación y sistemática.....	60
1.2.2	Caracterización genética de los triatominos vectores de la enfermedad de Chagas .....	63
1.2.2.1	Marcadores moleculares del ADN ribosomal nuclear .....	63
1.2.2.2	Marcadores moleculares del ADN mitocondrial.....	66
1.2.2.3	Ventajas y desventajas de los marcadores ribosomales y mitocondriales .....	69
1.2.2.4	Estudios multigénicos y tendencias actuales en triatominos.....	70
1.3	Situación de la enfermedad de Chagas en Perú .....	71
1.3.1	Revisión histórica de la enfermedad de Chagas en Perú .....	71
1.3.2	Especies de vectores descritas en Perú .....	73
1.3.3	Situación epidemiológica actual .....	76
1.3.3.1	Nuevo escenario epidemiológico en Perú: Urbanización de la enfermedad .....	81

### Capítulo 2. Material y métodos .....

85

2.1	Material.....	87
-----	---------------	----

<b>2.2 Métodos.....</b>	<b>89</b>
2.2.1 Selección de marcadores moleculares .....	89
2.2.1.2 Marcadores ribosomales nucleares .....	90
2.2.1.3 Marcadores mitocondriales .....	90
2.2.2 Extracción del ADN.....	90
2.2.3 Amplificación por PCR de los marcadores moleculares.....	91
2.2.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	94
2.2.5 Purificación de los productos de PCR.....	95
2.2.6 Cuantificación y determinación de la pureza del ADN.....	95
2.2.7 Clonación de fragmentos de ADN en bacterias de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	96
2.2.8 Secuenciación del ADN .....	98
2.2.9 Análisis de las secuencias.....	99
2.2.10 Análisis de genética poblacional.....	100
2.2.10.1 Test de neutralidad .....	100
2.2.10.2 Análisis de varianza molecular AMOVA .....	101
2.2.10.3 Redes de haplotipos .....	102
2.2.11 Análisis filogenéticos.....	102

### Capítulo 3. Caracterización genética de *Triatoma infestans* de Perú..105

<b>3.1 Características generales de <i>T. infestans</i>.....</b>	<b>107</b>
3.1.1 Origen y dispersión .....	107
3.1.2 Morfología y biología .....	110
3.1.3 Estudios genéticos previos.....	111
<b>3.2 Distribución actual de <i>T. infestans</i> en Perú .....</b>	<b>112</b>
<b>3.3 Procedencia geográfica de los especímenes de <i>T. infestans</i> estudiados.....</b>	<b>114</b>
<b>3.4 Objetivos.....</b>	<b>115</b>
3.4.1 Objetivo general.....	115
3.4.2 Objetivos específicos.....	115
<b>3.5 Resultados moleculares de los especímenes de Perú.....</b>	<b>116</b>
3.5.1 Resultados obtenidos en el estudio del ADN nuclear ribosomal (ADNr) .....	116
3.5.1.1 Análisis del ITS-1 del ADNr.....	116
3.5.1.2 Análisis del ITS-2 del ADNr.....	116
3.5.1.3 Análisis de la región intergénica completa (ITS-1, 5.8S,	

ITS-2) del ADNr.....	117
<b>3.5.2    Resultados obtenidos en el estudio del ADN mitocondrial (ADNmt) ..</b>	<b>117</b>
3.5.2.1    Análisis del gen ribosomal 16S del ADNmt .....	117
3.5.2.2    Análisis del gen ND1 del ADNmt .....	117
3.5.2.3    Análisis del gen COI del ADNmt.....	118
3.5.2.4    Análisis del gen Cyt <i>b</i> del ADNmt .....	119
3.5.2.5    Análisis de la región intergénica que separa los genes Cyt <i>b</i> y ND1 del ADNmt.....	119
<b>3.6    Resultados moleculares de especímenes de Bolivia,Argentina y Chile .....</b>	<b>121</b>
<b>3.6.1    Resultados obtenidos en el estudio del ADNr .....</b>	<b>121</b>
3.6.1.1    Análisis del ITS-1 del ADNr.....	121
3.6.1.2    Análisis del ITS-2 del ADNr.....	121
3.6.1.3    Análisis de la región intergénica (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr .....	123
<b>3.6.2    Resultados obtenidos en el estudio del ADNmt.....</b>	<b>124</b>
3.6.2.1    Análisis del gen ribosomal 16S del ADNmt .....	124
3.6.2.2    Análisis del gen ND1 del ADNmt .....	125
3.6.2.3    Análisis del gen COI del ADNmt.....	126
3.6.2.4    Análisis del gen Cyt <i>b</i> del ADNmt .....	127
3.6.2.5    Análisis de la región intergénica que separa los genes Cyt <i>b</i> y ND1 del ADNmt.....	127
<b>3.7    Análisis comparado de los resultados obtenidos con las secuencias de T. infestans publicadas en GenBank.....</b>	<b>129</b>
<b>3.7.1    Análisis comparado del ADNr .....</b>	<b>129</b>
3.7.1.1    Análisis comparado del ITS-1 del ADNr .....	129
3.7.1.2    Análisis comparado del ITS-2 del ADNr .....	132
3.7.1.3    Análisis comparado de la región intergénica completa (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr .....	135
<b>3.7.2    Análisis comparado del ADNmt .....</b>	<b>139</b>
3.7.2.1    Análisis comparado del gen ribosomal 16S.....	139
3.7.2.2    Análisis comparado del gen ND1 del ADNmt.....	143
3.7.2.3    Análisis comparado del gen COI del ADNmt .....	147
3.7.2.4    Análisis comparado del gen Cyt <i>b</i> del ADNmt.....	152
3.7.2.5    Análisis comparado de la región intergénica que separa los genes Cyt <i>b</i> y ND1 del ADNmt .....	157
<b>3.8    Discusión.....</b>	<b>159</b>
<b>3.8.1    Análisis de la evolución genética de la especie T. infestans.....</b>	<b>159</b>

3.8.1.1	Marcadores del ADNr .....	162
3.8.1.2	Marcadores del ADNmt .....	164
3.8.2	Estudio de la especie <i>T. infestans</i> en Perú .....	171

## Capítulo 4. Análisis de las especies del género *Panstrongylus* de

Perú .....	175	
4.1	Características generales del género <i>Panstrongylus</i> .....	177
4.1.1	Origen y dispersión .....	179
4.1.2	Morfología y biología .....	179
4.1.3	Estudios genéticos previos.....	182
4.2	Distribución actual de especies del género <i>Panstrongylus</i> en Perú ..	183
4.2.1	<i>Panstrongylus chinai</i> .....	183
4.2.2	<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i> .....	185
4.2.3	<i>Panstrongylus geniculatus</i> .....	187
4.2.4	<i>Panstrongylus lignarius/herrerii</i> .....	189
4.3	Procedencia geográfica de los especímenes de <i>Panstrongylus</i> estudiados.....	193
4.4	Objetivos.....	194
4.4.1	Objetivo general.....	194
4.4.2	Objetivos específicos.....	194
4.5	Resultados moleculares .....	195
4.5.1	Resultados obtenidos en el estudio del ADN nuclear ribosomal (ADNr) .....	195
4.5.1.1	Análisis del ITS-1 del ADNr.....	195
4.5.1.2	Análisis del ITS-2 del ADNr.....	198
4.5.1.3	Región intergénica completa (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr .....	204
4.5.2	Resultados obtenidos en el estudio del ADN mitocondrial (ADNmt) ..	209
4.5.2.1	Análisis del gen ribosomal 16S del ADNmt .....	209
4.5.2.2	Análisis del gen ND1 del ADNmt .....	211
4.5.2.3	Análisis del gen COI del ADNmt.....	214
4.5.2.4	Análisis del gen Cyt <i>b</i> del ADNmt .....	217
4.5.2.5	Análisis de la región intergénica que separa los genes Cyt <i>b</i> y ND1 del ADNmt .....	220
4.6	Análisis comparado de los resultados obtenidos de las secuencias	

de <i>Panstrongylus</i> de Perú con las publicadas en <i>GenBank</i> .....	224
4.6.1 Análisis comparado del ADNr de <i>Panstrongylus</i> .....	224
4.6.1.1 Análisis comparado del ITS-1 del ADNr .....	224
4.6.1.2 Análisis comparado del ITS-2 del ADNr .....	225
4.6.1.3 Análisis comparado de la región intergénica del ADNr .....	226
4.6.2 Análisis comparado del ADNmt de <i>Panstrongylus</i> .....	226
4.6.2.1 Análisis comparado del gen ribosomal 16S del ADNmt.....	226
4.6.2.2 Análisis comparado del gen ND1 del ADNmt.....	227
4.6.2.3 Análisis comparado del gen COI del ADNmt.....	227
4.6.2.4 Análisis comparado del gen <i>Cyt b</i> del ADNmt.....	228
4.6.2.5 Análisis comparado de la región intergénica que separa los genes <i>Cyt b</i> y ND1 del ADNmt .....	228
4.7 Reconstrucción filogenética del género <i>Panstrongylus</i> .....	234
4.7.1 Árbol filogenético del ADNr .....	234
4.7.2 Árbol filogenético nuclear y mitocondrial .....	237
4.7.3 Árbol filogenético del ITS-2 y de <i>Cyt b</i> .....	239
4.8 Discusión.....	242
4.8.1 Marcadores del ADNr de <i>Panstrongylus</i> .....	242
4.8.2 Marcadores del ADNmt de <i>Panstrongylus</i> .....	245
4.8.3 Análisis filogenéticos del género <i>Panstrongylus</i> .....	247
4.8.4 Epidemiología de la enfermedad de Chagas relacionada con <i>Panstrongylus</i> y medidas de control.....	250
 Capítulo 5. Conclusiones .....	 253
 Capítulo 6. Bibliografía .....	 257



## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1:** Características de los marcadores del ADN mitocondrial más utilizados en estudios filogenéticos de triatomíneos. El orden de aparición es de genes más a menos conservados. Adaptado de (Bargues *et al.*, 2010). ..... 68
- Tabla 2:** Distribución por departamentos de los triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas en Perú. Se observan tanto los vectores descritos en la literatura desde 1.917 hasta la actualidad, como los encontrados en el presente estudio. Los símbolos de color rojo son los vectores añadidos que no se han descrito previamente en la literatura. .... 75
- Tabla 3:** Especies estudiadas de ejemplares procedentes de Perú y de países vecinos. Se ordenan los insectos por género: *Triatoma* y *Panstrongylus*. Se indica: total de ejemplares estudiados de cada especie y país (N); ecotopo del que provienen (ambiente), D= Domicilio, P= Peridomicilio; procedencia (localidad); y número de ejemplares analizados en cada una de las localidades geográficas (n). ..... 89
- Tabla 4:** Composición de la mezcla de reacción de PCR utilizada. \*Tampón Tris-HCL 50mM. pH: 8.0; NaCl 100mM; EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 0,1mM; DTT 1mM; Glicerol 50%; Tritón X-100 1%. \*\* Biotools ADN polymerase 1000 Units 5 U µl-1 de Biotools. .... 92
- Tabla 5:** Composición de la PCR de marcaje. \*Mezcla de reactivos y tampón pertenecientes al kit comercial: Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). \*\* Dependiendo del tamaño del fragmento a secuenciar se requiere una cantidad de ADN determinada, en este caso 1000ng: el volumen añadido dependerá de la concentración de la muestra, con un máximo de 5 µl. .... 98
- Tabla 6:** Alineamiento de las posiciones variables de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas del gen COI halladas en el estudio de *Triatoma infestans* de Perú. Aparecen indicadas las longitudes de los haplotipos nucleotídicos [pares de bases (pb)] y de los aminoácidos (Aa) y la proporción en Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. .... 118
- Tabla 7:** Alineamiento de las posiciones variables de las regiones intergénicas ARNt del ADNmt halladas en el estudio de *Triatoma infestans*. Aparecen indicadas las posiciones de las mutaciones nucleotídicas encontradas. .... 119
- Tabla 8:** Genes mitocondriales completos y la región de ARNt que los separa obtenidos en el presente estudio de *Triatoma infestans* de Perú. El orden de aparición se

basa en el orden que tienen en el ADN mitocondrial. La dirección de lectura F= del inglés *forward* se refiere a la lectura del extremo 5' al 3' y R= del inglés *reverse* se refiere a la lectura 3' a 5'. (\*) El número exacto de nucleótidos de esta secuencia no se puede determinar puesto que se superpone con el gen siguiente (ND1). ..... 120

**Tabla 9:** Alineamiento de las posiciones variables de los haplotipos hallados en el presente estudio del ITS-1 de *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Todas las variaciones observadas se deben a indels (-). Aparecen marcados los minisatélites, en rojo los  $\beta$  y en verde los  $\alpha$ , en los que se observan diferencias entre los haplotipos. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú. Bol.: Bolivia. Arg.: Argentina ..... 122

**Tabla 10:** Alineamiento de las posiciones variables de los haplotipos hallados en el presente estudio del ITS-2 de *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y el porcentaje en Adenina y Timina (AT). La mayoría de las variaciones observadas se deben a indels (-) y solo hay una mutación en la base 54. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú. .... 122

**Tabla 11:** Alineamiento de las posiciones variables de los haplotipos hallados en el presente estudio de la región intergénica completa del ADNr (ITS-1 + 5.8S + ITS-2) de *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). El marcador ITS-1 va desde la base 1 a la 700, el gen 5.8S continúa hasta la base 855 y finalmente, el ITS-2 va desde la base 856 hasta la última base (1.304, 1.323 o 1.330), cuya longitud depende del haplotipo. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú. .... 123

**Tabla 12:** Alineamiento de las posiciones variables de los haplotipos hallados en el presente estudio del gen 16S de *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se observa una mutación nucleotídica en la posición 431; (-) indica inserción-delección. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú. .... 124

**Tabla 13:** Alineamiento de las posiciones variables de los haplotipos hallados en el presente estudio del gen ND1 de *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y en aminoácidos (Aa) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Aparecen indicadas las posiciones de las mutaciones observadas en la secuencia nucleotídica y en su traducción en aminoácidos. Se

incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú (Pe). Bol: Bolivia. Arg: Argentina y Chi: Chile. .... 125

**Tabla 14:** Alineamiento de las posiciones variables de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas, halladas en el presente estudio, del gen COI en *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y en aminoácidos (Aa) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Aparecen indicadas las posiciones de las mutaciones observadas tanto en las secuencias nucleotídicas como en su traducción en aminoácidos. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú..... 126

**Tabla 15:** Alineamiento de las posiciones variables de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas, halladas en el presente estudio únicamente del gen completo Cyt *b* en *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y en aminoácidos (Aa) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Aparecen indicadas las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como en su traducción en aminoácidos. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú. .... 128

**Tabla 16:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas de las regiones intergénicas ARNt del ADNmt halladas en el presente estudio en *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Aparecen indicadas la posiciones de las mutaciones encontradas. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú. .... 128

**Tabla 17:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en los 3 haplotipos completos comparados del marcador ITS-1 del ADNr de *Triatoma infestans*. Se observa como todas las posiciones variables se deben a indels. 130

**Tabla 18:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del ITS-1 en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica no se puede calcular porque el programa DNAsp v.5.10.1 no tiene en cuenta los gaps;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias no la puede calcular porque el programa DNAsp v.5.10.1 no tiene en cuenta los gaps. D de Tajima y  $F_S$  de Fu: test de neutralidad. El grupo Andino se compone de un haplotipo exclusivamente (T.inf-HA) por lo que no hay polimorfismos. .... 131

- Tabla 19:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en los 7 haplotipos completos comparados del ITS-2 del ADNr de *Triatoma infestans*. S= singleton; P= posiciones parsimónicamente informativas. .... 133
- Tabla 20:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del ITS-2 en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y  $F_S$  de Fu: test de neutralidad. .... 134
- Tabla 21:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (Nested AMOVA) que mide la diversidad genética del ITS-2 del ADNr de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a la diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de las poblaciones..... 134
- Tabla 22:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en los 7 haplotipos comparados de la región intergénica completa del ADNr (ITS-1, 5.8S, ITS-2) de *Triatoma infestans*. El marcador ITS-1 va desde la base 1 a la 700, el gen 5.8S continúa hasta la base 855 y finalmente, el ITS-2 va desde la base 856 hasta la última base (1.302-1.330). P= posiciones parsimónicamente informativas. 136
- Tabla 23:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias de la región intergénica del ADNr en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y  $F_S$  de Fu: test de neutralidad..... 137
- Tabla 24:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (Nested AMOVA) que mide la diversidad genética de la región intergénica del ADNr de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a la diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de las poblaciones..... 138
- Tabla 25:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en las 509 pares de bases de los 15 haplotipos comparados del gen 16S de *Triatoma infestans*. P.E: haplotipos hallados en el presente estudio; (\*): Nombre

estandarizado para las agrupaciones de secuencias homólogas, del presente estudio y publicadas en GenBank: T.inf-16S.C= agrupa 7 secuencias, T.inf-16S.D= agrupa 2 secuencias. La información sobre las secuencias se puede consultar en el Anexo IV. S= singleton. P= posiciones parsimónicamente informativas. .... 140

**Tabla 26:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del gen 16S de *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (lugares polimórficos); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y  $F_S$  de Fu: test de neutralidad..... 141

**Tabla 27:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (Nested AMOVA) que mide la diversidad genética del gen 16S de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de las poblaciones. 142

**Tabla 28:** Alineamiento de las posiciones variables halladas en los 5 haplotipos publicados del gen ND1 de *Triatoma infestans*. P.E.= haplotipo hallado en el presente estudio. (Aa)= aminoácidos. S= singleton. P= posiciones parsimónicamente informativas..... 144

**Tabla 29:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del gen ND1 del ADNmt en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones ); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y Fu's  $F_S$ : test de neutralidad..... 145

**Tabla 30:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (Nested AMOVA) que mide la diversidad genética del gen ND1 de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a la diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de las poblaciones. .... 146

**Tabla 31:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en las 446 pares de bases de los 52 haplotipos comparados del gen COI de *Triatoma infestans*. (Aa)= aminoácidos; (\*)= Nombre estandarizado para las agrupaciones

de secuencias homólogas halladas en GenBank: T.inf-COI.e = agrupa 2 secuencias, T.inf-COI.f = 15, T.inf-COI.i = 13, T.inf-COI.j = 21, T.inf-COI.k = 31, T.inf-COI.l = 6, T.inf-COI.m = 2, T.inf-COI.n = 3, T.inf-COI.h = 14. La información sobre las secuencias se puede consultar en el Anexo IV; S= singleton; P= posiciones parsimónicamente informativas..... 148

**Tabla 32:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del gen COI del ADNmt en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y  $F_S$  de Fu: test de neutralidad..... 149

**Tabla 33:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (Nested AMOVA) que mide la diversidad genética del gen COI de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a diferenciación genética dentro de las poblaciones. ... 150

**Tabla 34:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en las 448 pares de bases de los 56 haplotipos comparados del gen Cyt b de *Triatoma infestans*. P.E.= nuevos haplotipos hallados en el presente estudio; (\*)= Nombre estandarizado para las agrupaciones de secuencias homólogas halladas en GenBank: T.inf-Cytb f = 2 secuencias. La información sobre las secuencias se puede consultar en el Anexo VII; S= singleton; P= posiciones parsimónicamente informativas. .... 153

**Tabla 35:** Alineamiento de las posiciones variables aminoacídicas halladas en el fragmento de 149 aminoácidos de los 37 haplotipos para los que codifican el fragmento comparado del gen Cyt b de *Triatoma infestans*. P.E.= nuevos haplotipos hallados en el presente estudio; (\*)= agrupación de secuencias homólogas halladas en GenBank a las que se le ha dado un nombre estandarizado: T.inf-Cytb f= 2 secuencias; S= singleton; P= posiciones parsimónicamente informativas..... 154

**Tabla 36:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del gen Cyt b del ADNmt en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y  $F_S$  de Fu: test de neutralidad..... 155

- Tabla 37:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (Nested AMOVA) que mide la diversidad genética del gen *Cyt b* de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10. 000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a diferenciación genética entre poblaciones. .... 156
- Tabla 38:** Listado de las 13 especies del género *Panstrongylus* y las especies con las que establecen sinonimias. Tabla modificada (Patterson *et al.*, 2009). .... 178
- Tabla 39:** Alineamiento de las posiciones variables de los 3 haplotipos obtenidos en el estudio del espaciador transcrito interno ITS-1 de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (-) indel. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 196
- Tabla 40:** Alineamiento de las posiciones variables de los 10 haplotipos obtenidos en el estudio del espaciador transcrito interno ITS-2 de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb), porcentaje de Adenina y Timina (%AT) y método de obtención de las secuencias (SD=Secuenciación directa; C= Clonación). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (-) indel. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 201
- Tabla 41:** Comparativa de las posiciones polimórficas y los indels del marcador ITS-2 del ADNr entre los haplotipos hallados para *Panstrongylus chinai* de Perú. Se indica en cada comparativa: (i) número de mutaciones; (ii) número de indels introducidos para el alineamiento; (iii) número total de diferencias (mutaciones + indels); / y (iv) porcentaje de diferencias (mutaciones+indels) con respecto al número total de pares de bases de la secuencia de la primera columna. .... 202
- Tabla 42:** Alineamiento de las posiciones variables de los 10 haplotipos obtenidos en el estudio de la región intergénica del ADNr de *Panstrongylus chinai* que comprende el marcador ITS-1 desde la posición 1 a la 632, el gen 5.8S desde la 633 a la 787 y el marcador ITS-2 desde la posición 788 hasta el final de cada secuencia. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb), porcentaje de Adenina y Timina (%AT) y método de obtención de las secuencias (SD=Secuenciación directa; C= Clonación) para cada haplotipo. Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (-) indel. (.) la secuencia en esa posición

posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 205

**Tabla 43:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos obtenidos en el estudio de la región intergénica del ADNr de *Panstrongylus geniculatus*. El marcador ITS-1 comprende desde la posición 1 a la 668, el gen 5.8S desde la 669 a la 823 y el marcador ITS-2 desde la posición 824 hasta la 1.329. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (-) indel. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 206

**Tabla 44:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos obtenidos en el estudio de la región intergénica del ADNr de *Panstrongylus herrerii*. El marcador ITS-1 comprende desde la posición 1 a la 573, el gen 5.8S desde la 574 a la 728 y el marcador ITS-2 desde la posición 729 hasta la 1.220. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (-) indel. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 207

**Tabla 45:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos obtenidos en el estudio del gen 16S de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud en pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo..... 209

**Tabla 46:** Alineamiento de las posiciones variables de los 5 haplotipos obtenidos en el estudio del gen 16S de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud en pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 210

**Tabla 47:** Alineamiento del fragmento inicial de 545 pares de bases de las posiciones variables de los 3 haplotipos nucleotídicos y aminoacídicos obtenidos en el estudio del gen ND1 de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto para la secuencia nucleotíca como para la aminoacídica. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido o aminoácido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.. 212

- Tabla 48:** Alineamiento de las posiciones variables de los 3 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen ND1 de *Panstrongylus geniculatus*. Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida. Aa= posiciones variables aminoácidas. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. .... 213
- Tabla 49:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen ND1 de *Panstrongylus herreri*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto para la secuencia nucleotídica como para la aminoácida. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 214
- Tabla 50:** Alineamiento de las posiciones variables de los 3 haplotipos nucleotídicos obtenidos en el estudio del gen COI de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas en la secuencia nucleotídica. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 215
- Tabla 51:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen COI de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 216
- Tabla 52:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen COI de *Panstrongylus herreri*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 217
- Tabla 53:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen Cyt *b* de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 218

**Tabla 54:** Alineamiento de las posiciones variables de los 3 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen *Cyt b* de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida. (-) indel. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. %Individuo/haplotipo: muestra qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 219

**Tabla 55:** Alineamiento de las posiciones variables de los 7 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen *Cyt b* de *Panstrongylus herreri*. Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida (Aa). Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto para la secuencia nucleotídica como para la aminoácida. (-) indel. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. . %Individuo/haplotipo: muestra qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo nucleotídico. .... 220

**Tabla 56:** Alineamiento de las posiciones variables de las 2 secuencias nucleotídicas obtenidas en el estudio de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 del ADNmt de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas en la secuencia nucleotídica. (-) indel. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 222

**Tabla 57:** Alineamiento de las posiciones variables de las 2 secuencias nucleotídicas obtenidas en el estudio de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 del ADNmt de *Panstrongylus herreri*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas en la secuencia nucleotídica. (-) indel. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo. .... 222

**Tabla 58:** Alineamiento de las posiciones variables halladas en las 514 pares de bases de los 25 haplotipos comparados del gen 16S de las especies del género *Panstrongylus*. P.E.: haplotipo hallado en el presente estudio, sin publicar en GenBank. Desc.: procedencia desconocida. S: singleton. P: posición parsimónicamente informativa. Dentro de las secuencias "Y" y "?" son símbolos

introducidos por los autores para poder alinear las secuencias. (.): posición homóloga al primer haplotipo comparado. (-): indel insertado en el alineamiento. .... 229

**Tabla 60:** Alineamiento de las posiciones variables halladas en las 545 pares de bases de los 12 haplotipos comparados del gen ND1 de las especies del género *Panstrongylus*. P.E.: haplotipo hallado en el presente estudio, sin publicar en GenBank. Pe/Ecu: el haplotipo se halla en Perú y Ecuador. S: singleton. P: posición parsimónicamente informativa. (.): posición homóloga al primer haplotipo comparado. .... 230

**Tabla 59:** Alineamiento de las posiciones variables halladas en las secuencias de 181 aminoácidos obtenidas de la traducción de los 12 haplotipos comparados del gen ND1 de las especies del género *Panstrongylus*. P.E.: haplotipo hallado en el presente estudio, sin publicar en GenBank. (.): posición homóloga al primer haplotipo comparado. .... 230

**Tabla 61:** Alineamiento de las posiciones variables halladas en las 625 pares de bases (tabla superior y continuación en tabla de la izquierda) y en los 208 aminoácidos (tabla de la izquierda) obtenidos de los 10 haplotipos comparados del gen COI de las especies del género *Panstrongylus*. P.E.: haplotipo hallado en el presente estudio, sin publicar en GenBank. Desc.: procedencia desconocida. S: singleton. P: posición parsimónicamente informativa. (.): posición homóloga al primer haplotipo comparado. (-): indel insertado en el alineamiento..... 231

**Tablas 62 y 63:** Alineamiento de las posiciones variables halladas en las 431 pares de bases y en los 143 aminoácidos obtenidos de los 45 haplotipos comparados del gen *Cyt b* de las especies del género *Panstrongylus*. P.E.: haplotipo hallado en el presente estudio, sin publicar en GenBank. Desc.: procedencia desconocida. S: singleton. P: posición parsimónicamente informativa. (.): posición homóloga al primer haplotipo comparado. (-): indel insertado en el alineamiento..... 233



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribución geográfica de los DTU's de *Trypanosoma cruzi* en ciclos domésticos y silvestres. Fuente: (Zingales *et al.*, 2012)..... 47
- Figura 2:** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Figura obtenida de la página web del Centre for Disease Control and Prevencion (CDC) (<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/>). ..... 48
- Figura 3:** Mapa que muestra las zonas de América Central y América del Sur donde existe transmisión vectorial. Figura obtenida de la página web de la Asociación Panamericana de la Salud (OPS) (<https:paho.org>). ..... 50
- Figura 4:** Signos clínicos de la fase aguda de la enfermedad de Chagas. A) Chagoma en un brazo. Figura obtenida de: <http://maismedicosamor.blogspot.com.es>; B) Signo de Romaña en una niña. Figura obtenida de: <http://patologiabemiliapb.blogspot.com>; C) Imágenes del niño Elías Paredes tomadas en Arequipa (Perú) con esplenomegalia. Fuente: (Ayulo & Herrer 1944). ..... 51
- Figura 5:** Iniciativas internacionales llevadas a cabo para el control vectorial de la enfermedad de Chagas. Adaptado de (Guhl, 2007)..... 57
- Figura 6:** Mapa de América del Sur: (A) En color azul oscuro se marca la distribución geográfica de *Triatoma infestans* en la década de los 80; (B) En color azul claro se marca la distribución geográfica actual de *T. infestans*, tras las campañas de control vectorial, se aprecia cómo la distribución del vector se ha visto ampliamente reducida..... 58
- Figura 7:** Clasificación de la subfamilia Triatominae. El número de especies se corresponde con los trabajos publicados hasta el momento. \* Este género tiene una especie fósil *Panstrongylus hispaniolae* Ponair Jr, 2013. \*\*Dentro de *Triatoma* (84 especies), 12 especies ha sido reasignadas a 3 nuevos géneros: *Meccus* (6 especies), *Mepraia* Mazza, Gajardo y Jörg, 1940 (3 especies), *Nesotriatoma* (3 especies).\*\*\* Este género tiene una especie fósil: *Triatoma dominicana* Ponair Jr., 2005. Fuente: (Bargues *et al.*, 2017). ..... 61
- Figura 8:** Esquema del ADN ribosomal nuclear eucariota ..... 64
- Figura 9:** Esquema del ADN mitocondrial de *Triatoma dimidiata*. Fuente: (Dotson & Beard, 2001)..... 68

<b>Figura 10:</b> Imagen de Edmundo Escomel médico Arequipeño que diagnosticó en 1.919 el primer caso humano de la enfermedad de Chagas en Perú. Fuente: (Náquira & Cabrera, 2009). .....	72
<b>Figura 11:</b> Mapa de la distribución de la enfermedad de Chagas en Perú en 1.960 y los vectores responsables de esta en cada zona. Fuente: (Herrer, 1960). .....	73
<b>Figura 12:</b> Mapa de Perú en el que aparecen numerados los departamentos y mediante un símbolo se indica qué triatominos vectores de la enfermedad de Chagas se han encontrado tanto en la literatura como en el presente estudio.....	76
<b>Figura 13:</b> Mapa de los departamentos de Perú en los que existen casos humanos autóctonos de Chagas. Aparecen marcadas las 3 macro regiones: en color gris la macro región norte; en color azul la macro región central; y en color verde la macro región sur.....	77
<b>Figura 14:</b> Casos humanos de la enfermedad de Chagas declarados en Perú hasta el 26 de abril de 2.017 recogidos por la Red Nacional de Epidemiología y Control de Enfermedades (RENACE) perteneciente al Ministerio de Salud de Perú. (A): Número de casos declarados por departamento al año desde 2.014 hasta 2.017. (B) Distribución anual de los casos humanos de la enfermedad de Chagas declarados desde el año 2.000 hasta 2.017 en Perú. Fuente: (RENACE, 2017). 78	
<b>Figura 15:</b> Imágenes de viviendas construidas en la periferia de Arequipa, que va desde el punto A, en el que se encuentran las recientemente erigidas, en los bordes del cerro, hasta las de la zona urbanizada del distrito Mariano Melgar (punto C), y una zona intermedia (punto B) que incluye “pueblos jóvenes”. Imagen adaptada de (Náquira, 2014). .....	83
<b>Figura 16:</b> Mapas políticos que muestran la procedencia y la distribución de los materiales estudiados. Se indican mediante diferentes formas y colores las especies analizadas en el presente estudio. Aparece ampliado a la derecha el mapa político de Perú en el que se observan qué ejemplares se han recogido en cada uno de los departamentos del país. ....	87
<b>Figura 17:</b> Gel de agarosa visto a través de un iluminador de luz UV. Véanse las bandas de ADN amplificadas con fluorescencia de color rosa. ....	94
<b>Figura 18:</b> Esquema del proceso de clonación de fragmentos de ADN. ....	97
<b>Figura 19:</b> Hembra adulta de <i>Triatoma infestans</i> . ....	107
<b>Figura 20:</b> Mapa de Bolivia en el que aparecen marcados con puntos los orígenes geográficos propuestos para la especie <i>Triatoma infestans</i> . En azul, se marcan los puntos pertenecientes a los valles de Cochabamba (Andes) origen propuesto por	

la hipótesis clásica y en rojo, se marca el Chaco Boliviano lugar de origen según la nueva hipótesis (Noireau <i>et al.</i> , 2005).....	108
<b>Figura 21:</b> Cerdos guineanos ( <i>Galea musteloides</i> ). A) Granja doméstica de cerdos guineanos Fuente: <a href="http://www.ipsnews.net">http://www.ipsnews.net</a> . B) Brochetas de cerdo guineano plato típico de Cusco Fuente: <a href="http://www.pinterest.com">http://www.pinterest.com</a> .....	110
<b>Figura 22:</b> Mapa político de Perú en el que aparecen marcados en color gris los departamentos en los que se encuentra actualmente <i>Triatoma infestans</i> .....	113
<b>Figura 23:</b> Mapa de la distribución geográfica de los ejemplares de <i>Triatoma infestans</i> estudiados. Aparece a la izquierda la procedencia por países de los insectos en América del Sur y a la derecha, la procedencia por departamentos en Perú. .	114
<b>Figura 24:</b> Red Network del ITS-1 de <i>Triatoma infestans</i> generada con el algoritmo Median Joining. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. Los puntos pequeños de color negro son vectores insertados por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1.....	132
<b>Figura 25:</b> Red Network del ITS-2 de <i>Triatoma infestans</i> generada con el algoritmo Median Joining. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. El punto pequeño de color negro es un vector insertado por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1.....	135
<b>Figura 26:</b> Red Network de la región intergénica completa del ADNr de <i>Triatoma infestans</i> generada con el algoritmo Median Joining. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. Los puntos pequeños de color negro son vectores insertados por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1.....	139
<b>Figura 27:</b> Red Network del gen ribosomal 16S de <i>Triatoma infestans</i> generada con el algoritmo Median Joining. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis.	

El haplotipo T.inf-16S.B agrupa a las secuencias: T.inf-16S.F, T.inf-16S.D Arg, T.inf-16S.A/C y T.inf-16S.C Arg. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1. .... 143

**Figura 28:** Red Network del gen mitocondrial ND1 de *Triatoma infestans* generada con el algoritmo Median Joining. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. El punto pequeño de color negro es un vector insertado por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. Imagen modificada a partir del programa Network 5.0.0.1. .... 146

**Figura 29:** Red de haplotipos Network del gen mitocondrial COI de *Triatoma infestans* generada con el algoritmo Median Joining. El área de de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. Los puntos pequeños de color negro son vectores insertados por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. **S** = haplotipos de especímenes silvestres; **D** = haplotipos de especímenes domésticos. Numeración de los haplotipos: H1: T.inf-COI.a; H2: T.inf-COI.b; H3: T.inf-COI.e; H4: T.inf-COI.f; H5: T.inf-COI.LE197; H6: T.inf-COI.LE194; H7: T.inf-COI.ap; H8: T.inf-az; H9: T.inf-COI.LE196; H10: T.inf-COI.LE152; H11: T.inf-COI.m (silvestre); H12: T.inf-COI.aaa (silvestre); H13: T.inf-COI.Arg8 (silvestre); H14: T.inf-COI.av; H15: T.inf-COI.LE034; H16: T.inf-COI.j (silvestre); H17: T.inf-COI.n (domiciliado y silvestre); H18: T.inf-COI.ax; H19: T.inf-COI.Arg4 (silvestre); H20: T.inf-COI.ay; H21: T.inf-COI.LE124; H22: T.inf-COI.Arg6 (silvestre); H23: T.inf-COI.aab (silvestre); H24: T.inf-COI.al; H25: T.inf-COI.aad (silvestre); H26: T.inf-COI.l (silvestre); H27: T.inf-COI.LE213; H28: T.inf-COI.LE039; H29: T.inf-COI.k (domiciliado y silvestre); H30: T.inf-COI.LE031; H31: T.inf-COI.LE156; H32: T.inf-COI.Arg7 (silvestre); H33: T.inf-COI.LE215; H34: T.inf-COI.LE118; H35: T.inf-COI.LE128; H36: T.inf-COI.i (silvestre); H37: T.inf-COI.LE218; H38: T.inf-COI.aac (silvestre); H39: T.inf-COI.ao; H40: T.inf-COI.c, T.inf-Coi.d; H41: T.inf-COI.LE146; H42: T.inf-COI.LE333; H43: T.inf-COI.h; H44: T.inf-COI.LE220; H45: T.inf-COI.LE089; H46: T.inf-COI.LE088; H47: T.inf-COI.au. Imagen modificada a partir del programa Network 5.0.0.1. .... 151

**Figura 30:** Red de haplotipos Network del gen mitocondrial Cyt b de *Triatoma infestans* estudiados generada con el algoritmo Median Joining. El área de de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. Los puntos pequeños de color negro son vectores insertados

por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de mutaciones aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. **S** = haplotipos de especímenes silvestres. **S/D** = el haplotipo engloba especímenes silvestres y domiciliados. Numeración de los haplotipos: H1: T.inf-Cytb.a; H2: T.inf-Cytb.e (silvestre y domiciliado); H3: T.inf-Cytb.d; H4: T.inf-Cytb.V (silvestre); H5: T.inf-Cytb.XL (silvestre); H6: T.inf-Cytb.XXVII (silvestre); H7: T.inf-Cytb.VII (silvestre); H8: T.inf-Cytb.VIII (silvestre); H9: T.inf-Cytb.f (silvestre y domiciliado); H10: T.inf-Cytb.b, T.inf-Cytb.c, T.inf-Cytb.XXXVI, T.inf-Cytb.Cbra, T.inf-Cytb.clone (silvestre y domiciliado); H11: T.inf-Cytb.II (silvestre); H12: T.inf-Cytb.39; H13: T.inf-Cytb.3; H14: T.inf-Cytb.33; H15: T.inf-Cytb.14; H16: T.inf-Cytb.37; H17: T.inf-Cytb.23; H18: T.inf-Cytb.25; H19: T.inf-Cytb.36; H20: T.inf-Cytb.21; H21: T.inf-Cytb.18; H22: T.inf-Cytb.31; H23: T.inf-Cytb.19; H24: T.inf-Cytb.5; H25: T.inf-Cytb.28; H26: T.inf-Cytb.17; H27: T.inf-Cytb.16; H28: T.inf-Cytb.32; H29: T.inf-Cytb.2; H30: T.inf-Cytb.30; H31: T.inf-Cytb.24; H32: T.inf-Cytb.15; H33: T.inf-Cytb.4; H34: T.inf-Cytb.6; H35: T.inf-Cytb.7; H36: T.inf-Cytb.11; H37: T.inf-Cytb.13; H38: T.inf-Cytb.12; H39: T.inf-Cytb.10; H40: T.inf-Cytb.9; H41: T.inf-Cytb.8; H42: T.inf-Cytb.27; H43: T.inf-Cytb.26; H44: T.inf-Cytb.41; H45: T.inf-Cytb.38; H46: T.inf-Cytb.42; H47: T.inf-Cytb.40; H48: T.inf-Cytb.22; H49: T.inf-Cytb.29; H50: T.inf-Cytb.35; H51: T.inf-Cytb.20; H52: T.inf-Cytb.34. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1. .... 158

**Figura 31:** Fotografías de las 13 especies formadoras del género *Panstrongylus*. (Patterson *et al.*, 2009). .... 178

**Figura 32:** Comparación de las cabezas de dos ejemplares adultos de: (a) *Triatoma vitticeps* y (b) *Panstrongylus megistus*. Las imágenes están escaladas a la misma longitud, se observa como el tubérculo antenífero (ii) es más largo en el género *Triatoma* (a) y las antenas quedan más separadas de los ojos, mientras que en *Panstrongylus* (b), los ojos son más grandes, el tubérculo es más pequeño y las antenas quedan más cerca de los ojos (Patterson *et al.*, 2009). .... 180

**Figura 33:** Macho adulto de *Panstrongylus chinai*. .... 183

**Figura 34:** Mapa de la distribución de *Panstrongylus chinai* en Perú. Se marcan en color gris los departamentos de Perú en los que se ha encontrado este vector, a la izquierda aparecen los nombres de cada departamento con su correspondiente numeración. .... 184

**Figura 35:** Macho adulto de *Panstrongylus rufotuberculatus*. .... 185

**Figura 36:** Mapa de la distribución de *Panstrongylus rufotuberculatus* en Perú. Se marcan en color gris los departamentos de Perú en los que se ha encontrado este

vector, a la izquierda aparecen los nombres de cada departamento con su correspondiente numeración.....	186
<b>Figura 37:</b> Macho adulto de <i>Panstrongylus geniculatus</i> .....	187
<b>Figura 38:</b> Mapa de la distribución de <i>Panstrongylus geniculatus</i> en Perú. Se marcan en color gris los departamentos de Perú en los que se ha encontrado este vector, a la izquierda aparecen los nombres de cada departamento con su correspondiente numeración.....	188
<b>Figura 39:</b> Hembra de <i>Panstrongylus lignarius/herrerii</i> .....	189
<b>Figura 40:</b> Mapa en el que se observa de color azul, con un trazo más grueso, el río Marañón en Perú, este río atraviesa los departamentos de Huánuco, Ancash, La Libertad, San Martín, Cajamarca, Amazonas y Loreto. Imagen obtenida de: ( <a href="https://sierrarios.org">https://sierrarios.org</a> ).....	190
<b>Figura 41:</b> Mapa de la distribución de <i>Panstrongylus herrerii</i> en Perú. Se marcan en color gris los departamentos de Perú en los que se ha encontrado este vector, a la izquierda aparecen los nombres de cada departamento con su correspondiente numeración.....	191
<b>Figura 42:</b> Mapa de la distribución geográfica de los ejemplares de <i>Panstrongylus</i> estudiados. Aparecen numerados y marcados en color gris los departamentos donde han sido capturados los ejemplares en Perú. Cada especie estudiada se marca mediante un punto de color en el lugar donde fue colectada.....	193
<b>Figura 43:</b> Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-1 de los <i>Panstrongylus chinai</i> estudiados procedentes de Perú. Se representa la secuencia del haplotipo hallado mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3' los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento. Los dos minisatélites detectados se repiten 3 veces cada uno a lo largo de la secuencia.....	195
<b>Figura 44:</b> Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-1 de los <i>Panstrongylus geniculatus</i> estudiados procedentes de Perú. Se representa la secuencia del haplotipo hallado mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3' los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento.....	197
<b>Figura 45:</b> Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-1 de los <i>Panstrongylus herrerii</i> estudiados procedentes de Perú. Se representan las secuencias de los haplotipos hallados mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3' los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento..	197
<b>Figura 46:</b> Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-2 de los <i>Panstrongylus chinai</i> estudiados procedentes de Perú. Se representan las	

secuencias de los haplotipos largos mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3' y los minisatélites hallados entre las bases 42 y 77. Los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento. La tabla inferior muestra las diferencias en composición nucleotídica entre los haplotipos largos y los cortos en el fragmento donde se hallan los minisatélites (marcados en rojo). Se observa como en la mayoría de las posiciones de los nucleótidos que forman los minisatélites en las secuencias cortas hay indels (-). En la secuencia nucleotídica que separa los minisatélites la diferencia entre ambos haplotipos se deben a un indel en la posición 60 ..... 200

**Figura 47:** Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-2 de los *Panstrongylus geniculatus* estudiados procedentes de Perú. Se representan las secuencias de los haplotipos largos mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3'. Los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento. Los minisatélites se localiza al inicio de la secuencia entre las bases 40 y 73. Dentro de los recuadros se indican los minisatélites hallados y en el centro la secuencia nucleotídica que los separa. .... 203

**Figura 48:** Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-2 de los *Panstrongylus herreri* estudiados procedentes de Perú. Se representa la secuencia de los haplotipos hallados mediante la línea gruesa en sentido 5' - 3' los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento. Los minisatélites se localiza al inicio de la secuencia entre las bases 38 y 64. Dentro de los recuadros se indican los minisatélites hallados y en el centro la secuencia nucleotídica que los separa. .... 203

**Figura 49:** Mapa de la distribución geográfica de los haplotipos de la región intergénica del ADNr de las especies de *Panstrongylus* de Perú obtenidos en el presente estudio. Se representa cada especie con un color, dentro de cada color las diferentes tonalidades representan diferentes haplotipos ..... 208

**Figura 50:** Mapa de la distribución geográfica de los haplotipos concatenados del ADNmt de las especies de *Panstrongylus* de Perú, caracterizadas en el presente estudio. Se representa cada especie con un color, dentro de cada color las diferentes tonalidades representan diferentes haplotipos. .... 223

**Figura 51:** Minisatélites detectados en el marcador ITS-2 en todas las especies de *Panstrongylus* estudiadas. La secuencia del marcador ITS-2 se representa mediante la línea gruesa negra y la línea rayada ya que en función de la especie, la longitud del marcador puede variar de 348 a 601 pb. Cada especie presenta un número de repeticiones diferentes de AT y tiene una secuencia de nucleótidos distinta entre los minisatélites. .... 225

**Figura 52:** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (-Ln=5406,27683) cuya matriz son los marcadores de ADNr ITS-1 e ITS-2 de especies de *Panstrongylus*. El modelo evolutivo utilizado ha sido GTR. Los valores de soporte de los nodos (a/b), han sido obtenidos utilizando métodos probabilísticos basados en caracteres: a: Máxima Verosimilitud mediante el método Bootstrap con el software RAxML v.8.1.7; y b: Inferencia Bayesiana mediante probabilidad posterior con el software MrBayes v.3.2.6. Como grupo externo se ha utilizado *Triatoma infestans* de Perú. La barra de la escala indica el número de sustituciones por posición de la secuencia. Para obtener más información sobre los haplotipos revisar los anexos VII, X y XI ..... 236

**Figura 53:** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (-Ln=12127,5073) cuya matriz son los marcadores de ADNr ITS-1 e ITS-2 y los genes del ADNmt 16S, ND1, COI, Cyt *b* de especies de *Panstrongylus*. El modelo evolutivo utilizado ha sido GTR. Los valores de soporte de los nodos (a/b), han sido obtenidos utilizando métodos probabilísticos basados en caracteres: a: Máxima Verosimilitud mediante el método Bootstrap con el software RAxML v.8.1.7; y b: Inferencia Bayesiana mediante probabilidad posterior con el software MrBayes v.3.2.6. Como grupo externo se ha utilizado *Triatoma infestans* de Perú. La barra de la escala indica el número de sustituciones por posición de la secuencia. Para obtener más información sobre los haplotipos revisar los anexos VII - XVI. .... 239

**Figura 54:** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (-Ln= 5021,96294) cuya matriz es el conjunto formado por la unión del marcador ITS-2 del ADNr ITS-2 y del gen Cyt *b* del ADNmt de especies de *Panstrongylus*. El modelo evolutivo utilizado ha sido GTR. Los valores de soporte de los nodos (a/b), han sido obtenidos utilizando métodos probabilísticos basados en caracteres: a: Máxima Verosimilitud mediante el método Bootstrap con el software RAxML v.8.1.7; y b: Inferencia Bayesiana mediante probabilidad posterior con el software MrBayes v.3.2.6. Como grupo externo se ha utilizado *Triatoma infestans* de Perú. La barra de la escala indica el número de sustituciones por posición de la secuencia. Para obtener más información sobre los haplotipos revisar los anexos XI y XVI. .... 242





# Capítulo 1. Introducción. La enfermedad de Chagas y su situación actual en Perú



## 1.1 La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas fue descubierta por Carlos Chagas (1879-1934) constituyendo un caso único en la historia de la medicina, puesto que en un plazo de dos años describió: el parásito, su ciclo biológico, el insecto vector y las características patológicas, clínicas y epidemiológicas de la enfermedad (Chagas, 1909).

La enfermedad de Chagas está causada por un protozoo denominado inicialmente *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909 y al que más tarde se le denominó *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad es transmitida principalmente a través de insectos vectores hematófagos de la subfamilia Triatominae (Reduviidae). Los vectores son cruciales a la hora de establecer la distribución geográfica, patrones de transmisión y principales características epidemiológicas. La ausencia de vacunas y de drogas efectivas crean un escenario en el que los vectores se convierten en la principal diana de control.

### 1.1.1 Características generales de la enfermedad

La enfermedad de Chagas también llamada tripanosomiasis americana es una de las enfermedades consideradas como *Neglected Tropical Diseases* o Enfermedades Tropicales Olvidadas. Recibe esta denominación por tratarse de una patología que afecta principalmente a la población más pobre de Latinoamérica y por no recibir la ayuda económica internacional acorde a su magnitud (Hotez *et al.*, 2007). Inicialmente, esta enfermedad estaba confinada en América del Sur pero en la actualidad se ha propagado a otros continentes. El agente causante es *T. cruzi*, transmitido principalmente a través de las heces u orina de vectores, insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (Reduviidae) conocidos comúnmente, en función del país, como vinchucas, chinches, chirimacha... (OMS, 2017). El número de infectados, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) - *World Health Organization* (WHO), decreció desde los 30 millones de personas en 1990, a 15 millones en marzo de 2006 (OPS, 2006; OPS & FMS, 2007) y a unos ocho millones en la actualidad, todo ello gracias a las campañas de control. La enfermedad de Chagas se

encuentra principalmente en zonas endémicas de 21 países de América Latina, entre los que se encuentra Perú además, el fenómeno de las migraciones humanas ha creado nuevos escenarios en otras regiones del mundo como Europa, Japón y Australia. A pesar de los grandes progresos en la reducción de la transmisión en las zonas endémicas, en el caso de los países Andinos, el progreso ha sido limitado, en parte debido a factores sociales como las condiciones de vida y en parte, a la escasez de recursos y a las limitaciones técnicas en las campañas de control (Grijalva *et al.*, 2015; Sosa-Estani & Segura, 2015).

### 1.1.2 Etiología, agente causal

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el protozoo *T. cruzi* cuya posición sistemática es la siguiente (Levine *et al.*, 1980):

Reino PROTISTA Haeckel, 1866

Subreino PROTOZOA Goldfuss, 1818; emend. Levine *et al.* (1980)

Phylum SARCOMASTIGOPHORA Honigberg and Balaniuth, 1963;  
emend. Levine *et al.* (1980)

Subphylum MASTIGOPHORA Diesing, 1866; Levine *et al.* (1980)

Clase ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909

Orden KINETOPLASTIDA Honigberg, 1963

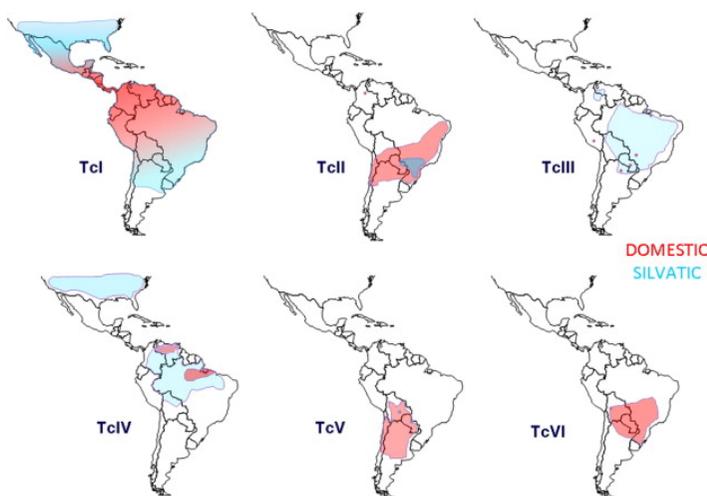
Familia TRYPANOSOMATIDAE Doflein, 1901; emend. Grobben,  
1905

Género *Trypanosoma* Gruby, 1843

Subgénero *Schizotrypanum* Chagas, 1909

*T. cruzi* presenta una gran variabilidad biológica, así como bioquímica y genética lo que ha llevado a la creación de múltiples clasificaciones según biodemas, zimodemas o grupos genéticos. Finalmente, en 2009, se estableció una nomenclatura consenso según la cual se clasifica a *T. cruzi*, en función de su variabilidad genética, en seis grupos denominados en inglés *Discrete Typing Units* (DTU's): *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV),

*T. cruzi* V (TcV) y *T. cruzi* VI (TcVI). Cada grupo presenta su propia distribución geográfica, epidemiología y manifestaciones clínicas de la enfermedad (Zingales *et al.*, 2012; Higuera *et al.*, 2013). TcI predomina en ambientes domésticos, lo que implica un alto riesgo de transmisión vectorial, en el norte y centro de América del Sur; TcII, TcV y TcVI son los más abundantes en el cono sur; TcIII y TcIV se han encontrado en humanos solo de forma esporádica (Zingales *et al.*, 2009, 2012) (Figura 1).

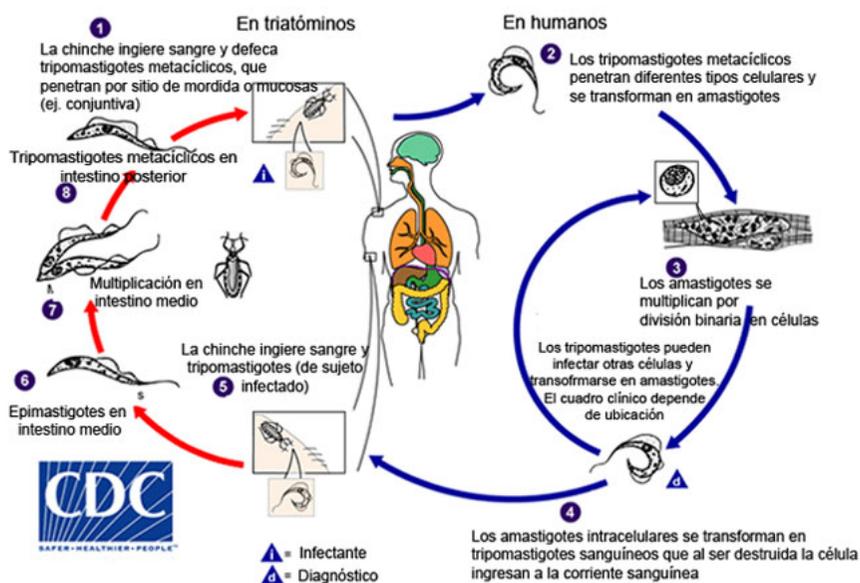


**Figura 1:** Distribución geográfica de los DTU's de *Trypanosoma cruzi* en ciclos domésticos y silvestres. Fuente: (Zingales *et al.*, 2012).

### 1.1.3 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla entre dos hospedadores: el triatmino vector y un mamífero. Durante el ciclo el parásito pasa por tres estadios funcional y morfológicamente diferenciados: epimastigote, tripomastigote y amastigote. El ciclo comienza cuando el triatmino pica a un hospedador vertebrado y junto con su sangre, ingiere formas tripomastigotes del parásito. Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes y se multiplican rápidamente por división binaria en el intestino medio del insecto;

posteriormente, se transforman en tripomastigotes metacíclicos, la forma infestante para el hospedador vertebrado. Cuando el triatómino vuelve a alimentarse, con sus deyecciones saldrán estas formas metacíclicas, capaces de penetrar en el hospedador vertebrado a través de la picadura o de una mucosa y de invadir células epiteliales. Una vez dentro del hospedador vertebrado, se transforman en formas amastigotes intracelulares que se replican y posteriormente se transforman en tripomastigotes que rompen la célula, salen al torrente sanguíneo, se diseminan por el organismo e invaden nuevas células (Chagas, 1913; Hoare, 1972; De Souza, 2002; Berenguer, 2007) (Figura 2).



**Figura 2:** Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Figura obtenida de la página web del Centre for Disease Control and Prevencion (CDC) (<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/>).

*T. cruzi* presenta un rango muy amplio de hospedadores; se han descrito más de 150 especies de mamíferos infectados por *T. cruzi*, y se considera que todos los mamíferos son susceptibles a esta infección. Los distintos linajes filogenéticos de *T. cruzi* parecen tener asociaciones preferentes con diferentes grupos de hospedadores (Stevens & Brise 2004).

### 1.1.4 Epidemiología, clínica, diagnóstico y tratamiento

#### *Epidemiología*

La enfermedad de Chagas es uno de los mayores problemas de salud en América Latina, donde causa la muerte de más de 7.000 personas al año y se estima que hay más de 25 millones de personas en peligro de contraer la enfermedad, afectándose al año unas 28.000 (OPS, 2014). Está considerada una de las enfermedades parasitarias más importante en América en términos de impacto socioeconómico, estimándose pérdidas de 662.000 años potenciales de vida activa por incapacidad o mortalidad (DALYs) (Jannin & Salvatella, 2006; Hotez *et al.*, 2008; OMS, 2017).

La transmisión vectorial (responsable del 80% de las infecciones) se produce solo en América a través de la picadura y posterior deyección de las chinches hematófagas, el resto de infecciones se producen, por orden de importancia epidemiológica, mediante: transfusión sanguínea, transmisión congénita, trasplante de órganos, vía oral (ingestión de alimentos contaminados con triatominos o sus heces) y accidentes de laboratorio (Dias & Schofield, 1999; OMS, 2017) (Figura 3).

La infección se da de forma natural en muchos animales silvestres principalmente pequeños mamíferos y marsupiales, dando lugar a un ciclo selvático zoonótico. La infección humana resulta de la domiciliación de algunas especies de vectores generando así un ciclo doméstico (Ramsey & Schofield, 2003). La existencia de un gran número de especies animales que actúan como reservorios silvestres hace imposible la eliminación de este parásito.

La transmisión vectorial se asociaba a áreas rurales sin embargo, los movimientos poblacionales desde áreas rurales a urbanas ha ocasionado un crecimiento de asentamientos humanos, en condiciones precarias, alrededor de las ciudades. Esta nueva situación ha llevado a la aparición de transmisión vectorial urbana y periurbana en países como Perú, Bolivia, México y Venezuela, entre otros (Dias, 2007; Bayer *et al.*, 2009; Khatchikian *et al.*, 2015). En estas ciudades no solo afecta a los nuevos barrios periurbanos, también existe en zonas urbanas desfavorecidas como barrios reconstruidos tras catástrofes naturales (Schmunis, 2007). La urbanización de la enfermedad es

uno de los mayores retos a los que se enfrentan las actuales campañas de control vectorial (Días, 2007; Bayer *et al.*, 2009).



**Figura 3:** Mapa que muestra las zonas de América Central y América del Sur donde existe transmisión vectorial. Figura obtenida de la página web de la Asociación Panamericana de la Salud (OPS) (<https://paho.org>).

La migración masiva de latinoamericanos procedentes de zonas endémicas a Europa, Canadá, Japón y Australia ha provocado la aparición de casos principalmente a través de vías de transmisión secundarias como: transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión congénita y accidentes de laboratorio. Cabe señalar que EEUU realmente no puede ser clasificado como área no endémica, ya que desde Georgia hasta California existe transmisión de *T. cruzi*, involucrando a diferentes especies de vectores y mamíferos como mapaches, zarigüeyas y perros domésticos de hecho, en el estado de Texas, la transmisión canina de Chagas está ampliamente extendida y estudiada (Kjos *et al.*, 2008). Hasta 2007, en EEUU se habían reportado siete casos humanos autóctonos, gracias al cribado de *T. cruzi* implantado en los controles de sangre de donantes desde 2007 hasta 2013 se reportaron 16 casos más (Hotez *et al.*, 2013). Estos hechos hacen que la enfermedad de Chagas se esté convirtiendo en un problema de alcance mundial, que si no es abordado

de forma adecuada, podría llegar a convertirse en una amenaza para la salud global (Coura & Albajar, 2010; OMS, 2017).

### *Clínica*

La enfermedad de Chagas tiene dos fases: la fase aguda y la crónica. La fase aguda aparece tras un periodo de incubación asintomático de 7 a 14 días y dura unos dos meses. Durante esta fase circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos. En menos del 50% de las personas picadas por un triatomo aparece como signo inicial característico una lesión cutánea conocida como chagoma (OMS, 2017). En la mayoría de los casos no hay síntomas, pero pueden aparecer: signo de Romaña (edema periorbital unilateral con conjuntivitis), fiebre, linfadenopatía, esplenomegalia o incluso, miocarditis o meningoencefalitis que puede provocar la muerte (Apt et al., 2008) (Figura 4).



**Figura 4:** Signos clínicos de la fase aguda de la enfermedad de Chagas. A) Chagoma en un brazo. Figura obtenida de: <http://maismedicosamor.blogspot.com.es>; B) Signo de Romaña en una niña. Figura obtenida

de: <http://patologiabemiliapb.blogspot.com>; C) Imágenes del niño Elías Paredes tomadas en Arequipa (Perú) con esplenomegalia. Fuente: (Ayulo & Herrer 1944).

Tras superar la fase aguda, el paciente entra en una fase crónica asintomática que puede durar toda la vida, en un 70% de los casos la parasitemia es muy baja y se encuentra bajo el control del sistema inmune. Transcurridos entre 10 y 30 años desde la infección aguda, los pacientes pueden entrar en una fase crónica sintomática en la que un 30% de los pacientes pueden presentar trastornos cardiacos (síndrome arritmico, aneurisma,...) y un 10% síntomas digestivos (megaesófago y megacolon), neurológicos o mixtos. El pronóstico de los pacientes en fase crónica depende de la forma clínica en que se presente y de la existencia de complicaciones durante el desarrollo de la enfermedad, con el paso de los años la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardiaca, por la destrucción progresiva del miocardio (OMS, 2017). En general, los pacientes diagnosticados en etapas no muy avanzadas de ambas formas clínicas tienen un buen pronóstico y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo (Apt *et al.*, 2008).

### *Diagnóstico*

El diagnóstico puede llevarse a cabo por técnicas parasitológicas (observación directa de los parásitos en sangre, hemocultivo, xenodiagnóstico), inmunológicas (hemaglutinación, inmunofluorescencia, ELISA) y/o moleculares (reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR a tiempo real (qPCR)).

En la fase aguda, el diagnóstico parasitológico es el de elección cuando la parasitemia es alta. Sin embargo, en la fase crónica, cuando la parasitemia es muy baja, el diagnóstico inmunológico es el más adecuado, aconsejándose la combinación de una técnica de elevada sensibilidad y otra de elevada especificidad, ya que dependiendo del antígeno utilizado podría aparecer reactividad cruzada (Gomes *et al.*, 2009), como es el caso del uso de la técnica *western blot* en países endémicos de *Leishmania spp.* donde la probabilidad de reactividad cruzada es alta (Riera *et al.*, 2012).

Las técnicas moleculares son muy sensibles y específicas y se utilizan principalmente para realizar el seguimiento de la efectividad del tratamiento (Pinazo *et al.*, 2015) pero también son usadas con fines diagnósticos y para la predicción de la transmisión congénita (Gomes *et al.*, 2009; Murcia *et al.*,

2010). Estas técnicas utilizan biomarcadores que según la OMS son sustancias, estructuras o procesos que pueden ser medidos en el cuerpo o en sus productos y que pueden influir o predecir la incidencia o resultado de una enfermedad. Las técnicas moleculares empleadas en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* utilizan biomarcadores del parásito como: proteínas, glicoproteínas, proteínas recombinantes (Fernández-Villegas *et al.*, 2011) o aislados como la proteína F29 (Fabbro *et al.*, 2013); y emplean técnicas como la amplificación de ácidos nucleicos del parásito mediante PCR, qPCR o ligandos del ARN (aptámeros) (Nagarkatti *et al.*, 2014). Dentro de las técnicas moleculares cabe destacar la PCR por su alta especificidad y sensibilidad (50%-70%) que se puede emplear en el diagnóstico durante fase aguda, y la qPCR para el estudio de la respuesta al tratamiento en un corto periodo de tiempo (Murcia *et al.*, 2010; Pinazo *et al.*, 2015).

En la infección congénita el método diagnóstico de elección es el microhematocrito debido a la alta sensibilidad y la pequeña cantidad de sangre que se necesita. El examen microscópico de cordón umbilical o sangre periférica del neonato es el que se recomienda durante el primer mes de vida. En caso de resultados negativos o si el test no ha sido realizado a tiempo, el niño debe ser examinado de anticuerpo IgG frente a *T. cruzi* a los 6-9 meses de vida, cuando los anticuerpos maternos no están presentes en el bebé (Rassi & Marin-Neto, 2010).

En los países con pocos recursos y acceso precario a los sistemas de salud es necesario el desarrollo de test económicos que faciliten el diagnóstico de la enfermedad (Chappuis *et al.*, 2010).

### *Tratamiento*

En la actualidad, no existe ninguna vacuna efectiva frente al parásito y tan sólo existen dos fármacos activos para el hombre con frecuentes reacciones adversas: benznidazol y nifurtimox. El tratamiento farmacológico es efectivo casi al 100% si se administra durante la fase aguda, incluso en los casos de transmisión congénita, sin embargo, la eficacia es mucho menor a medida que transcurre el tiempo en la fase crónica. En esta fase la tasa de curación depende del momento en el que se administra el tratamiento, de forma que cuanto antes se administre, mayor será (Apt *et al.*, 2008, Dias *et al.*, 2016). El efecto de la terapia farmacológica se refleja en una bajada serológica de

anticuerpos anti-tripanosoma, pero el fallo del tratamiento puede llegar a manifestarse décadas después, tras la persistencia de xenodiagnósticos negativos (Marin-Neto *et al.*, 2009). El tratamiento farmacológico está contraindicado durante el embarazo, en pacientes con insuficiencia hepática o renal severa y en pacientes con megaesófago avanzado que tengan impedimentos para tragar (Rassi & Marin-Neto, 2010).

El fármaco benznidazol es un nitroimidazol considerado de primera elección para la enfermedad de Chagas en fase aguda, subaguda, transmisión congénita, transfusión, reactivación, infección por trasplante y en pacientes inmunosuprimidos. La cura parasitológica obtenida (serología y xenodiagnóstico permanentemente negativos) es del 70% de los pacientes (Marin-Neto *et al.*, 2009). Este fármaco se puede administrar en niños y adultos durante un máximo de 60 días no sobrepasando en ningún caso los 300mg/día. En caso de enfermedad crónica en adultos mayores de 50 años es opcional, puesto que los beneficios en esta población no están demostrados (Rassi & Marin-Neto, 2010; Dias *et al.*, 2012). La eficacia del tratamiento con benznidazol en pacientes en fase crónica con cardiopatía chagásica fue evaluada gracias al proyecto internacional BENEFIT (*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*). Este proyecto fue instaurado en 42 centros y llevado a cabo en 2.854 pacientes de entre 18 y 75 años, en dos pasos: (i) un estudio piloto en el que se investigó si el tratamiento etiológico reducía significativamente la carga parasitaria, mediante PCR y determinando el perfil de seguridad y tolerancia del fármaco en este tipo de población; y (ii) un estudio a gran escala en el que se determinó si la terapia con benznidazol reducía la mortalidad y otros problemas clínicos cardiovasculares asociados a pacientes con cardiopatía crónica chagásica (Marin-Neto *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2016). Los resultados fueron una disminución de la carga parasitaria tras el tratamiento pero no se observó un efecto significativo en la progresión de la enfermedad cardíaca, en pacientes en fase crónica de Chagas. En el estudio murieron 503 pacientes en 5 años (246 tratados con benznidazol y 257 con placebo), el 63% de los pacientes desarrollaron complicaciones ventriculares derivadas de la alteración cardíaca (Dias *et al.*, 2016).

El fármaco nifurtimox es un nitrofurano recomendado en caso de intolerancia al benznidazol, el cual ha sido ampliamente utilizado durante tres décadas y cuya cura parasitológica es similar a la del benznidazol. Este fármaco tiene una alta incidencia de efectos adversos similares al benznidazol a los que se le suman fuertes efectos gastrointestinales. Actualmente, no está disponible

en varios países y lo distribuye la Organización Panamericana de la Salud (Marin–Neto *et al.*, 2009; Rassi & Marin-Neto, 2010; Dias *et al.*, 2012).

Antes de pautar cualquiera de los dos fármacos es necesario sopesar los posibles beneficios de la medicación para prevenir o retrasar el avance de la enfermedad, frente a la duración del tratamiento (hasta 60 días) y las posibles reacciones adversas. Además, puede ser necesario administrar un tratamiento específico para las manifestaciones cardíacas o digestivas (OMS, 2017).

Los fármacos alopurinol o antimicóticos azólicos (ketoconazol, itraconazol,...) son supresores de *T. cruzi* y pueden ser utilizados en algunas situaciones específicas como la reactivación de la parasitosis en pacientes inmunodeprimidos, cuando es imposible utilizar benznidazol o nirfurtrimox (Dias *et al.*, 2016).

Estudios recientes han demostrado la eficacia de un nuevo medicamento para el tratamiento de la enfermedad cuyo principio activo es el posaconazol. Este fármaco es un antimicótico que ha sido probado en seres humanos y se ha podido demostrar que si bien presenta actividad contra *T. cruzi* no es suficiente para llegar a la cura, siendo el benznidazol significativamente más efectivo, tanto en la fase aguda como en la crónica. El posaconazol, al igual que el resto de medicamentos frente a la enfermedad de Chagas también tiene efectos secundarios. Los resultados obtenidos para este nuevo fármaco representan uno de los avances más importantes en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, y abren una puerta a nuevas estrategias como las terapias de combinación o incluso los tratamientos secuenciales (Francisco *et al.*, 2015; Molina *et al.*, 2015).

### 1.1.5 Control de la enfermedad de Chagas

El control de la enfermedad de Chagas presenta un gran número de factores limitantes como los animales silvestres que participan en el ciclo como reservorios, o las malas condiciones de las viviendas humanas (Silveira *et al.*, 2002). Actualmente, el control vectorial es el método más útil para prevenir la enfermedad de Chagas en América del Sur. El cribado de sangre y órganos es decisivo para prevenir la infección mediante transfusiones sanguíneas y

trasplante, al igual que el diagnóstico de la infección en las embarazadas y sus recién nacidos y hermanos. Por tanto, los objetivos de control consisten en la eliminación de la transmisión y en lograr que la población infectada tenga acceso temprano a la asistencia sanitaria (OMS, 2017).

Las recomendaciones de la OMS para prevenir la enfermedad son (OMS, 2017):

- Rociamiento de las casas y alrededores con insecticidas
- Mejora de las viviendas para prevenir la infestación por el vector
- Medidas preventivas personales como empleo de mosquiteros
- Buenas prácticas higiénicas en la preparación, transporte, almacenamiento y consumo de alimentos
- Cribado de sangre, de órganos, tejidos o células donados y en los receptores de estos
- Cribado de recién nacidos y otros niños de madres infectadas, para diagnosticar y tratar tempranamente el problema

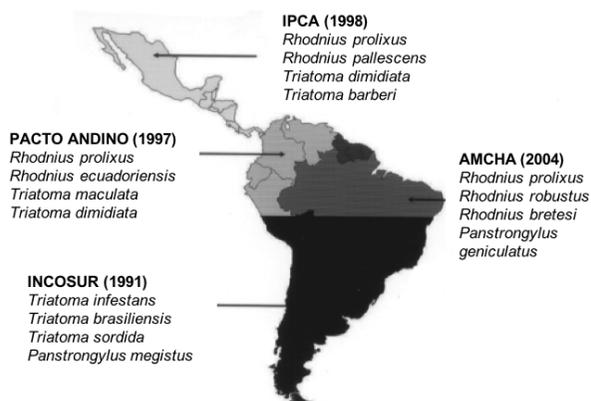
#### 1.1.5.1 Campañas de control vectorial

Como se ha comentado, el control vectorial es actualmente el método más útil para la prevención de la enfermedad de Chagas (OMS, 2017). Durante los años 60 comenzaron a planearse y ponerse en marcha los primeros programas de control vectorial a escala estatal o nacional en Brasil, Argentina, Chile y Venezuela con buenos resultados sentando así las bases de los futuros programas de nacionales e internacionales (Dias & Schofield, 1999) (Figura 5). Las campañas llevadas a cabo desde entonces son:

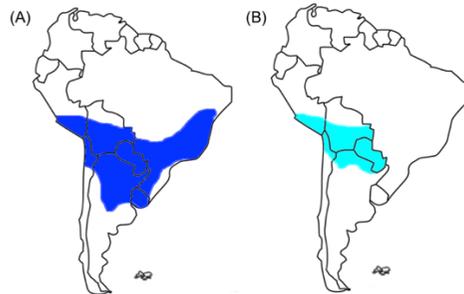
- **INCOSUR**, Cono sur (1991). Integrada por Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. El principal objetivo fue eliminar a *Triatoma infestans* Klug, 1834 puesto que su distribución a mediados de los 80 era realmente amplia (Bargues *et al.*, 2006). Gracias a esta campaña, llevada a cabo por la Iniciativa Cono Sur, se ha podido interrumpir la transmisión vectorial de *T. cruzi* por *T. infestans* en Uruguay (1997), Chile (1999), Brasil (2006), Paraguay (Región Oriental, 2008), Argentina (en ocho provincias entre 2001 y 2011) y Bolivia (Departamento La Paz, 2011). Uruguay en 2012 fue el primer país declarado por la Organización Panamericana de

la Salud como libre de *T. infestans* (Noireau *et al.*, 2005; OPS, 2012) (Figura 6).

- **IPCA**, Centroamérica (1997). Integrada por Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá. Esta iniciativa se planteó dos objetivos principales: la eliminación de *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 vector exclusivamente doméstico y la disminución de las infestaciones por *Triatoma dimidiata* Latreille, 1811. En 2003, México se unió a la IPCA (Ponce, 2007).
- **IPA**, Región Andina (1998). Integrada por Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Con el objetivo de controlar los principales vectores de la enfermedad en estos países: *R. prolixus*, *Rhodnius ecuadoriensis* Lent y Leon, 1958 y *T. dimidiata* (Guhl, 2007; Salvatella, 2007).
- **AMCHA**, Región Amazónica (2004). Integrada por Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana Francesa, Guyana, Perú, Surinam y Venezuela. Esta iniciativa nace de la necesidad de afrontar nuevos patrones de transmisión en la cuenca del Amazonas, donde la deforestación de la selva provoca el contacto de la población con ciclos selváticos del parásito y nuevas especies del vector, produciéndose las infecciones principalmente durante el trabajo en los cultivos como la *piacaba* (especie de palmera) (Briceño-León, 2009).



**Figura 5:** Iniciativas internacionales llevadas a cabo para el control vectorial de la enfermedad de Chagas. Adaptado de (Guhl, 2007).



**Figura 6:** Mapa de América del Sur: (A) En color azul oscuro se marca la distribución geográfica de *Triatoma infestans* en la década de los 80; (B) En color azul claro se marca la distribución geográfica actual de *T. infestans*, tras las campañas de control vectorial, se aprecia cómo la distribución del vector se ha visto ampliamente reducida.

Hasta la fecha, las campañas de control vectorial se han realizado fumigando los domicilios y construcciones peridomésticas con insecticidas de tipo piretroide. Estas campañas se diseñan con el objetivo de acabar con los triatomos domiciliados y peridomiciliados (Waleckx *et al.*, 2015). Una vez eliminados los insectos de la vivienda, se realiza una vigilancia constante, ya que puede ser re-infestada por la misma u otra especie de origen silvestre, el control vectorial se complica cuando las re-infestaciones son constantes y están causadas por la misma especie. Para evitar y controlar las posibles re-infestaciones un estudio detallado de la biología del vector es esencial para poder determinar la mejor estrategia a seguir (Bargues *et al.*, 2009). En este sentido, el estudio genómico de la especie o especies implicadas puede aportar información para comprender el proceso de domiciliación y diferenciación entre las poblaciones silvestres y domiciliadas (Abad-Franch & Monteiro, 2005; Borges *et al.*, 2005). Existen especies como *T. infestans*, en el Cono Sur y *R. prolixus* en Centro América que son totalmente domiciliadas, genéticamente homogéneas y sin flujo genético con poblaciones silvestres, que mediante estas campañas, se han eliminado en muchas zonas y en otras esta en proceso (Waleckx *et al.*, 2015).

Sin embargo, cada vez se observan más poblaciones de triatomos con bajos niveles de domiciliación y un papel importante en la transmisión humana

de *T. cruzi*. La eficacia de la fumigación está directamente relacionada con el nivel de domiciliación del vector (Waleckx *et al.*, 2015). Existen casos como el de *Panstrongylus chinai* Del Ponte, 1929 en Perú, el cual era considerado silvestre y sin embargo, cada vez se encuentra más en domicilios (Náquira & Cabrera, 2009). Este vector es capaz de re-infestar viviendas tras campañas de control vectorial, puesto que puede invadir domicilios, y tiene un gran flujo genético con poblaciones silvestres. Otro hecho que pone de manifiesto la gran importancia de conocer con detalle la biología y genética de cada especie de vector, es la aparición de focos de resistencia a los piretroides (Reithinger *et al.*, 2009), hecho que se ha observado en poblaciones en proceso de domiciliación con alta variabilidad genética (Catalá *et al.*, 2007).

El éxito alcanzado tras algunas campañas y/o los cambios antropogénicos ponen de manifiesto una nueva situación epidemiológica, en la que algunos vectores secundarios están adquiriendo cada vez más importancia ocupando los nichos que dejan los vectores principales, tras ser erradicados. Esta es la situación del nordeste brasileño en el que los programas de control consiguieron eliminar a *T. infestans* pero sus antiguos hábitats están siendo re-colonizados por otras especies del complejo *T. brasiliensis* (Costa, 1999).

Para lograr el control vectorial, es necesario determinar tres aspectos de la relación entre triatomíneos y humanos: (i) la presencia de poblaciones silvestres de triatomíneos; (ii) el nivel de intrusismo desde las poblaciones silvestres a los peridomicilios y domicilios; y (iii) el nivel de domiciliación o domesticación de los triatomíneos en los peridomicilios y domicilios. De hecho, esta información debería ser incluida en los programas de control vectorial para evaluar la efectividad de las intervenciones. Una domiciliación significativa o una domesticación dentro de los corrales sugiere que la fumigación dentro de las viviendas o las mejoras de las mismas ayudarían a reducir la infestación, como ha ocurrido con *T. infestans*. Por otro lado, un alto grado de intrusismo en los corrales descartaría la fumigación dentro de las viviendas como una pieza clave en el control vectorial y se inclinaría hacia las intervenciones a favor de impedir la entrada de los triatomíneos en las casas mediante mosquiteras, cortinas impregnadas en insecticida,.... En cualquier caso, además de conocer la relación entre vectores y humanos, para asegurar el éxito de las campañas de control vectorial es necesario: considerar la educación sobre la enfermedad de la población, como una pieza clave para asegurar la sostenibilidad de las campañas en el tiempo; realizar el estudio de las dinámicas poblacionales del vector, para observar domiciliaciones, nuevas

colonizaciones por parte de vectores secundarios y re-infestaciones; y tener en cuenta la emergencia de la resistencia a piretroides (Waleckx *et al.*, 2015).

## 1.2 Vectores de la enfermedad de Chagas: subfamilia Triatominae

### 1.2.1 Clasificación y sistemática

La subfamilia Triatominae fue descrita por Jeannel en 1919, quedando situada en la siguiente posición sistemática:

Reino Animalia Linnaeus, 1758

Phylum Artropoda Siebold, 1846

Clase Insecta Linnaeus, 1735

Orden Hemiptera Linnaeus, 1758

Familia Reduviidae Latreille, 1807

Subfamilia Triatominae Jeannel, 1919

La subfamilia Triatominae está organizada en 5 tribus y 18 géneros, que en total agrupan 148 especies (Bargues *et al.*, 2010, 2017) (Figura 7). Los principales vectores de la enfermedad de Chagas pertenecen a 3 géneros: género *Triatoma* Laporte, 1832, género *Panstrongylus* Berg, 1879 (ambos géneros se engloban dentro de la Tribu Triatomini Jeannel, 1919) y género *Rhodnius* Stal, 1859 (Tribu Rhodniini Pinto, 1926). Más de la mitad de las especies de la subfamilia Triatominae son capaces de infectarse con *T. cruzi* de forma natural o bajo condiciones de laboratorio, pero todos ellos son posibles transmisores del parásito (Waleckx *et al.*, 2015; Bargues *et al.*, 2017).

Tribes	Genera	Number of species
ALBERPROSENIINI	<i>Alberprosenia</i>	2
BOLBODERINI	<i>Belminus</i>	8
	<i>Bolbodera</i>	1
	<i>Microtriatoma</i>	2
	<i>Parabelminus</i>	2
CAVERNICOLINI	<i>Cavernicola</i>	2
RHODNIINI	<i>Psammolestes</i>	3
	<i>Rhodnius</i>	19
TRIATOMINI	<i>Dipetalogaster</i>	1
	<i>Eratyrus</i>	2
	<i>Hermanlenticia</i>	1
	<i>Linshcosteus</i>	6
	<i>Panstrongylus</i>	14*
	<i>Paratriatoma</i>	1
	<i>Triatoma</i>	84 <sup>**,***</sup>
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>148</b>

**Figura 7:** Clasificación de la subfamilia Triatominae. El número de especies se corresponde con los trabajos publicados hasta el momento. \* Este género tiene una especie fósil *Panstrongylus hispaniolae* Ponair Jr, 2013. \*\*Dentro de *Triatoma* (84 especies), 12 especies ha sido reasignadas a 3 nuevos géneros: *Meccus* (6 especies), *Mepraia* Mazza, Gajardo y Jörg, 1940 (3 especies), *Nesotriatoma* (3 especies).\*\*\* Este género tiene una especie fósil: *Triatoma dominicana* Ponair Jr., 2005. Fuente: (Bargues *et al.*, 2016).

Existen numerosos factores que determinan la importancia como vector en las especies de triatominos, siendo los más importantes los factores biológicos y geográficos como: capacidad vectorial (probabilidad de transmitir el parásito), adaptación al hábitat humano, capacidad de alimentarse de sangre humana y defecar durante la ingesta o inmediatamente después (facilita el contacto del parásito con el hospedador) y su distribución geográfica (Mas-Coma & Bargues, 2009).

Según el grado de adaptación a los hábitats humanos se ha establecido una clasificación que separa a los triatominos vectores en tres grupos: (i) vectores intradomiciliarios, los cuales han colonizado hábitats humanos (vectores domésticos o domiciliados), (ii) especies silvestres en proceso de adaptación a los hábitats humanos (vectores candidatos o peridomiciliados), y (iii) especies silvestres asociadas a animales silvestres (vectores potenciales) (Dujardin & Schofield, 2004; Mas-Coma & Bargues, 2009). La mayoría de los triatominos son silvestres y viven asociados a mamíferos constructores de

nidos y aves. Los vectores candidatos o peridomiciliados suelen presentar un hábitat peridoméstico, ocupando frecuentemente gallineros y corrales, alimentándose de animales domésticos y personas. Únicamente unas pocas especies han completado su transición al hábitat doméstico, adoptando un papel importante como vectores, como por ejemplo *T. infestans*. Los triatominos silvestres viven en los nidos de sus hospedadores, en pilas de piedras o incluso en árboles y plantas, mientras que los peridomésticos y domésticos suelen vivir en los huecos de las paredes de piedra y tejados de caña o palma de corrales, gallineros y de las propias viviendas humanas (Schofield *et al.*, 1999).

El mantenimiento de las poblaciones de triatominos requiere estabilidad en las fuentes de alimento y protección climática. El ambiente doméstico ofrece estas características, por lo que favorece la domiciliación de los triatominos. El proceso de domiciliación implica una simplificación genética y fenotípica irreversible. La simplificación genética que ocurre durante el proceso de domesticación se debe a dos procesos, primero la población sufre un efecto fundador seguido de una selección del genotipo más óptimo. Las especies silvestres que sean capaces de adaptarse al domicilio, como es el caso de *R. prolixus* o *T. infestans*, puesto que son sometidas a simplificación genética, pierden la capacidad de readaptarse en ambientes silvestres. Las diferencias genéticas entre poblaciones silvestres y domésticas podrían utilizarse como indicadores de domesticación (Schofield *et al.*, 1999), como ocurrió en *T. infestans*, donde el vector perdió la tercera parte del ADN total por célula y su capacidad de sobrevivir en el hábitat silvestre durante el proceso de domiciliación (Panzera *et al.*, 2004).

El riesgo de transmisión de la enfermedad está claramente relacionado con la presencia de triatominos en el domicilio, que a su vez se favorece por múltiples factores como: viviendas construidas con tejados de paja, cañas, paredes de adobe; paredes agrietadas; desorden tanto en la vivienda como en el peridomicilio; gallineros cercanos; perros o aves dentro y/o fuera del domicilio,... En resumen, factores que proporcionan a los triatominos lugares seguros donde anidar y fuentes de alimentación estables junto a las viviendas o dentro de las mismas (Monteiro *et al.*, 2001).

La importancia epidemiológica de cada especie vector depende en gran medida de su capacidad de dispersión y adaptación al hábitat doméstico, de modo que conocer estos datos así como la estructura genética de las

poblaciones es muy importante para el diseño de las campañas de control (Monteiro *et al.*, 2001).

### 1.2.2 Caracterización genética de los triatominos vectores de la enfermedad de Chagas

Los marcadores moleculares generan una gran cantidad de información sobre la diversidad genética y las relaciones filogenéticas de los organismos. En las últimas décadas, estos marcadores han sido empleados para el estudio de la subfamilia Triatominae y han servido para esclarecer: (i) sistemática y taxonomía; (ii) origen; (iii) tasas evolutivas; (iv) rangos evolutivos; (v) biogeografía; (vi) clasificación de los especímenes; (vii) delimitación de poblaciones; (viii) caracterización de híbridos; (ix) cambios poblacionales; y (x) capacidad de transmisión de enfermedad (García & Powell 1998; Lyman., 1999; Barges *et al.*, 2000, 2002, 2010; García *et al.*, 2001; Marcilla *et al.*, 2002; Mas-Coma & Barges, 2009; Patterson & Gaunt, 2010; Blandón-Naranjo *et al.*, 2010; Zuriaga *et al.*, 2012, 2015; Cavassin *et al.*, 2014).

La subfamilia Triatominae es considerada un grupo polifilético (ha evolucionado a partir de diferentes ancestros) (Galvão *et al.*, 2003; Schofield & Galvão, 2009). Diversos estudios moleculares como los estudios de isoenzimas y perfiles RAPD (amplificación al azar de ADN polimórfico, del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*) (García & Powell, 1998) y los estudios de marcadores del ADN ribosomal nuclear (ADNr) y mitocondrial (ADNmt) (García & Powell, 1998; Lyman *et al.*, 1999; Barges *et al.*, 2000; Marcilla *et al.*, 2001; Mas-Coma & Barges, 2009; Hwang & Wirauch, 2012; Barges *et al.*, 2016) han demostrado este hecho y la inclusión, dentro de la subfamilia Triatominae, de sus dos principales tribus, Triatomini y Rhodniini.

#### 1.2.2.1 Marcadores moleculares del ADN ribosomal nuclear

El ADNr eucariota está constituido por unidades de transcripción u operones localizados en los cromosomas nucleares y que se encuentran en

forma de repeticiones en tándem. En los artrópodos cada repetición contiene los genes codificantes de los ARN ribosomales (18S, 5.8S y 28S), además de tres tipos de fragmentos espaciadores: los espaciadores internos transcritos que se intercalan entre los genes (ITS-1 e ITS-2 del inglés *Internal Transcribed Spacer*), los espaciadores externos transcritos que flanquean a los genes (ETS, del inglés *External Transcribed Spacer*) y los espaciadores intergénicos o espaciadores no transcritos que separan una repetición de la siguiente (NTS, del inglés *Non-Transcribed Spacer*). El conjunto de genes, ITSs y ETSs es transcrito por la ARN polimerasa 1 de forma ininterrumpida (Figura 8). Tras la transcripción, tiene lugar un proceso de maduración en el que se separan los ARN producto de los genes de los espaciadores (Gerbi, 1985). No se conoce mucho sobre la función de estos espaciadores; generalmente muestran una divergencia evolutiva rápida, por lo que no se consideraba probable que tuviesen una función concreta. Sin embargo, estudios en levaduras han demostrado que los ITSs poseen un papel importante en el proceso de maduración de los ARNr (Munsters *et al.*, 1990; Van Der Sande *et al.*, 1992).

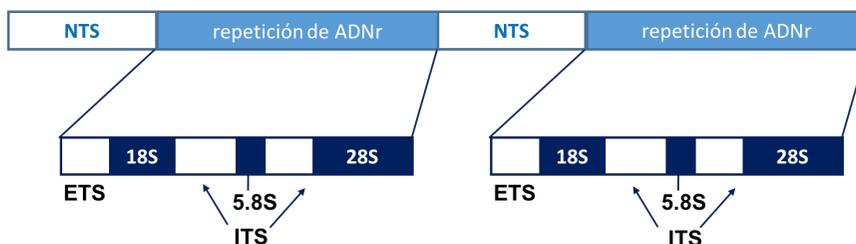


Figura 8: Esquema del ADN ribosomal nuclear eucariota

Las características de los genes y espaciadores del ADNr los han convertido en marcadores moleculares muy utilizados en estudios sistemáticos y filogenéticos, debido a la gran información que se extrae tanto de sus secuencias nucleotídicas como de su estructura secundaria (Wheeler & Honeycutt, 1988; Hillis & Dixon, 1991). Cada gen del ADNr presenta una velocidad de sustitución diferente, con regiones conservadas y variables incluidas dentro de las secuencias de los genes 18S y 28S, y del mismo modo, cada espaciador evoluciona a una velocidad diferente (Jorgensen & Cluster,

1988). En general, los genes ribosomales presentan una variabilidad muy baja, están altamente conservados y por ello son útiles para establecer relaciones filogenéticas antiguas, mientras que los ITSs evolucionan mucho más rápido, por lo que son útiles para estimar relaciones evolutivas más recientes. En cualquier caso, el nivel taxonómico en el que es útil cada marcador varía de forma importante entre los diferentes grupos de organismos (Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues *et al.*, 2000; Mas-Coma & Bargues, 2009).

Otra característica importante del ADNr, desde el punto de vista de su utilidad como marcador molecular, es la evolución concertada. La evolución concertada implica que el ADNr de una población, con el tiempo suficiente, homogeniza todas sus copias, eliminando las diferencias, tanto entre cromosomas homólogos como entre cromosomas no homólogos del genoma. El resultado es la uniformidad en todos los individuos de la población (Hillis & Dixon, 1991).

Cabe destacar la presencia en los espaciadores internos de microsatélites y minisatélites. Ambos son secuencias repetidas en tándem cuya unidad de repetición contiene un número variable de nucleótidos, hasta cinco en el caso de los microsatélites y hasta cien en el caso de los minisatélites. Ambos aportan información filogenética muy útil para la diferenciación entre poblaciones, subespecies y especies, como se ha podido comprobar en diversos estudios en triatominos (Marcilla *et al.*, 2001, 2002; Martínez *et al.*, 2005; Bargues *et al.*, 2006, 2008; Pacheco *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia de microsatélites y minisatélites hace variar mucho la longitud de las secuencias, lo que puede llevar a interpretaciones erróneas de resultados obtenidos por métodos basados en la longitud de secuencias como RAPD y PCR-RFLP (Reacción en cadena de la polimerasa – Restricción de polimorfismos de longitud de fragmento, del inglés *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Mas-Coma & Bargues, 2009).

Los espaciadores transcritos internos (ITSs) del ADNr han demostrado ser útiles para clasificar especies, subespecies, híbridos y poblaciones de la subfamilia Triatominae además, de para establecer relaciones filogenéticas (Bargues *et al.*, 2008; Mas-Coma & Bargues, 2009).

En la subfamilia Triatominae, el ITS-2 ha sido el marcador más utilizado y el más importante a la hora de diferenciar especies crípticas. El ITS-2 presenta una clara desviación en su composición nucleotídica con una media de 76% de A y T, y una longitud muy variable de 470 a 600 pares de bases en la tribu Triatomini y alrededor de 700 pares de bases en la tribu Rhodniini. Es un buen

marcador a nivel de especies, subespecies, híbridos, variedades e incluso poblaciones. Sin embargo, no resulta apropiado para la comparación de las tribus Triatomini y Rhodniini, puesto que la diferencia de longitud no permite obtener alineamientos claros. Este espaciador ha sido ampliamente analizado en triatomíneos (Bargues *et al.*, 2000, 2002, 2006, 2008; Marcilla *et al.*, 2000, 2001, 2002; Martínez *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2007; Dorn *et al.*, 2009, 2016; Mas-Coma & Bargues, 2009, Costa *et al.*, 2016).

El ITS-1 también ha sido estudiado en los triatomíneos (Bargues *et al.*, 2007), así como la región intergénica que comprende ITS-1, el gen 5.8S e ITS-2, aunque los estudios de esta región son menos numerosos y solo se ha realizado para algunas especies del género *Triatoma*, como *T. infestans* o *Triatoma rubrovaria* Blanchard 1843, especies del género *Mepraia* y algunas especies del género *Panstrongylus* (Pacheco *et al.*, 2003, 2007; Bargues *et al.*, 2006; Calleros *et al.*, 2010; Cavassin *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2016).

Los genes ribosomales 18S y 28S han sido menos estudiados que los ITSs ya que son más conservados. El gen 18S de múltiples especies ha sido secuenciado con una longitud de 1913 a 1918 pares de bases, siendo más largo en Rhodniini (1918) que en Triatomini (1013-1015), con una media en AT de 47,9% ha sido utilizado en la construcción del reloj molecular de la subfamilia Triatominae (Bargues *et al.*, 2000, 2002). En cuanto al gen 28S, solamente ha sido analizado un fragmento correspondiente al dominio D2 en la tribu Rhodniini (Monteiro, 2000; Monteiro *et al.*, 2003) y en algunas especies del género *Triatoma* (Guerra *et al.*, 2016). El gen 5.8S es altamente conservado en Triatominae con una longitud de 155 pares de bases y un contenido en AT del 42,6% (Mas-Coma & Bargues, 2009).

#### 1.2.2.2 Marcadores moleculares del ADN mitocondrial

El genoma mitocondrial eucariota consiste en una molécula circular cerrada de ADN. Presenta variaciones de tamaño importantes entre diferentes organismos, pero la variabilidad de contenido génico es pequeña. El ADN mitocondrial (ADNmt) contiene de 36 a 37 genes, que codifican proteínas que desempeñan su función dentro de la mitocondria; subunidades ribosomales mitocondriales, proteínas de la cadena de transporte de electrones y enzimas implicadas en la fosforilación oxidativa (Ballard & Rand, 2005).

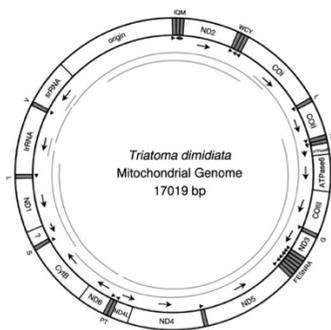
El ADNmt evoluciona mucho más rápido que el ADNr nuclear, de 2 a 9 veces más rápido en los insectos (Desalle *et al.*, 1987; Moriyama & Powel, 1997; Monteiro & Pierce, 2001) y la mayoría de los cambios que se producen son sustituciones nucleotídicas simples (Mas-Coma & Bargues, 2009). Por este motivo, muchos de los genes mitocondriales son herramientas apropiadas para establecer relaciones filogenéticas a niveles taxonómicos bajos como géneros, especies y poblaciones. Los genes mitocondriales presentan en general una elevada tasa de sustitución en la tercera posición del codón, por lo que han sido muy utilizados para estudios filogenéticos a nivel de especies y genética de poblaciones (Navajas *et al.*, 1996). Sin embargo, sus secuencias aminoacídicas son mucho más conservadas y han sido aplicadas en estudios a niveles taxonómicos superiores como familias o incluso ordenes (Liu & Beckenbach, 1992; Frati *et al.*, 1997).

La elevada variabilidad de los genes mitocondriales hace que sea difícil el diseño de cebadores específicos para su amplificación, por lo que solo unos pocos han podido ser utilizados con éxito en estudios filogenéticos (Tabla 1). El uso de cada uno de estos genes será más o menos apropiado dependiendo del grupo de organismos a estudiar. Su alto nivel de saturación (acumulación de múltiples sustituciones en sitios variables, especialmente transiciones en la tercera posición del codón) sugiere que no deben ser utilizados para estimar relaciones entre grupos de especies distantes (Morgan & Blair, 1995, 1998; Blair *et al.*, 1997). Los genes mitocondriales se llevan utilizando en estudios filogenéticos desde finales de los años 90 como se puede observar en numerosos estudios (García & Powell, 1998; Lyman *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2000; 2003; 2004; García *et al.*, 2001; 2003; Sainz *et al.*, 2004; Da Silva *et al.*, 2007; Pavan & Monteiro, 2007; Mas-Coma & Bargues, 2009; Piccinalli *et al.*, 2009, 2014; Quisberth *et al.*, 2011; Torrez-Perez *et al.* 2011; Waleckx *et al.*, 2011; Justi *et al.*, 2014). Los genes mitocondriales han sido ampliamente utilizados como herramientas para conocer la historia evolutiva y demográfica de las poblaciones y especies. El ADNmt puede estar bajo procesos evolutivos como selección natural, alto grado de homoplasia causada por un elevado sesgo hacia A/T, o introgresión los cuales pueden ocultar la verdadera historia de las especies (Ballard & Whitlock, 2004; Lin & Danforth, 2004).

Marcador molecular	Características	Debilidades
<b>12S: Gen 12S ARNr.</b> Longitud total: 781 pb Fragmento frecuentemente analizado: 339-371 pb	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presenta la tasa de evolución más baja entro todos los marcadores del ADNmt</li> <li>- Útil para estudios a nivel de especies de un mismo género</li> <li>- Puede revelar diferencias a nivel de población</li> </ul>	No recomendable para estudios comparativos entre especies de diferentes géneros y tribus o niveles más altos
<b>16S: Gen 16S ARNr.</b> Longitud total: 1.270 pb Fragmento frecuentemente analizado: 501-510 pb	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Evolucionan en paralelo al 12S, pero es más variable</li> <li>- Tiende a revelar más diferencias entre especies de diferentes tribus</li> </ul>	No recomendable para estudios a nivel de género o niveles más altos
<b>ND1: Subunidad 1 del gen NADH Deshidrogenasa</b> Longitud total: 912 - 939 pb Fragmento frecuentemente analizado: gen completo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Evolucionan más rápido que los anteriores pero más despacio que COI y Cyt <i>b</i></li> <li>- Útil para estudios de especies estrechamente relacionadas</li> </ul>	Presenta saturación cuando se comparan especies distantes del mismo género
<b>COI: Subunidad 1 del gen Citocromo Oxidasa</b> Longitud total: 1.534 pb Fragmento frecuentemente analizado: 636 – 1.447 pb	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Evolucionan ligeramente más rápido que ND1 pero más lento que Cyt <i>b</i></li> <li>- Útil para estudios a nivel de especies estrechamente relacionadas.</li> </ul>	Presenta saturación cuando se comparan especies distantes y a niveles taxonómicos más altos
<b>Cyt <i>b</i>: Citocromo <i>b</i></b> Longitud total: 1.136 pb Fragmento frecuentemente analizado: 313 – 682 pb	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presenta la evolución más rápida entre los genes del ADNmt.</li> <li>- Útil para estudios comparativos a nivel de subespecies (intrapoblacional, interpoblacional, entre morfos y subespecies)</li> </ul>	Presenta saturación cuando se comparan especies distantes y a niveles taxonómicos más altos

**Tabla 1:** Características de los marcadores del ADN mitocondrial más utilizados en estudios filogenéticos de triatominos. El orden de aparición es de genes más a menos conservados. Adaptado de (Bargues *et al.*, 2010).

En triatominos la secuencia del genoma mitocondrial completo ha sido obtenida para la especie *T. dimidiata* con una longitud total de 17.019 pares de bases, dos genes ribosomales, 22 ARN de transferencia y 13 ARN mensajeros (Dotson & Beard, 2001) y para *R. prolixus* con una longitud de 15.456 pares de bases (Mesquita *et al.*, 2015) (Figura 9).



**Figura 9:** Esquema del ADN mitocondrial de *Triatoma dimidiata*. Fuente: (Dotson & Beard, 2001).

La longitud del genoma mitocondrial puede variar en función de los espaciadores intergénicos y de la longitud de la región control (Dotson & Beard, 2001) En el genoma completo de *T. dimidiata* se observan siete secuencias intergénicas distintas, que contienen a su vez, varias secuencias de uno a cinco pares de bases, muchas de ellas superpuestas. La función de esta región es desconocida (Dotson & Beard, 2001).

### 1.2.2.3 Ventajas y desventajas de los marcadores ribosomales y mitocondriales

Los marcadores del ADNr evolucionan de forma más lenta que los marcadores del ADNmt, por lo que en general, los primeros son más adecuados para establecer relaciones filogenéticas a nivel evolutivos más altos (familia, subfamilia, género y especie), mientras que los segundos son más útiles a niveles taxonómicos inferiores (especie, subespecie y población).

Ambos tipos de marcadores presenta una serie de características diferenciales (Mas-Coma & Bargues, 2009):

- El ADNr sigue una herencia de tipo mendeliano, por lo que es muy útil en el estudio de organismos bisexuados. Mientras que el ADNmt se hereda de forma clonal, por herencia materna, sin recombinación, dando menos problemas en el análisis genético
- El ADNmt es, en general, más fácil de amplificar por PCR que el ADNr debido al elevado número de copias que presenta ( $10^2$  a  $10^4$  por célula)
- El ADNr contiene regiones muy conservadas ideales para el diseño de cebadores. El diseño de cebadores es mucho más complicado en el ADNmt al presentar una elevada variabilidad
- El ADNr, especialmente los ITS, presentan un elevado número de inserciones y deleciones, lo que dificulta el alineamiento de las secuencias, haciendo necesario recurrir en estos casos a la corrección manual de los alineamientos o al análisis de la estructura secundaria. Los marcadores del ADNmt son más fáciles de alinear al no presentar inserciones y deleciones.
- Los genes mitocondriales tienden a alcanzar altos niveles de homoplasia, cuya principal causa es la saturación, que elimina las

señales filogenéticas haciendo que las secuencias mitocondriales no sean adecuadas para resolver filogenias antiguas (Ballard & Rand, 2005)

- La evolución concertada a la que está sometida el ADNr simplifica los estudios interpoblacionales con una especie concreta, ya que es suficiente con obtener la secuencia de un único individuo para caracterizar a una población local. En cambio, supone una limitación para los estudios intrapoblacionales, donde los marcadores del ADNmt son más adecuados (Mas-Coma & Bargues, 2009)

#### 1.2.2.4 Estudios multigénicos y tendencias actuales en triatominos

En triatominos los estudios con ADNmt han sido realizados mayoritariamente con secuencias parciales de los genes, evidentemente los genes completos proporcionan mejor información. Las secuencias parciales pueden ocasionar problemas a la hora de comparar y reproducir resultados, puesto que dentro de cada gen existen regiones con diferentes tasas evolutivas. El argumento que apoya la utilidad de las secuencias parciales defiende que, en los genes mitocondriales codificantes, la similitud de libertad y restricciones para cada una de las tres posiciones del codón puede ser uniforme a lo largo de toda la secuencia de un gen. Sin embargo, se ha demostrado que existe heterogeneidad en las tasas de sustitución entre regiones del ADNmt, lo que puede influir de forma importante en las hipótesis filogenéticas (Ballard, 2000 a, 2000b). El uso de una secuencia parcial de un gen que excluya la región variable puede llevar a resultados irreales y por tanto a interpretaciones filogenéticas y conclusiones erróneas. En consecuencia, los estudios con secuencias parciales deben ser considerados preliminares hasta que se establezcan las tasas de evolución de todas las regiones del gen completo del grupo de organismos en estudio (Mas-Coma & Bargues, 2009).

Los marcadores mitocondriales son especialmente útiles en estudios intrapoblacionales y los ribosomales en interpoblacionales. La combinación de ambos tipos de marcadores neutraliza los problemas inherentes a cada uno a la hora de llevar a cabo un estudio en profundidad de un grupo de poblaciones, subespecies y especies cercanas. Además, esta combinación de marcadores

permite detectar fenómenos de introgresión e híbridos, debido a su diferente tipo de herencia (Mas-Coma & Bargues, 2009). Los estudios multigénicos son los que permiten realmente conocer la historia evolutiva de una especie (Piccinalli *et al.*, 2009). Actualmente, con el fin de obtener la mayor información y puesto que es realmente complicado, el diseño de cebadores en el ADNmt los estudios filogenéticos de triatominos utilizan de forma combinada marcadores nucleares y mitocondriales (Martínez *et al.*, 2006; Dorn *et al.*, 2009, 2016; Weirauch & Munro, 2009; Blandón – Naranjo *et al.*, 2010; Calleros *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2017).

## 1.3 Situación de la enfermedad de Chagas en Perú

### 1.3.1 Revisión histórica de la enfermedad de Chagas en Perú

En el año 1.917, por primera vez el Dr. Escomel (1917) (Figura 10) reportó la presencia de *T. infestans* en los valles de Arequipa y en 1.919, el primer caso humano de la enfermedad de Chagas en Perú en un paciente procedente del departamento de Madre Dios (Escomel, 1919; Ayulo & Herrero, 1944, Ruíz-Guzmán, 2007; Náquira & Cabrera, 2009). Sin embargo, la infección por *T. cruzi* ha existido desde la época pre-colombina, hace aproximadamente 9.000 a 4.000 años puesto que se han hallado segmentos del ADN de *T. cruzi* en momias de la cultura Chinchorro (al norte de Chile y al sur de Perú) (Guhl *et al.*, 2000; Aufderheide *et al.*, 2004) y también se ha encontrado a este parásito en el tejido de una momia inca peruana (Fornaciari *et al.*, 2002; Náquira & Cabrera, 2009). Dentro de los vectores de la enfermedad de Chagas, el más ampliamente estudiado, por ser el más domiciliado, ha sido *T. infestans*. Se sabe que este vector fue introducido en Perú desde el sur, penetró a través del valle de Caplina (Tacna) seguramente en la llamada Guerra el Pacífico (1.879-1.883) entre Perú y Chile por tanto, es un insecto relativamente reciente en el país. Estos insectos tenían una barrera, una zona desértica sin poblar, que les impedía llegar hasta Perú. Durante la guerra se intensificó el tráfico entre Chile y el valle de Caplina y por ello, los valles peruanos del sur fueron los primeros infestados. La infestación tras la guerra quedó circunscrita a los valles de

Caplina y Moquegua pero con las migraciones humanas en 1.910, llegó a Arequipa con los “repatriados” procedentes de Tacna y Arica a través del mar, ya que no había carreteras. Transcurrieron unos 30-35 años hasta que *T. infestans* se estableció en Arequipa y apareció en Ica (Torrealva & Torrealva, 1945; Herrer, 1955).

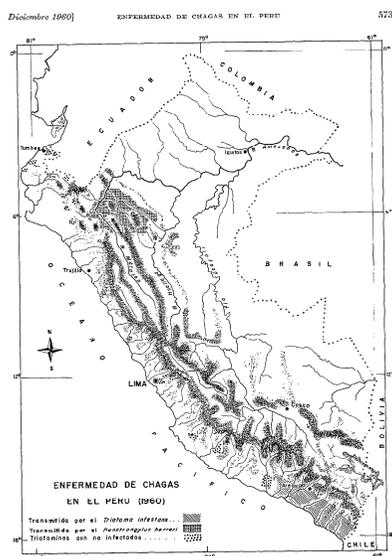


**Figura 10:** Imagen de Edmundo Escobel médico Arequipeño que diagnosticó en 1.919 el primer caso humano de la enfermedad de Chagas en Perú. Fuente: (Náquira & Cabrera, 2009).

Tras el descubrimiento del vector y el diagnóstico del primer caso humano de la enfermedad de Chagas en Perú, comienzan las investigaciones epidemiológicas. A partir de 1.950, estas investigaciones se intensifican y como consecuencia, en 1.959 ya se había diagnosticado alrededor de 200 casos humanos (Cornejo, 1958). Este aumento se debe en parte, a que en los últimos años de la década de los 50 comienza a usarse la reacción de fijación del complemento como método de diagnóstico de la enfermedad, hasta ese momento se usaba el xenodiagnóstico y la observación directa en la sangre. Paralelamente a la verificación del número de casos, comenzaron a conocerse aspectos epidemiológicos y entomológicos de la enfermedad; al mismo tiempo, que se comprobaba la diferencia entre la virulencia de las distintas cepas de *T. cruzi* en función de su procedencia (Herrer, 1960).

Los primeros estudios sobre la distribución del vector llevados a cabo por Escobel (1917) referían que la infestación estaba circunscrita a zonas aisladas, en forma de focos. Posteriores investigaciones epidemiológicas llevadas a cabo por Herrer (1960) describieron la distribución de la enfermedad en Perú como endémica en dos regiones. Por un lado, la vertiente occidental de los Andes con alturas desde los 0 a los 2.500 metros sobre el nivel del mar, lo que hoy en día se conoce como Arequipa, Moquegua y Tacna. En esta zona se localizaba como único triatomino *T. infestans* conocido como “Chirimacha” y “vinchuca”. Y por

otro lado, la región que se corresponde con el sistema hidrográfico del Amazonas que comprende los departamentos de Cajamarca y Amazonas. Las localidades de la zona donde se había identificado casos humanos se localizan entre los 850 y los 1.500 metros sobre el nivel del mar y por su altitud, clima y posición geográfica, pertenecen a lo que en Perú se denominaba Selva Alta. En esta zona se había descrito varias especies de triatomíneos pero parece que *Panstrongylus herreri* Wygodzinsky, 1948 llamado por la gente del lugar “chinche grande”, era el principal vector de *T. cruzi* en la especie humana en este área. Además de en estas zonas, se daban casos de Chagas en otros puntos del país pero no eran considerados endémicos (Figura 11).



**Figura 11:** Mapa de la distribución de la enfermedad de Chagas en Perú en 1960 y los vectores responsables de esta en cada zona. Fuente: (Herrer, 1960).

### 1.3.2 Especies de vectores descritas en Perú

La primera cita acerca del hallazgo de triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas en Perú la realizó Escobel (1917), en ella citaba exclusivamente a *T. infestans*. El siguiente estudio vectorial fue realizado en

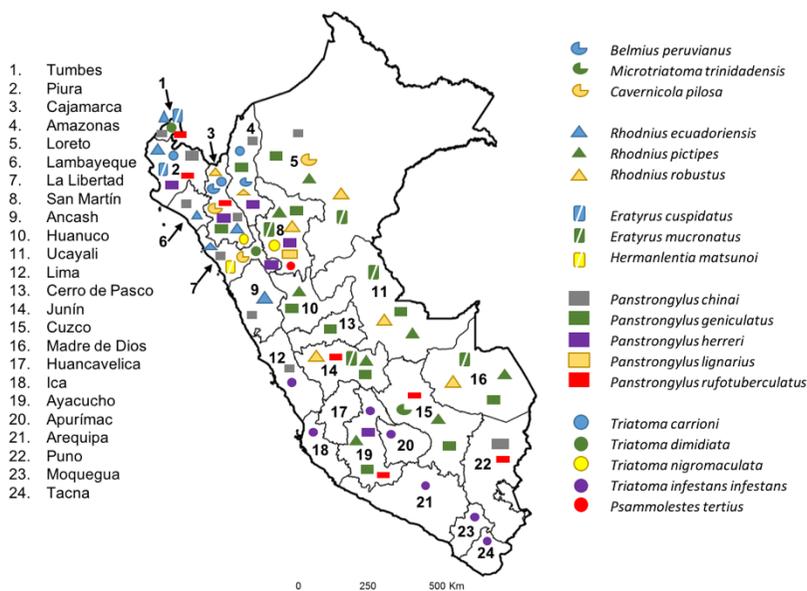
1.960 y se hallaron 12 especies diferentes distribuidas por todo Perú: *T. infestans*, *T. dimidiata*, *Triatoma carrioni* Larrousse, 1926, *Microtriatoma trinidadensis* Lent, 1951, *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, *Panstrongylus rufotuberculatus* Champion, 1899, *P. herreri*, *P. chinai*, *Rhodnius pictipes* Stal, 1872, *Rhodnius robustus* Larrousse, 1927, *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 y *Belmius peruvianus* Herrero, Lent y Wygodzinsky, 1954 (Herrer, 1960).

En el presente estudio, se han recopilado todos los vectores que han sido hallados e identificados en Perú desde 1.917 hasta la actualidad. Además, se han añadido vectores en algunos departamentos que no estaban descritos en la literatura. En Perú se han registrado un total de 19 especies: *Belmius peruvianus*, *Microtriatoma trinidadensis*, *Cavernicola pilosa* Barber, 1937, *R. ecuadoriensis*, *R. pictipes*, *R. robustus*, *Eratyrus cuspidatus* Stal, 1859, *Eratyrus mucronatus* Stal, 1859, *Hermanlenticia matsunoi* Fernández-Loayza 1989, *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *Panstrongylus lignarius* Walker, 1837, *P. rufotuberculatus*, *T. carrioni*, *T. dimidiata*, *Triatoma nigromaculata* Stal, 1859, *T. infestans*, *Psammolestes tertius* Bergroth, 1911 (Escomel, 1917; Herrer, 1960; Cabrera *et al.*, 2002; Cáceres *et al.*, 2002; Cuba *et al.*, 2002; Chávez, 2006; Cabrera, 2006; Náquira & Cabrera, 2009) (Tabla 2) y (Figura 12).

La variabilidad vectorial en el norte y centro de Perú es mayor que en el sur donde predomina *T. infestans* (Cáceres *et al.*, 2002; Cuba *et al.*, 2002; Cabrera, 2006; Chávez, 2006). La especie más ampliamente distribuida es *P. geniculatus*, ya que se encuentra en 11 de los 24 departamentos. Cabe destacar que en el departamento de Huancavelica no se han encontrado vectores. La especie *T. dimidiata* puede que esté eliminada en Perú puesto que desde hace años no se encuentra en las capturas. Los departamentos de Tacna y Moquegua han sido certificados como libres de transmisión vectorial por *T. infestans* (único vector existente en la zona) lo que no significa que se halla eliminado ya que en Tacna no se han encontrado en las capturas más recientes pero en Moquegua sí .

Especies	Tumbes	Piura	Cajamarca	Amazonas	Loreto	Lambayeque	La Libertad	San Martín	Ancash	Huánuco	Ucayali	Lima	Cerro de Pasco	Junín	Cuzco	Madre de Dios	Huancavelica	Ica	Ayacucho	Apurímac	Arequipa	Puno	Moquegua	Tacna
<i>Belmius peruvianus</i>			✓																					
<i>Microtriatoma trinidadensis</i>		✓													✓									
<i>Cavernicola pilosa</i>		✓			✓		✓																	
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	✓		✓			✓										✓								
<i>Rhodnius pictipes</i>			✓		✓						✓				✓									
<i>Rhodnius robustus</i>			✓	✓	✓						✓				✓									
<i>Eratyrys cuspidatus</i>	✓															✓								
<i>Eratyrys micronotatus</i>					✓						✓													
<i>Hermanientia matsuii</i>							✓																	
<i>Panstrongylus chinai</i>	✓		✓	✓	✓	✓	✓					✓												
<i>Panstrongylus geniculatus</i>		✓	✓	✓	✓						✓				✓							✓		
<i>Panstrongylus herreri</i>		✓	✓	✓			✓																	
<i>Panstrongylus lignarius</i>		✓	✓																					
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>	✓		✓																			✓		
<i>Triatoma carrioni</i>		✓		✓																				
<i>Triatoma dimidiata</i>	✓						✓																	
<i>Triatoma nigromaculata</i>			✓																					
<i>Triatoma infestans infestans</i>								✓														✓		
<i>Psammolestes tertius</i>								✓																

**Tabla 2:** Distribución por departamentos de los triatominos vectores de la enfermedad de Chagas en Perú. Se observan tanto los vectores descritos en la literatura desde 1.917 hasta la actualidad, como los encontrados en el presente estudio. Los símbolos de color rojo son los vectores añadidos que no se han descrito previamente en la literatura.



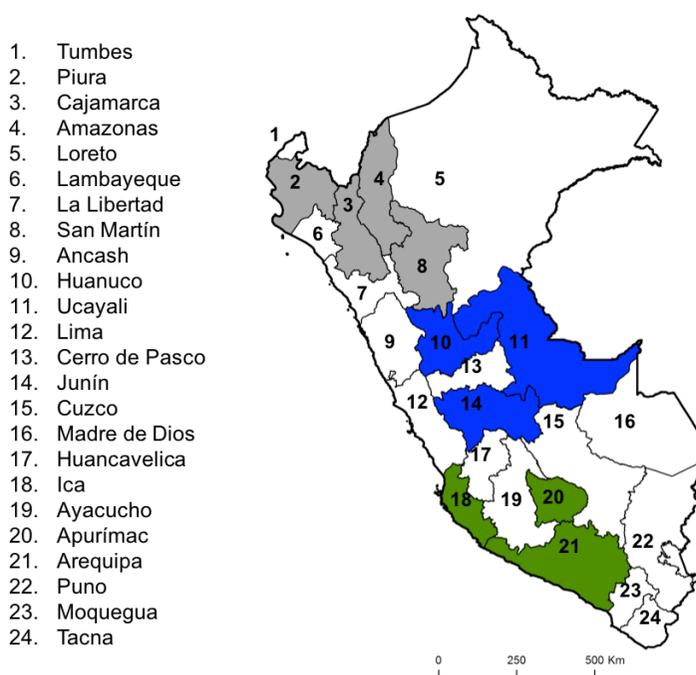
**Figura 12:** Mapa de Perú en el que aparecen numerados los departamentos y mediante un símbolo se indica qué triatomíneos vectores de la enfermedad de Chagas se han encontrado tanto en la literatura como en el presente estudio.

Desde un punto de vista epidemiológico los vectores más importantes son los de hábitos domiciliarios. En Perú destacan *T. infestans* en la región sur y *P. herreri* en la región norte (Herrer, 1960). Sin embargo, cada vez se observan más especies con hábitos silvestres como *P. chinai* en los domicilios (Náquira & Cabrera, 2009). Actualmente, en Perú son considerados como los principales vectores en la macro región norte *P. herreri*, *P. chinai* y *R. ecuadoriensis* y en la macro región sur destacan *T. infestans* y *P. rufotuberculatus* (Cabrera, 2005).

### 1.3.3 Situación epidemiológica actual

En Perú, actualmente, la enfermedad de Chagas sigue teniendo importancia epidemiológica. Se estima que en este país existen entre 650.000

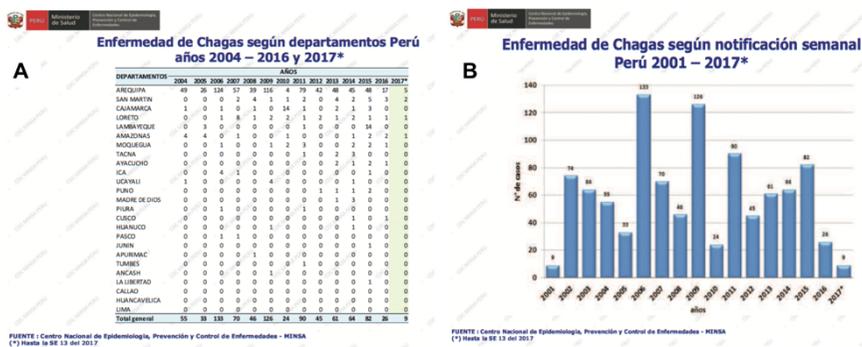
y 670.000<sup>6</sup> personas infectadas con *T. cruzi* (Torres & Cabrera, 2010). Los casos humanos autóctonos han sido reportado en las tres macro regiones: la macro región norte (Piura, Cajamarca, Amazonas, San Martín) que coincide en parte con la región de la Selva Alta que describía Herrer (1960); macro región centro (Huánuco, Ucayali, Junín); y la macro región sur (Ica, Apurímac, Arequipa), también considerada como zona endémica por Herrer (1960) (Cáceres *et al.*, 2002; Náquira & Cabrera, 2009; Náquira, 2014) (Figura 13).



**Figura 13:** Mapa de los departamentos de Perú en los que existen casos humanos autóctonos de Chagas. Aparecen marcadas las 3 macro regiones: en color gris la macro región norte; en color azul la macro región central; y en color verde la macro región sur.

Desde el año 1.997 los casos agudos de la enfermedad de Chagas en Perú son de declaración obligatoria, la incidencia de casos registrada en Perú no refleja la verdadera magnitud de la infección humana, porque muchos casos

quedan sin registrar (Cabrera, 2005). Desde 2.004, los años en los que más casos de la enfermedad de Chagas se han registrado han sido 2.006 y 2.009. Arequipa es el departamento en el que más casos son declarados. Los únicos departamentos en los que no existen casos declarados desde 2.004 son Callao (realmente es una provincia Constitucional de Lima), Lima, y Huancavelina (como ya se ha comentado, no se han hallado triatominos en este departamento en la literatura). Hasta la fecha, el año 2.001 es el año con menor número de casos registrados y el año 2.017 parece tener la misma tendencia (RENACE, 2017) (Figura 14).



**Figura 14:** Casos humanos de la enfermedad de Chagas declarados en Perú hasta el 26 de abril de 2.017 recogidos por la Red Nacional de Epidemiología y Control de Enfermedades (RENACE) perteneciente al Ministerio de Salud de Perú. (A): Número de casos declarados por departamento al año desde 2.014 hasta 2.017. (B) Distribución anual de los casos humanos de la enfermedad de Chagas declarados desde el año 2.000 hasta 2.017 en Perú. Fuente: (RENACE, 2017).

La seroprevalencia humana de infección por *T. cruzi* en el norte de Perú es de 14,9% afectando a residentes de zonas rurales, mientras que en el sur, la seroprevalencia varía desde 1,4 a 13,4% en zonas rurales, urbanas y periurbanas (Alroy *et al.*, 2005). En el sur, destaca la ciudad de Arequipa con tasas de seroprevalencia en niños del 5%, lo que implica que esta población presenta un alto riesgo de infección por *T. cruzi* (Bowman *et al.*, 2008).

Ya se ha comentado que la variabilidad genética de *T. cruzi* permite distinguir 6 tipos o DTU's y que la clínica asociada a cada uno de ellos es distinta. En Perú se han encontrado dos DTU's de *T. cruzi*: TcI y TcIII (Zingales *et al.*, 2012; Higuera *et al.*, 2013). Las manifestaciones clínicas asociadas a estos son:

en el caso de TcI, cardiopatía chagásica; y en el caso de TcIII, se conoce poco sobre su clínica, puesto que es raro en humanos y está más asociado a ciclos silvestres y a perros, pero se relaciona con casos agudos (Zingales *et al.*, 2012).

Las primeras campañas de control vectorial en el país comenzaron en la macro región sur. En 1.965 se realizó un control exitoso de *T. infestans* mediante el rociamiento domiciliario de insecticidas, sin embargo, la persistencia del vector hizo necesario un segundo plan de control que se implementó en el año 2.000 y que siguió las directrices del Plan CONAL. El plan fue diseñado con el asesoramiento de los países del Cono Sur y con la Organización Panamericana de la Salud, con el objetivo de eliminar *T. infestans* y el tamizaje de los bancos de sangre. Este plan se aplicó a Tacna, Moquegua y Arequipa con éxito en Tacna y Moquegua por lo que estos departamentos fueron considerados libres de transmisión vectorial por la OPS Organización Panamericana de la Salud en 2.010 (Náquira & Cabrera, 2009). En el departamento de Arequipa se siguen registrando casos humanos de la enfermedad, de hecho es el departamento de Perú donde más casos al año se declaran (RENACE, 2017) y no solo en las zonas rurales ya que cada vez se registran más transmisión en zonas urbanas, principalmente asociadas a *T. infestans*. Esta urbanización de la enfermedad se debe fundamentalmente a la migración rural a la ciudad, con todo lo que acarrea este tipo de movimientos humanos: transporte de animales que actúan de reservorio, hacinamiento de la población, condiciones insalubres, etc. Por ello, la urbanización de la enfermedad de Chagas se ha consolidado como un nuevo escenario epidemiológico principalmente en la ciudad de Arequipa (Bowman *et al.*, 2008; Bayer *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2013; Barbu *et al.*, 2014; Náquira, 2014; Khatchikian *et al.*, 2015). Desde 2.003 las autoridades municipales y el ministerio de Salud en colaboración con la Organización Panamericana de la Salud trabajan para eliminar al vector de la ciudad (Barbu *et al.*, 2014) Otras ciudad peruana donde se han encontrado *T. infestans* es Lima, donde se encuentran en las afueras de la ciudad asociados a movimientos migratorios humanos (Cuba *et al.*, 2002) pero a diferencia del caso anterior, en el departamento de Lima, hasta la fecha, no se ha registrado ningún caso humano (RENACE, 2017).

En Perú se han implantado con éxito programas de control para hacer frente a la enfermedad de Chagas. Dentro del área macro región sur existe un programa de control específico para la Ciudad de Arequipa y Moquegua, con énfasis en el ataque químico contra el único vector, *T. infestans*. En los valles de los departamentos de la costa norte, los cuales forman parte de las

iniciativas ICA y AMCHA, los programas de control no son tan específicos como los de la Región Sur, pero existen medidas comunes como la notificación obligatoria de los casos agudos, para evitar la transmisión activa y reducir el riesgo. Los programas de control implantados en Perú, en general llevan a cabo distintos tipos de vigilancia (Cabrera, 2005):

- Vigilancia epidemiológica: Trata de reducir las infestaciones de los domicilios y peridomicilios y de impedir la colonización por parte de triatominos silvestres
- Vigilancia serológica: se llevan a cabo estudios de seroprevalencia para detectar anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, en gestantes, menores de 15 años o escolares, donantes de sangre y poblaciones de alto riesgo.
- Vigilancia centinela: controlan la infección congénita y de otros grupos de riesgo en establecimientos centinela con protocolos específicos.
- Vigilancia de los factores y determinantes de riesgo: existen protocolos específicos para controlar factores de riesgo como vivienda, hacinamiento, crianza de mamíferos...y determinantes de riesgo como temperatura, cambios antroponóticos...
- Vigilancia entomológica con participación comunitaria: Educación a la población afectada para que ellos mismos sean capaces de notificar la presencia de triatominos.

Las medidas de prevención y control de la enfermedad de Chagas que actualmente aplican en Perú son:

- 1) Mejoras de la vivienda y del peridomicilio como: cubrir hendiduras y grietas de las paredes, dormitorios ventilados, limpieza de la vivienda, criar animales en corrales construidos con alambre, enlucir las viviendas ,...
- 2) Control químico mediante rociamiento con insecticidas piretroides. Antes de comenzar las campañas de rociamiento se estudian los indicadores entomológicos
- 3) Control de la transmisión transfusional: es obligatorio realizar un control contra *T. cruzi* tanto en la sangre como en sus hemoderivados en los donantes
- 4) Educación sanitaria: La población en riesgo debe conocer que las “vinchucas o chirimachas” transmiten el agente etiológico de la enfermedad y además, debe ser instruida para saber cómo evitarla

- 5) Vigilancia entomológica comunal: con sensores que se colocan detrás de las puertas de las viviendas rociadas o con programas de mejora de la vivienda
- 6) Tratamiento de los casos humanos

El programa específico de control en la región macro sur tiene varias fases e implica a varios organismos públicos para asegurar su funcionamiento y un correcto seguimiento. Las fases del programa son diagnóstico, ataque, consolidación y mantenimiento. El diagnóstico está orientado a conocer los indicadores entomológicos, seroprevalencia en menores de 5 años y entrenamiento de los recursos. La fase de ataque se basa en control químico y mejora de la vivienda. La consolidación prioriza el control de focos causados por re-infestación, en los que debe observarse una reducción de la seroprevalencia en los menores de 5 años. La última fase de mantenimiento asegura una vigilancia mínima de 3 años, para lograr la certificación de la eliminación del vector en una provincia o departamento. Si tras haber rociado una vivienda se encuentran triatominos, se realiza una investigación por parte de la Oficina Ejecutiva de Salud Ambiental (DESA) correspondiente (Cabrera, 2005).

#### 1.3.3.1 Nuevo escenario epidemiológico en Perú: Urbanización de la enfermedad

La emergencia de la enfermedad de Chagas en zonas urbanas enfatiza la importancia de los estudios de salud pública para investigar los procesos dinámicos de invasión, colonización y aumento de los agentes causales de la enfermedad en sistemas urbanos (Foley *et al.*, 2013) para poder diseñar a medida, las campañas de control. La expansión de las poblaciones de especies invasoras en las ciudades está estrechamente relacionada con la historia del desarrollo urbano (Khatchikian *et al.*, 2015). El fenómeno de globalización, que está teniendo lugar en todo el mundo, ha generado una serie de cambios culturales, económicos, políticos,... que están modificando las sociedades. En las últimas décadas, Latino América ha experimentado un apabullante fenómeno de urbanización debido, en gran parte, a la inmigración, y Perú no es una excepción. Diversos estudios han relacionado directamente la migración y los nuevos asentamientos cercanos a las ciudades, con la transmisión de la enfermedad de Chagas (Bowman *et al.*, 2008; Bayer *et al.*, 2009; Foley *et al.*,

2013; Náquira, 2014; Khatchikian *et al.*, 2015). Se han encontrado indicios que sugieren que los inmigrantes que viven en la periferia de las ciudades, en poblados chabolistas, es muy probable que sean los que introduzcan estos vectores en la ciudad, tras su primera llegada. Además, los movimientos estacionales de personas como los trabajadores temporeros, hacen que los residentes de estos barrios chabolistas viajen para trabajar en lugares endémicos donde los vectores son prevalentes y luego vuelvan a sus casas. El patrón de asentamiento chabolista junto con la práctica de cría de animales domésticos, en estas zonas, crean un ambiente favorable para los vectores. Los métodos para la mejora del control vectorial de esta enfermedad deben enfocarse hacia la supervivencia del vector en áreas con poblaciones móviles, mediante campañas de educación sobre la enfermedad a la población, enfocadas por ejemplo, hacia temporeros y por supuesto, fomentando la colaboración entre los distintos organismos públicos de salud (Bayer *et al.*, 2009).

En Perú, el departamento de Arequipa es el que más casos humanos declara de la enfermedad de Chagas (RENACE, 2017) en su capital, la ciudad de Arequipa, fue donde se observaron por primera vez en 1.952 vectores infectados (Lumbreras, 1952) y donde se localiza el mayor foco urbano de transmisión vectorial de esta enfermedad (Bowman *et al.*, 2008; Bayer *et al.*, 2009; Foley *et al.*, 2013; Náquira, 2014; Khatchikian *et al.*, 2015). La población en la ciudad de Arequipa ha crecido rápidamente desde 1.960 hasta la actualidad, sobretodo por la inmigración procedente de pueblos de los valles Andinos atraídos por las oportunidades económicas que ofrece. Estos inmigrantes llevan consigo sus animales (ovejas, vacas, gallinas, cerdos guineanos,...) creando así, asentamientos densamente poblados en los que animales y humanos están en contacto permanente (Bowman *et al.*, 2008). Los asentamientos de los inmigrantes en las zonas periurbanas de Arequipa (al igual que en otras ciudades de Perú), se inician con invasiones, cuando las familias desplazadas o sin vivienda ocupan laderas desérticas en la periferia de la ciudad. Una vez formalizadas estas viviendas, a través del otorgamiento de títulos de propiedad, se levantan estructuras permanentes. En este punto, la comunidad toma el nombre de “pueblo joven”. Con el tiempo, con una mayor infraestructura de carreteras, con instalación de agua y desagüe en toda la comunidad, se conectan con secciones ya establecidas de la ciudad y pasan a llamarse “urbanizaciones” (Náquira, 2014). En los “pueblos jóvenes”, la mayoría de los residentes trabajan como temporeros en los campos y las industrias cercanas a la ciudad. Como ya se ha comentado, los temporeros

trabajan en focos activos de Chagas por lo que además de infectarse, pueden transportar con ellos a las ciudades animales, también infectados, y triatomíneos. Los patrones genéticos que se encuentran en la ciudad de Arequipa indican que hay un flujo constante de nuevas invasiones de *T. infestans* procedentes de otras zonas ya que hay una alta riqueza alélica (Khatchikian *et al.*, 2015). Las viviendas que se localizan en las “urbanizaciones” suelen estar construidas de ladrillo, mientras que las que se localizan en barrios menos asentados o de reciente construcción suelen ser de *sillar*, una roca volcánica. El material de las viviendas condiciona las tasas de infestación domiciliarias por lo que en los barrios más asentados estas tasas rondan el 3-9% y en los barrios más recientes se sitúan entre el 17 y 21%, ya que los materiales de construcción son favorables para la domiciliación del triatómimo. Los factores demográficos también afectan a la epidemiología, en las zonas recientemente ocupadas la alta densidad de domicilios y de población favorece la diseminación del vector entre las casas (Bowman *et al.*, 2008) (Figura 15).



**Figura 15:** Imágenes de viviendas construidas en la periferia de Arequipa, que va desde el punto A, en el que se encuentran las recientemente erigidas, en los bordes del cerro, hasta las de la zona urbanizada del distrito Mariano Melgar (punto C), y una zona intermedia (punto B) que incluye “pueblos jóvenes”. Imagen adaptada de (Náquira, 2014).

La cría de animales domésticos en estos asentamientos favorece las reinfestaciones desde los peridomicilios, donde se encuentran los corrales (Cecere *et al.*, 1997). El cerdo actúa como reservorio de la enfermedad de Chagas y es uno de los principales animales domésticos en estas zonas

periurbanas. La presencia de los cerdos es determinante en la infestación por *T. infestans*, las casas que tienen corrales cercanos con estos animales es más probable que sean infestadas y cuando lo hacen, albergan dos veces más vectores que el resto de domicilios. Además, el hábito de los cerdos de apoyarse contra los muros del corral facilita la alimentación y el crecimiento de las poblaciones de triatominos (Levy *et al.*, 2006).

Las invasiones biológicas tienen consecuencias ecológicas, económicas y de salud públicas devastadoras, en el caso de Arequipa, esta invasión ha generado una crisis de salud pública que ha puesto en riesgo de infección por *T. cruzi* a miles de residentes de esta ciudad, siendo necesaria una gran campaña de control vectorial, con los costes económicos que esto acarrea (Foley *et al.*, 2013). La combinación de un clima favorable, condiciones de pobreza de los domicilios, la proximidad a los animales domésticos, junto con la alta densidad de población generan un clima ideal para la transmisión vectorial periurbana en Perú de *T. cruzi*. Todos estos factores deben ser tenidos en cuenta a la hora de desarrollar estrategias más eficientes en la lucha de la transmisión vectorial (Bowman *et al.*, 2008).

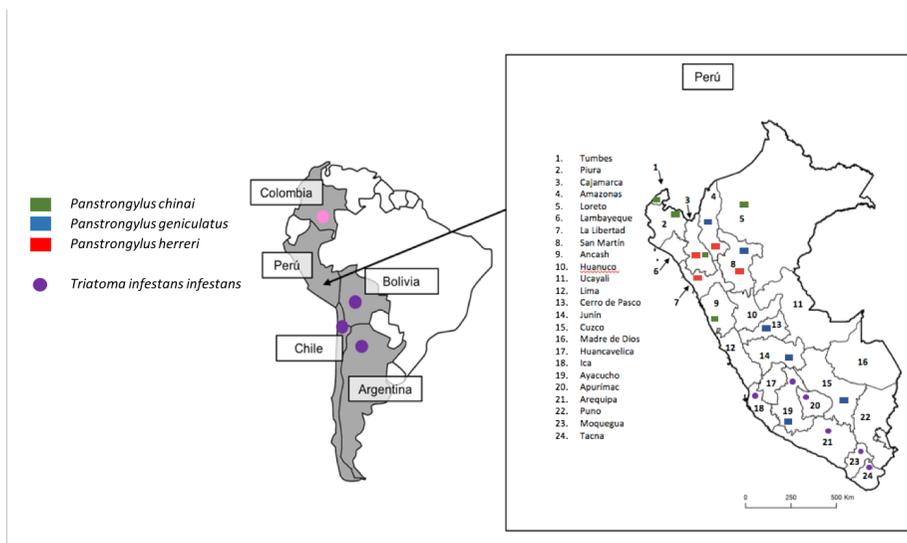
## Capítulo 2. Material y métodos



## 2.1 Material

Para este estudio se han procesado y analizado un total de 297 triatominos de los cuales 281 proceden de Perú y 16 proceden de países vecinos: Bolivia, Argentina, Chile y Colombia. Estos insectos se agrupan en 4 especies: *T. infestans* (129 ejemplares de los cuales: 113 son de Perú; 12 de Bolivia; 2 de Argentina; y 2 de Chile); *P. chinai* (51 ejemplares de Perú), *P. geniculatus* (14 ejemplares de Perú) y *P. herreri* (103 ejemplares de Perú) (Figura 16) y (Tabla 3).

Los insectos procedentes de Perú fueron colectados, fijados en etanol y enviados al Laboratorio de Parasitología, Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de València por el equipo del profesor Abraham Cáceres del Instituto de Medicina Tropical (DAC), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. Los insectos procedentes del resto de países se han utilizado con fines comparativos y se han obtenido de la colección de triatominos del Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, a cargo de la Doctora María Dolores Bargues. Al igual que en el caso de Perú estos insectos se encontraban fijados en alcohol



**Figura 16:** Mapas políticos que muestran la procedencia y la distribución de los materiales estudiados. Se indican mediante diferentes formas y colores las especies analizadas en el presente estudio. Aparece ampliado a la derecha el mapa político de Perú en el que se observan qué ejemplares se han recogido en cada uno de los departamentos del país.

Especie País Nº de ejemplares	Ambiente	Altitud (m)	Localidad Procedencia Localidad, Distrito, Provincia, departamento	n
<b>Género <i>Triatoma</i></b>				
<i>T. infestans</i>	-	432	La Tinguiña, La Tinguiña, Ica	12
<b>Perú</b>	D	1476	Senccache – Concepción, Otoca, Lucanas, Ayacucho	3
<b>N= 113</b>	D	1654	Kullumayo, Otoca, Lucanas, Ayacucho	4
	D	1800	Maran, Pauza, Paucar del Sara Sara, Ayacucho	14
	D	2810	Ayranaca, Pauza, Paucar del Sara Sara, Ayacucho	20
	D	2800	Huanuco, Pauza, Paucar del Sara Sara, Ayacucho	2
	-	2772	Pampatama, Tintany, Aymaraes, Apurímac	6
	-	2979	Santa Isabel, Santa Rosa, Aymaraes, Apurímac	5
	-	1617	Villa la Joya, La Joya, Arequipa, Arequipa	2
	P	2250	7 de Junio, Sachaca, Arequipa, Arequipa	7
	D	2268	Hunter, Hunter, Arequipa, Arequipa	4
	-	2385	Mariano Melgar, Mariano Melgar, Arequipa, Arequipa	2
	D	2430	Miraflores, Miraflores, Arequipa, Arequipa	1
	D	2355	Allancay, Quechualla, La Unión, Arequipa	2
	D	2421	Quechualla, Quechualla, La Unión, Arequipa	6
	P	1439	San Francisco, Moquegua, Mariscal Nieto, Moquegua	12
	-	2576	Matalaque, Matalaque, Sánchez Cerro, Moquegua	8
	-	2576	Sahuanay, La Capilla, Sánchez Cerro, Moquegua	1
	-	570	Tacna	1
	-	570	Tacna	1
<i>T. infestans</i>	P	2560	Sipesipe, Quillacollo, Cochabamba	2
<b>Bolivia</b>	D,P,S	2555	Cotapachi, Quillacollo, Cercado, Cochabamba	3
<b>N= 12</b>	P	817	Pozo del monte, Boyuibe, Cordillera, Santa Cruz	3
	D	811	Benemerito, Boyuibe, Cordillera, Santa Cruz	1
	D	1388	Mataral, Chuquisaca, Santa Cruz	1
	P	-	(Colonias de laboratorio) Insectos capturados en Bolivia	2
<i>T. infestans</i>				
<b>Argentina</b>	P	97	Pampa del Indio, Chaco, General San Martín	2
<b>N= 2</b>				
<i>T. infestans</i>				
<b>Chile</b>	D	810	Cachiyuyo, borde de las provincias Atacama y Coquimbo	2
<b>N= 2</b>				
<b>Género <i>Panstrongylus</i></b>				
<i>P. chinai</i>	P	12	Totumo, Matapalo, Zarrumilla, Tumbes	5
<b>Perú</b>	-	65	Jibito, Querocotillo, Sullana, Piura	15
<b>N=51</b>	-	72	Sullana, Sullana, Piura	8
	D	72	Sullana, Sullana, Piura	4
	D	72	CP11, Tambo Grande, Tambo Grande, Piura	1
	-	72	CP4, Tambo Grande, Tambo Grande, Piura	1
	P	400	Nanchoc, Nanchoc, San Miguel, Cajamarca	2
	D	2380	Ingenio, San Bernardino, San Pablo, Cajamarca	5
	-	1164	Las Pampas, Chota, Cajamarca	1
	-	104	Miguel Grau, Yurimaguas, Alto Amazonas, Loreto	7
	-	1231	Pariacoto, Huaraz, Ancash	2
<i>P. geniculatus</i>	-	468	(Hotel Barcelona) Bagua Grande, Bagua Grande, Utcumbamba, Amazonas	1
<b>Perú</b>	D	214	Paujilzapa, Buenos Aires, Picota, San Martín	1
<b>N= 14</b>	D	231	Nuevo control, Picota, Picota, San Martín	1
	D	231	Aypeña, Picota, Picota, San Martín	1
	D	1460	Puente Paucartambo, Villa Rica, Oxapampa, Cerro de Pasco	1

-	1813	Pozuzo, Oxapampa, Cerro de Pasco	3
D	715	Río Blanco, La Merced, Chanchamayo, Junín	1
P	620	Kimbiri, Kimbiri, La Convención, Cusco	2
D	807	Catarata, Pichari, La Convención, Cusco	1
D	3644	Buena gana, Anco, La Mar, Ayacucho	2
<hr/>			
<b>P. herreri</b>	D	707 Jaén, Jaén, Cajamarca	10
<b>Perú</b>	D	1663 Tablabamba, Santo Domingo de la Capilla, Cutervo, Cajamarca	4
<b>N= 103</b>	D	1700 La Esperanza, Pimpingos, Cutervo, Cajamarca	5
	D	1744 Guayaquil, Pimpingos, Cutervo, Cajamarca	4
	D	1790 Casa Blanca, Pimpingos, Cutervo, Cajamarca	4
	-	1790 Casa Blanca, Pimpingos, Cutervo, Cajamarca	2
	-	700 San Juan de Chiple, Callayuc, Cutervo, Cajamarca	1
	D	1797 San Juan de Dios, Callayuc, Cutervo, Cajamarca	2
	-	1797 San Juan de Dios, Callayuc, Cutervo, Cajamarca	11
	D	1849 El limón, Callayuc, Cutervo, Cajamarca	2
	D	1990 Playa hermosa, Callayuc, Cutervo, Cajamarca	5
	D	2271 Puquio, Callayuc, Cutervo, Cajamarca	2
	D	2171 Chirimoyo, Sinchimache, Cutervo, Cutervo, Cajamarca	2
	-	2537 Sinchimache, Cutervo, Cutervo, Cajamarca	9
	-	2257 Guayo, Querocotillo, Cutervo, Cajamarca	3
	D	468 Seda Flor, Cajaruro, Utcumbaba, Amazonas	10
	-	930 Gálvez, Aramango, Bagua, Amazonas	5
	-	950 La Palma, Aramango, Bagua, Amazonas	4
	D	1245 Lonya Grande, Lonya Grande, Utcumbamba, Amazonas	1
	-	2143 Copallín, Copallín, Bagua, Amazonas	3
	-	130 Trus Alto, Chepen, Chepen, La Libertad	1
	P	876 Nueva Unión, Alfonso Alvarado, Lamas, San Martín	1
	D	743 Lahuarpia, Jepelacio, Moyobamba, San Martín	1
	-	1034 Nuevo Oriente, Jepelacio, Moyobamba, San Martín	1
	-	2041 Chimu, Moyobamba, Moyobamba, San Martín	10

**Tabla 3:** Especies estudiadas de ejemplares procedentes de Perú y de países vecinos. Se ordenan los insectos por género: *Triatoma* y *Panstrongylus*. Se indica: total de ejemplares estudiados de cada especie y país (N); ecotopo del que provienen (ambiente), D= Domicilio, P= Peridomicilio; procedencia (localidad); y número de ejemplares analizados en cada una de las localidades geográficas (n).

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Selección de marcadores moleculares

Para la identificación y clasificación de triatominos se utilizan marcadores moleculares del ADNr nuclear y del ADNmt. La elección de uno u otro tipo de marcadores se justifica por las características diferenciales que poseen, puesto que aportan diferente información.

De acuerdo a los objetivos del trabajo, la combinación de los marcadores del ADNr y del ADNmt proporcionarán la información que permitirá el desarrollo de los mismos. Se han utilizado 3 marcadores del ADNr: los espaciadores transcritos internos ITS-1 e ITS-2 y la región intergénica completa del ADNr que comprende ITS-1, 5.8S e ITS-2. Además, se analizan 5 marcadores del ADNmt: 16S, ND1, COI, Cyt *b* y la región intergénica comprendida entre los genes ND1 y Cytb.

#### 2.2.1.2 Marcadores ribosomales nucleares

Los marcadores del ADNr nuclear presentan una serie de características que los hacen ideales para los estudios de relaciones filogenéticas a nivel de género, especie y subespecie. Este tipo de marcadores, como ya se ha comentado, han sido ampliamente utilizados en estudios de triatominos.

Se analiza por primera vez la región intergénica completa de especies de triatominos halladas en Perú como: *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. herreri*.

#### 2.2.1.3 Marcadores mitocondriales

Los marcadores del ADNmt presentan una evolución más rápida que los marcadores del ADNr nuclear y por eso se utilizan en análisis de relaciones filogenéticas a nivel de subespecies, poblaciones e híbridos.

En el presente estudio se analizan por primera vez genes completos de triatominos como Cyt *b* y ND1 y la región intergénica situada entre ambos. Además, se analizan fragmentos de genes como COI y 16S.

### 2.2.2 Extracción del ADN

Para la extracción de ADN, se utilizaron patas de ejemplares fijados en etanol al 70% y en algunos casos, en los que las patas no tenían suficiente musculatura o los resultados eran negativos, se utilizó la musculatura del tórax.

La extracción se llevó a cabo con el kit comercial InstaGene Matrix de Bio-Rad, siguiendo el protocolo para extracción de ADN de tejidos proporcionado por el fabricante.

El proceso de extracción se basa en el empleo de una matriz que retiene los productos generados de la lisis celular permitiendo así la obtención de un extracto de ADN de un modo más rápido y sencillo que la extracción clásica fenol-cloroformo.

Antes de realizar la extracción, se trituran las muestras con ayuda de una tijera para que los reactivos del kit puedan acceder más fácilmente a la musculatura de la cual se extrae el ADN. El proceso de extracción de ADN consiste en:

1. Añadir 150 µl de la matriz al tubo eppendorf con el material biológico.
2. Incubar a 56°C, con agitación durante 30 minutos.
3. Incubar en agua en ebullición durante 8 minutos.
4. Agitar en un vórtex durante 10 segundos.
5. Centrifugar durante 3 minutos a 13.000 revoluciones por minuto (rpm).
6. Tomar el sobrenadante, con precaución de no arrastrar el precipitado que contiene la matriz, restos celulares (parte del exoesqueleto de quitina) y pasarlo a otro eppendorf previamente rotulado y autoclavado.
7. Conservar congelado a -20°C.

### 2.2.3 Amplificación por PCR de los marcadores moleculares

Las secuencias de los marcadores moleculares de cada muestra fueron amplificadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa PCR.

Los oligonucleótidos cebadores o *primers* utilizados para la reacción se unen a zonas conservadas que flanquean la secuencia analizada. Los cebadores empleados en el estudio del ADNr fueron diseñados en posiciones conservadas de los genes 18S y 28S (Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues *et al.*, 2002, 2002, 2006). Para el diseño de los cebadores del ADNmt se partió del genoma mitocondrial completo de *T. dimidiata* (Dotson & Beard, 2001) y de la

compilación de cebadores conservados para PCR en animales llevada a cabo por Simon y colaboradores (2006) y además, se utilizó la herramienta *Primer Desing* del NCBI Centro de Información Biotecnológica de la Biblioteca Nacional de Medicina de EEUU del inglés *National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine* para avances en ciencias y salud que provee el acceso a información genómica y biomédica. Muchos de los cebadores y las condiciones de PCR utilizadas fueron obtenidos a partir de la bibliografía como es el caso del gen 16S en el que para todas las especies tanto los cebadores como las condiciones de reacción fueron las mismas (Lyman *et al.*, 1999; Ceretti *et al.*, 2008; Segura *et al.*, 2009). La forma de obtención del gen ND1 es diferente en función de la especie estudiada y del estado del ADN puesto que se obtiene en una sola reacción o se necesitan varias reacciones con diferentes combinaciones de cebadores y condiciones (Mas-Coma & Bargues, 2009). Para el gen COI debido a la dificultad en el diseño de cebadores específicos se han utilizado parejas universales (Folmer *et al.*, 1994). El gen *Cyt b* se obtiene por partes pero la combinación de cebadores es distinta en función de la especie (Lyman *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2003; Pfeiler *et al.*, 2006; Patterson & Gaunt, 2010; Ceballos *et al.*, 2011; Justi *et al.*, 2014). Para la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 se han utilizado genomas mitocondriales completos de otras especies además del de *T. dimidiata* (Li *et al.*, 2011)

La mezcla de reacción de PCR utilizada tiene un volumen total de 25µl y una composición constante (Tabla 4).

Mezcla de reacción de PCR		
Componentes	Concentración	Volumen
Mezcla de reacción:		
<b>Tampón</b>	*	2,5 µL
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 mM	2,0 µL
<b>DNTPs (Desoxirribonucleótidos trifosfato: adenina, citosina, guanina, timina)</b>	2 µM (de cada uno)	5,0 µL
<b>Cebadores</b>	10 µM /cebador	0,5 µL /cebador
<b>Polimerasa**</b>	5 U µl <sup>-1</sup>	0,3 µL
ADN	Superior a 10 ng µl <sup>-1</sup>	6,0 µL
Agua		c.s.p. 25 µL

**Tabla 4:** Composición de la mezcla de reacción de PCR utilizada. \*Tampón Tris-HCL 50mM. pH: 8.0; NaCl 100mM; EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 0,1mM; DTT 1mM; Glicerol 50%; Tritón X-100 1%. \*\* Biotools ADN polymerase 1000 Units 5 U µl<sup>-1</sup> de Biotools.

La reacción se realizó indistintamente en los termocicladores MiniCycler™ PT-150 (MJ Research, USA), Mastercycler Eppgradient (Eppendorf, USA) y termociclador Mastercycler Eppgradient (Eppendorf, USA).

Los programas utilizados para la amplificación de los marcadores moleculares fueron:

**ITS-1:** 1) 4 minutos a 94°C; 2) 40 segundos a 94°C; 3) 45 segundos a 55°C; 4) 40 segundos a 72°C; 35 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 4 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

**ITS-2 opción a\*:** 1) 4 minutos a 94°C; 2) 40 segundos a 94°C; 3) 45 segundos a 50°C; 4) 40 segundos a 72°C; 30 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 4 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

**ITS-2 opción b\*:** 1) 3 minutos a 94°C; 2) 1 minuto a 94°C; 3) 1 minuto a 52,2°C; 4) 40 segundos a 72°C; 30 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 10 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

**16S:** 1) 5 minutos a 95°C; 2) 1 minuto a 95°C; 3) 1 minuto a 50°C; 4) 1 minuto a 72°C; 35 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 10 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

**ND1 opción a\*:** 1) 3 minutos a 94°C; 2) 30 segundos a 94°C; 3) 1 minuto a 48°C; 4) 2 minutos a 72°C; 35 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 4 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

**ND1 opción b\*:** 1) 30 segundos a 94°C; 2) 30 segundos a 94°C; 3) 45 segundos a 50°C; 4) 1 minuto y 30 segundos a 72°C; 40 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 5 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

**COI:** 1) 2 minutos a 94°C; 2) 1 minuto a 94°C; 3) 1 minuto a 50°C; 4) 3 minutos a 72°C; 30 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 2 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

**Cyt b primera parte del gen:** 1) 3 minutos a 94°C; 2) 1 minuto a 94°C; 3) 45 segundos a 55°C; 4) 1:30 minutos a 72°C; 35 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 7 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

**Cyt b segunda parte del gen:** 1) 3 minutos a 94°C; 2) 1 minuto a 94°C; 3) 1 minuto a 50 °C; 4) 1:30 minutos a 72°C; 35 ciclos repetitivos de los pasos 2 a 4; 5) 10 minutos a 72°C; 6) descenso y mantenimiento a 4°C.

\*En función de la especie y de la calidad del ADN del insecto se escogió un programa u otro. En el caso del ITS-2 la diferencia principal es la temperatura

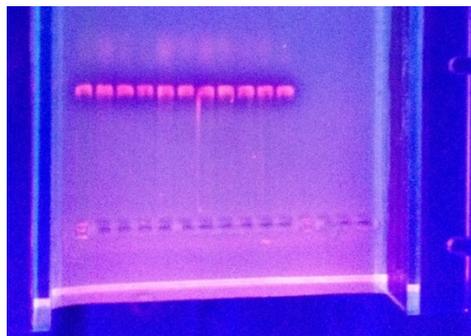
de melting óptima ( $T_m$ ) en función de la especie. En el caso de ND1 en función de la calidad del ADN o de la especie la reacción de PCR se llevaba a cabo en un solo paso (opción a) o en 2 (opción b).

#### 2.2.4 Electroforesis en gel de agarosa

La finalidad de realizar una electroforesis es por una parte, verificar el éxito de la PCR, comparando la movilidad del fragmento amplificado con un control positivo y un fragmento de peso molecular conocido, y por otra, estimar la cantidad aproximada del amplificado obtenido en la reacción de PCR en función de la intensidad de la banda.

Para realizar la electroforesis se prepara un gel de agarosa al 1% en tampón TAE, al que le añade 0,3  $\mu\text{L}$  de una solución de bromuro de etidio de 10 mg/ml. Se carga en cada pocillo 4  $\mu\text{L}$  de muestra previamente mezclada con 2  $\mu\text{L}$  de un tampón de carga a base de glicerina, azul de bromofenol y EDTA. La electroforesis se realiza a 60 W constantes durante 60 minutos.

El resultado de la electroforesis se observa a través de un iluminador ultravioleta (UV) (Figura 17). El bromuro de etidio es un agente intercalante que se une a los fragmentos de ADN y al exponerlo a la luz ultravioleta emite fluorescencia y permite ver las bandas del amplificado.



**Figura 17:** Gel de agarosa visto a través de un iluminador de luz UV. Véanse las bandas de ADN amplificadas con fluorescencia de color rosa.

### 2.2.5 Purificación de los productos de PCR

El objetivo de este paso es obtener una solución concentrada de alta pureza del fragmento amplificado, eliminando los restos de cebadores, nucleótidos, sales, etc.

En la mayoría de los casos se obtenía una sola banda del amplificado y la purificación era llevada a cabo mediante el kit comercial Ultra Clean<sup>®</sup> (MoBio Laboratories, USA), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. El fundamento de este método de purificación es retener el ADN en una membrana de sílice y arrastrar el resto de sustancias presentes en la PCR.

Para realizar la purificación, en primer lugar, se adiciona al producto de PCR una solución de sales de pH adecuado (6-7,5) para retener solamente los fragmentos de ADN mayores a 60 pares de bases (pb) con lo que se eliminan los cebadores, además de los dNTPs, la enzima y los constituyentes del tampón reacción. A continuación, se hace pasar por la membrana una solución de lavado que contiene etanol para eliminar las trazas de sustancias no deseadas o contaminantes que puedan quedar. Por último, el ADN es liberado de la membrana añadiendo tampón Tris 10mM y se conserva congelado a -20°C.

En caso de que en lugar de una banda durante la electroforesis aparecieran dos o más, se procedía a la purificación, directamente en gel de agarosa, de la banda seleccionada de acuerdo con el peso molecular esperado utilizando el kit comercial Ultra Clean<sup>®</sup> 15 DNA Purification kit (From Agarose Gels and Solutions) (MoBio Laboratories, USA), siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante. El fundamento de este método es el mismo que el anterior pero con un paso previo en el que se rompen los enlaces de hidrógeno de la agarosa mediante sales y calor y el ADN liberado es extraído en sílice.

### 2.2.6 Cuantificación y determinación de la pureza del ADN

Tanto la concentración de ADN como su pureza son medidas espectrofotométricamente en una dilución de la muestra al 5% en agua autoclavada.

A partir de la absorbancia a 260nm (nanómetros) de longitud de onda se calcula la concentración de ADN en µg/ml y a 280 nm se determina la pureza de la muestra. La relación  $A_{260}/A_{280}$  se encuentra en torno a 1,8 cuando el ADN es puro. Valores por debajo de 1,6 indican contaminación por proteínas y no es aconsejable la secuenciación en este caso, pues no se obtienen buenos resultados.

### 2.2.7 Clonación de fragmentos de ADN en bacterias de *E. coli* DH5α

En los casos en los que la secuenciación directa de los fragmentos de ADN amplificados dio malos resultados, obteniéndose secuencias con doble señal e imposibles de interpretar, se recurrió a la clonación de estos fragmentos. Este tipo de interferencias en la secuenciación aparecen cuando durante la PCR se amplifican, además de la secuencia correcta, otras secuencias donde los cebadores se unen de forma inespecífica. Para solucionar este problema, se llevó a cabo la clonación en bacterias, que permite obtener la secuencia a partir de una única copia del fragmento de ADN amplificado, eliminando así las interferencias causadas por las amplificaciones inespecíficas.

El protocolo seguido para la clonación consta de las siguientes etapas:

- 1) **Ligación:** El fragmento de ADN amplificado y purificado se introduce en un vector de clonación, en este caso el plásmido comercial Pgem-T (Pgem-T Easy Vector System I, Promega). Siguiendo el protocolo del fabricante se prepara la siguiente mezcla de ligación: 1µl de plásmido (50ng/µl), 5 µl de buffer de ligación (2x), 1-2 µl de ADN (inserto), 1 µl ADN ligasa (3 unidades/µl), agua hasta un volumen total de 10 µl. La reacción de ligación se completa en 2 horas a temperatura ambiente.
- 2) **Transformación:** El proceso de transformación consiste en introducir el vector (el plásmido con el inserto) en células competentes (capaces de captar ADN) de *Escherichia coli* de la cepa DH5α. El método utilizado para la transformación en este caso fue el shock térmico. Para ello, se añaden 100 µl de células competentes a la mezcla de ligación anterior, se mantienen durante 30 minutos en hielo y posteriormente se pasan a 37°C durante 5 minutos, este cambio brusco de temperatura produce el cierre de los poros en la membrana celular de las bacterias, quedando el vector en el interior de las células. A continuación, se añade a las células 1 ml de

medio de cultivo LB líquido y se incuban durante 1 hora a 37°C con agitación ligera para promover su crecimiento, antes de pasarlas a un medio sólido. Una vez transformadas las bacterias se siembran en placas agar LB S-Gal con ampicilina. En este medio solamente son capaces de crecer aquellas bacterias que han captado el plásmido, que contiene un gen de resistencia a la ampicilina. Además, el medio de cultivo LB S Gal es un medio selectivo, ya que contiene galactosa que solamente puede ser metabolizada por aquellas bacterias que contienen el plásmido sin inserto de ADN, puesto que el inserto se introduce dentro de un gen que codifica para una enzima necesaria para la metabolización; como resultado, las colonias que no contienen inserto son de color azul (a causa de un metabolito de la galactosa), mientras que las que sí contienen inserto son de color blanco. Las placas se mantienen durante 24 horas a 37°C.

- 3) **Separación de clones:** A partir de colonias aisladas crecidas en las placas de agar se hacen cultivos en medio LB líquido para obtener mayor cantidad del inserto de ADN. Tras dejarlas crecer durante 24 horas a 37°C, se procede a la extracción del ADN plasmídico de las bacterias mediante un proceso de lisis de las células y posterior purificación que en este caso se llevo a cabo con el kit comercial UltraClean® Estándar Mini Plasmid Prep Kit (MoBio Laboratories, USA). Los purificados quedan listos para la PCR de secuenciación que se describe a continuación (Figura 18).

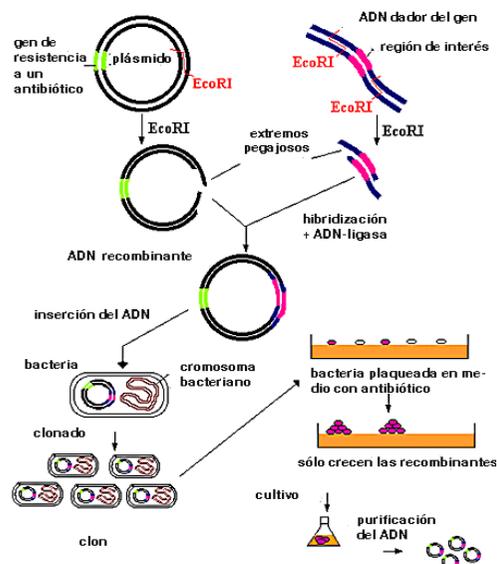


Figura 18: Esquema del proceso de clonación de fragmentos de ADN.

### 2.2.8 Secuenciación del ADN

Las secuencias de bases nitrogenadas correspondientes a los fragmentos de ADN amplificados, purificados y cuantificados se obtienen por un método de secuenciación automática.

La secuenciación de ADN consiste en realizar una PCR con un único cebador, añadiendo a la mezcla de reacción dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con distintos fluoróforos para cada base nitrogenada; al ser incorporados por la polimerasa, estos ddNTPs detienen la síntesis de la cadena en crecimiento, puesto que impiden la adición del siguiente nucleótido. El resultado de la PCR será una colección de fragmentos de diferente longitud terminados en un ddNTP fluorescente. Al someter esta mezcla a una electroforesis capaz de discriminar diferencias de tamaño de un solo nucleótido, es posible detectar mediante un lector de fluorescencia, la secuencia de señales fluorescentes, que se corresponderá con la secuencia de bases nitrogenadas.

Los reactivos utilizados pertenecen al kit comercial Big Dye® Terminator v3.1., la mezcla de reacción se muestra en la Tabla 5:

Mezcla de reacción de PCR de marcaje		
Componente	Concentración	Volumen
<b>Big Dye</b>	*	1 µl
<b>Tampón</b>	*	1,5 µl
<b>Agua</b>		1,5 µl
<b>Cebador</b>	5 µM	1 µl
ADN	**	**
Agua		c.s.p. 10 µl

**Tabla 5:** Composición de la PCR de marcaje. \*Mezcla de reactivos y tampón pertenecientes al kit comercial: Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). \*\* Dependiendo del tamaño del fragmento a secuenciar se requiere una cantidad de ADN determinada, en este caso 1000ng: el volumen añadido dependerá de la concentración de la muestra, con un máximo de 5 µl.

Pueden diferenciarse dos etapas en este proceso en cuanto al lugar de realización, puesto que la PCR se lleva a cabo en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, y la electroforesis y la obtención del cromatograma de la secuencia se realiza en el Servicio de Secuenciación del SCSIE (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental) de la Universitat de València, donde se utiliza el equipo ABI 3730 XL de Applied Biosystems.

### 2.2.9 Análisis de las secuencias

En primer lugar se obtuvo para cada muestra la secuencia consenso de las lecturas de los dos cebadores utilizando el programa informático FinchTV versión 1.5.0 (Geospiza, <http://www.geospiza.com/finchTV>).

El alineamiento y análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa MEGA 7.0 (Kumar *et al.*, 2016), las secuencias del ADN ribosomal se alinearon a mano y las del ADNmt mediante el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 2002). Mediante este programa se comparan las secuencias obtenidas entre ellas y con secuencias extraídas de bases de datos de ADN, los genes codificantes de proteínas se traducen a secuencias aminoacídicas y se calcula la longitud, composición y variabilidad [mutaciones e indels (inserciones y deleciones)] de cada secuencia.

Para identificar las secuencias obtenidas, una vez están limpias y alineadas se lanzan al programa BLAST (*Basic Local Alignmet Search Tool*) de la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica de EEUU (*National Center of Biotechnology Information*, NCBI) (Altschul *et al.*, 1990, 1997; Gish & States, 1993; Madden *et al.*, 1996; Zhang & Madden, 1997; Zhang *et al.*, 2000; Morgulis *et al.*, 2008; Camacho *et al.*, 2008; Boratyn *et al.*, 2012) para que encuentre homologías entre las secuencias introducidas y las depositadas en las bases de datos genéticas.

### 2.2.10 Análisis de genética poblacional

Para el análisis de la variabilidad genética intraespecífica e intrapoblacional de la especie *T. infestans* se han utilizado los siguientes programas: DNAsp v.5.10.1 (Librado & Rozas, 2009); Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier, 2005; Excoffier & Lischer, 2010); Network v.4.6 (Fluxus Technology Ltd., <http://www.fluxus-engineering.com>); y PopART (<http://www.popart.otago.ac.nz>).

El programa DNAsp v.5.10.1 (Librado & Rozas, 2009) se ha utilizado para el cálculo de los parámetros  $H_d$  (diversidad haplotípica) (Nei, 1987),  $\pi$  (diversidad nucleotídica expresada como el número medio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias) (Nei, 1987),  $k$  (media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias) (Tajima, 1983) y  $S$  (número de sitios segregantes, lugares polimórficos).

#### 2.2.10.1 Test de neutralidad

Para determinar la historia demográfica de la población se realizaron test de neutralidad. De esta forma se puede determinar si la población se encuentra en una situación de deriva genética, equilibrio o está de acuerdo a lo esperado según la teoría neutral (Kimura, 1983). La hipótesis nula o teoría neutral afirma que la evolución de una población es debida fundamentalmente a mutaciones y no a cambios adaptativos de las secuencias. La probabilidad de reemplazo de un nucleótido por otro en una secuencia solo depende de la tasa de mutación, jugando la selección un papel minoritario y reservado a la eliminación de variantes deletéreas (Kimura, 1968).

Mediante el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier, 2005; Excoffier & Lischer, 2010) se calcularon los test de neutralidad:  $D$  de Tajima (*Tajima's D*) (Tajima, 1989) y  $F_s$  de Fu (*Fu's S*) (Fu, 1997).  $D$  de Tajima se basa en las diferencias entre la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y los sitios segregantes. En una situación de evolución neutral (sin selección, ni recombinación, ni subdivisión poblacional y sin cambios en el tamaño poblacional) el valor  $D$  de Tajima será igual a cero. Si  $D$  presenta valores positivos es indicativo de una selección positiva, equilibradora o una reducción del tamaño poblacional. Si  $D$  presenta

valores negativos es indicativo de que la muestra está sufriendo una expansión poblacional tras una situación de cuello de botella. Fu de Fu (Fu, 1997) utiliza la información de la distribución de la frecuencia haplotípica en la muestra. El test calcula la probabilidad de observar una muestra aleatoria con un número de *singletons* igual o inferior a los observados con un nivel de diversidad dado. El test se basa en el modelo de mutaciones infinitas, y asume que todos los alelos son selectivamente neutros. Valores negativos de F son causados por un exceso de *singletons* debido a un evento de expansión poblacional. Valores positivos de F indican un déficit de *singletons*, debido a un reciente cuello de botella o a una selección dominante (Ramos-Onsins & Rozas, 2002; Joyce *et al.*, 2003; Holsinger, 2010).

#### 2.2.10.2 Análisis de varianza molecular AMOVA

Los análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), fueron obtenidos mediante el programa Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier, 2005; Excoffier & Lischer, 2010). Estos análisis incorporan información de la divergencia haplotípica como un análisis de la varianza derivada de una matriz de distancia genética entre todos los pares de haplotipos. El AMOVA permiten observar la estructura genética de la población, estimar el porcentaje de variación asociado a cada nivel poblacional y determinar los índices de fijación ( $\Phi$ ) Weir & Cockerham (1984) que reflejan la correlación entre la diversidad haplotípica y los diferentes niveles de subdivisión jerárquica:  $\Phi_{CT}$  (asociado a la variación de los individuos entre los grupos),  $\Phi_{ST}$  (asociada con la variación de individuos dentro de poblaciones), y  $\Phi_{SC}$  (asociada a la variación entre poblaciones) (Holsinger & Weir, 2009) con una significancia estadística de 1.000 permutaciones, para cada uno de los índices. Los individuos se estructuraron jerárquicamente en tres niveles de mayor a menor tamaño: i) en el primer nivel se dividen en dos grandes grupos según su procedencia geográfica; ii) en el segundo nivel se dividen en países; y iii) en el tercer nivel se estudian los individuos dentro de cada población.

### 2.2.10.3 Redes de haplotipos

La construcción de la red de haplotipos (*Network*) se llevó a cabo mediante el método *Median-Joining* (Bandelt *et al.*, 1999) utilizando los programas *Network v.4.6* (Fluxus Technology Ltd., <http://www.fluxus-engineering.com>) y el programa *PopART* (<http://www.popart.otago.ac.nz>). Las redes se construyen para representar las relaciones dentro de una especie (Posada & Crandall, 2001). Estos programas permiten elaborar mediante parsimonia estadística redes filogenéticas a partir de secuencias de ADN o de matrices de distancias nucleotídicas, estimando el máximo número de diferencias entre haplotipos como resultados de sustituciones individuales con un 95% de confianza.

### 2.2.11 Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos para especies y haplotipos del género *Panstrongylus* se llevaron a cabo sobre conjuntos de datos o matrices en las que se combinan varios genes y/o marcadores. Las matrices que se conformaron para los análisis fueron: 1) solo genes mitocondriales (16S, ND1, COI y *Cyt b*); 2) solo genes nucleares (ITS1, ITS2); 3) mixta con los marcadores ITS2 y *Cyt b*, la cual nos permitiría comparar nuestros resultados con los obtenidos anteriormente (Sempertegui-Sosa, 2012); y una última matriz con toda la información nucleotídica obtenida en este trabajo de genes nucleares y mitocondriales (ITS-1, ITS-2, 16S, ND1, COI, *Cyt b*).

Puesto que se utilizaban matrices combinadas de varios marcadores, se consideró la utilización de varias particiones, con la posibilidad de que cada una de ellas tuviera sus propias tasas evolutivas, frecuencias y/o posiciones invariables. Para poder elegir las opciones más adecuadas para el estudio de estas matrices de datos, utilizamos el programa *PartitionFinder 2* (Lanfear *et al.*, 2016) que valora cual el esquema de particiones que mejor se ajusta a los datos obtenidos para cada partición en función de los criterios AIC (*Akaike Information Criterion*) (Akaike, 1973), AICc (*corrected Akaike Information Criterion*) (Hurvich & Tsai, 1993) o BIC (*Bayesian Information*

*Criterion*) (Schwartz, 1978). Las combinaciones de datos que se le dieron al programa fueron:

- i. Todos los marcadores y genes juntos: (ITS-1, ITS-2, 16S, ND1, COI, Cyt *b*)
- ii. Todos los marcadores y genes por separado: (ITS-1) (ITS-2) (16S) (ND1) (COI) (Cyt *b*)
- iii. Marcadores nucleares juntos por un lado (ITS-1, ITS-2) y genes mitocondriales juntos por otro (16S, ND1, COI, Cyt *b*)
- iv. Marcadores nucleares separados (ITS-1) (ITS-2) y genes mitocondriales juntos (16S, ND1, COI, Cyt *b*)
- v. Genes nucleares juntos (ITS-1, ITS-2) y mitocondriales separados (16S, ND1, COI, Cyt *b*)

Para la reconstrucción filogenética se utilizaron métodos probabilísticos basados en caracteres como son el de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) (MV) (Edwards *et al.*, 1964; Felsenstein, 1981) y el de inferencia Bayesiana (IB) (Swofford *et al.*, 1996; Holder & Lewis, 2003). Estos métodos tienen en cuenta los cambios que ocurren en cada posición del alineamiento, y hacen por tanto, un uso más eficiente de la información (Swofford *et al.*, 1996).

El método MV trata de inferir la historia evolutiva más probable utilizando el modelo evolutivo más adecuado en cada matriz. El principio MV se define como la probabilidad de que un modelo de evolución dado (en este caso de nucleótidos) y una historia evolutiva hipotética (el árbol) hayan dado lugar a los datos observados (alineamiento de secuencias) (Felsenstein, 1981). El árbol MV es aquel que tiene la mayor probabilidad de haber generado los datos observados y, por tanto, se prefiere como hipótesis filogenética. Para asegurar que el árbol generado es el de máxima verosimilitud se realizan 1.000 búsquedas heurísticas mediante el método *Bootstrap* para así, explorar de forma más eficiente el conjunto de árboles posibles. Para el cálculo de la verosimilitud total del árbol primero, se calcula la verosimilitud de forma independiente para cada posición del alineamiento y después, se suman los logaritmos de las verosimilitudes para cada sitio (Huelsenbeck & Crandall, 1997). Para la obtención del árbol MV se utilizó el programa RAxML v8.1.7 (*Randomized Axelerated Maximum Likelihood*) (Stamatakis, 2014) al cual se le introducen las particiones y el modelo evolutivo óptimo dado por el programa PartitionFinder 2 (Lanfear *et al.*, 2016).

La IB en filogenia se obtiene mediante en el cálculo de la probabilidad posterior de un árbol, esto es, la probabilidad de que dicho árbol sea correcto dados unos datos y un modelo. Para la IB se utilizan algoritmos MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) para obtener una aproximación de la distribución de probabilidad posterior, parten de un árbol al azar y realizan cierto número de visitas a árboles concretos (Hastings, 1970). Los algoritmos MCMC modifican ligeramente una de las variables del árbol inicial y evalúan el nuevo árbol, el cambio se acepta o se rechaza en función del valor de la razón entre las probabilidades posteriores de los estados actual y anterior. Tras un tiempo suficiente, se espera que la cadena MCMC muestree cada valor de topologías, longitudes de rama y parámetros del modelo un número de veces proporcional a su probabilidad posterior. Para realizar el árbol IB se utilizó el programa MrBayes (Ronquist *et al.*, 2009) que implementa cuatro cadenas MCMC para calcular el soporte estadístico y para evitar que las cadenas se queden en máximos locales y asegurar así que el árbol generado sea el que de la probabilidad posterior más elevada.

Una vez obtenidos los árboles de MV e IB, para poder ser visualizados y editados, se utilizó el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Capítulo 3. Caracterización  
genética de *Triatoma*  
*infestans* de Perú



### 3.1 Características generales de *T. infestans*

*T. infestans* conocido comúnmente en Perú con el nombre de Chirimacha (Herrer, 1955), que en el vocablo quechua significa borracho por el frío (Guevara *et al.*, 2011), es el vector de la enfermedad de Chagas considerado responsable de la mitad de los casos humanos en todo el mundo, ya que es la especie mejor adaptada al ambiente doméstico (Lent & Wygodzinsky, 1979; Bargues *et al.*, 2006) (Figura 19).



**Figura 19:** Hembra adulta de *Triatoma infestans*.

#### 3.1.1 Origen y dispersión

*T. infestans* fue citado por primera vez en Bolivia. Los Doctores Torrico y Dias (1943) citan como Artur Neiva en 1916 describió “vinchucas”, infectadas la mayoría de ellas por flagelados, en el departamento de Potosí (en los Andes Bolivianos). Torrico y Dias (1943) expusieron que estos triatominos hallados en Bolivia eran *T. infestans* y los describieron además, como los insectos domésticos más ampliamente difundidos en el país, especialmente en los ranchos rurales (Torrico & Angel, 1950). La abundancia de *T. infestans* en los domicilios de Bolivia era tal, que en treinta minutos tres personas fueron capaces de capturar en un solo punto 1.628 parásitos de todos los estadios (Torrico y Dias (1943).

Existen 2 hipótesis sobre el origen geográfico de *T. infestans*, ambas lo sitúan en Bolivia aunque difieren en el área concreta. La hipótesis clásica lo sitúa en los Andes y la más reciente, lo sitúa en el Chaco (Figura 20).



**Figura 20:** Mapa de Bolivia en el que aparecen marcados con puntos los orígenes geográficos propuestos para la especie *Triatoma infestans*. En azul, se marcan los puntos pertenecientes a los valles de Cochabamba (Andes) origen propuesto por la hipótesis clásica y en rojo, se marca el Chaco Boliviano lugar de origen según la nueva hipótesis (Noireau *et al.*, 2005).

La hipótesis clásica sitúa el origen de la especie en los valles de Cochabamba que se localizan en los Andes Bolivianos (Usinger *et al.*, 1966; Noireau *et al.*, 1999, 2005; Panzera *et al.*, 2004; Barges *et al.*, 2006), ya que en esta zona fueron descritas por primera vez poblaciones silvestres de *T. infestans* en pilas de rocas asociadas a cerdos guineanos (*Galea musteloides*) (Torrico, 1946); y porque existen diversos trabajos que apoyan la teoría utilizando diferentes herramientas: isoenzimáticas (Dujardin *et al.*, 1998), cromosómicas (Noireau *et al.*, 1999) citogénesis (Panzera *et al.*, 2004; Barges *et al.*, 2006), secuenciación del ADN ribosomal (Barges *et al.*, 2006) y secuenciación del ADN mitocondrial (Waleckx *et al.*, 2011).

La hipótesis que sitúa el origen en el Chaco Boliviano surgió en 1.997 como consecuencia del descubrimiento, por primera vez en la zona, de poblaciones silvestres de *T. infestans* (Waleckx *et al.*, 2011) en el departamento de Santa Cruz (Dujardin *et al.*, 1998; Giordano *et al.*, 2005; Piccinalli *et al.*, 2009; Quisberth *et al.*, 2011; Torres-Perez *et al.*, 2011) además de en otros puntos del Chaco Argentino, Paraguay y en el norte de la Región Metropolitana de Chile (Carvalho *et al.*, 2000; Bacigalupo *et al.*, 2006, 2010; Ceballos *et al.*, 2009; Cortez *et al.*, 2009; Rolon *et al.*, 2011, Torres-Pérez *et al.*, 2011; Waleckx *et al.*, 2011). De acuerdo con la teoría evolutiva, en el Chaco se localizan especies estrechamente relacionadas con *T. infestans* como *T. platensis* y *T. delpontei* y por ello, es probablemente el origen de la especie. Existen además, estudios de

secuenciación del ADN mitocondrial (Giordano *et al.*, 2005; Piccinali *et al.*, 2009) a favor del origen en el Chaco. Los puntos en contra de esta teoría argumentan que las poblaciones silvestres encontradas podrían derivar de otras Andinas, puesto que la gran degradación ambiental de los Andes somete a las especies a procesos selectivos y demográficos y en el Chaco, las especies están más protegidas. Además, el gran número de haplotipos encontrados en el Chaco puede ser consecuencia de que históricamente las poblaciones en esta zona fueran más numerosas (Waleckx *et al.*, 2011).

Desde Bolivia se generaron dos grupos de *T. infestans* genéticamente diferentes: el grupo Andino y el no-Andino. Para el grupo Andino se propuso que su origen se localizaba en los Andes Bolivianos y de allí habría difundido al norte de Chile y al sur de Perú; para el grupo no-Andino se propuso que su origen se localizaba en el Chaco Boliviano desde donde habría difundido a Argentina, Chile, Uruguay, Brasil y Paraguay (Dujardin *et al.*, 1998; Noireau *et al.*, 1999; Panzera *et al.*, 2004; Barges *et al.*, 2006; Torres-Pérez *et al.*, 2011; Waleckx *et al.*, 2011).

La domiciliación de *T. infestans* es un fenómeno de adaptación reciente, desde que los humanos pasaron a formar parte del Nuevo Mundo (hace unos 12.000 años aproximadamente). Se ha sugerido que la expansión de esta especie tuvo lugar en dos pasos. Primero, los Incas e incluso tribus anteriores facilitaron la dispersión pasiva en las regiones Andinas, gracias a sus asentamientos y a la domesticación de animales como el cerdo guineano (Figura 21) (fuente de alimentación principal de los *T. infestans* silvestres) (Monteiro *et al.*, 1999; Noireau *et al.*, 2005; Mas-Coma & Barges, 2009). Segundo, la mayor expansión de esta especie probablemente tuvo lugar en el periodo post-Colombino, después del siglo XVII, cuando los pioneros migraron hacia el interior y comenzaron a trabajar las tierras para su supervivencia. Esta expansión ha continuado hasta casi la actualidad con datos de la llegada de *T. infestans* a Uruguay a principios del siglo XX, a Bahía (Brasil) sobre 1.970 y al resto del nordeste brasileño sobre 1.980 (Panzera *et al.*, 2004; Barges *et al.*, 2006).



**Figura 21:** Cerdos guineanos (*Galea musteloides*). A) Granja doméstica de cerdos guineanos Fuente: <http://www.ipsnews.net>. B) Brochetas de cerdo guineano plato típico de Cusco Fuente: <http://www.pinterest.com>

### 3.1.2 Morfología y biología

*T. infestans* es un insecto alado en su estado adulto y puede dispersarse activamente caminando o volando, en distancias cortas (menores a 2 kilómetros) en las que ambos procesos se superponen. A pesar de ello, no utiliza el vuelo como medio ordinario de locomoción y su difusión es llevada a cabo de manera pasiva (Herrer, 1955; Dujardin *et al.*, 1998; Foley *et al.*, 2013). Normalmente, solo los adultos en bajo estado nutricional, o cuando no tienen acceso a fuentes sanguíneas, usan el vuelo como mecanismo de dispersión. Su hábitat se limitaba a zonas rurales pero los entornos creados por el rápido desarrollo de las áreas urbanas, las migraciones de personas desde las zonas rurales a la periferia de las ciudades, junto con el transporte de objetos generan nuevos hábitats para estos insectos, en los que encuentran refugio y abundantes fuentes de sangre por parte de animales domésticos y humanos. Ayudado por las actividades antropogénicas, *T. infestans* puede recorrer distancias mucho más largas que si fuera caminando o volando (Foley *et al.*, 2013). Por todo esto, se considera que la enfermedad de Chagas se está urbanizando (Náquira, 2014). Los alrededores de ciudades como Arequipa (la segunda ciudad más grande de Perú) son idóneos para la expansión de las poblaciones de este vector (Foley *et al.*, 2013). Las colonias silvestres se encuentran en pilas de rocas, en asociación con cerdos guineanos y pequeños mamíferos como comadrejas (Noireau *et al.*, 1999).

La combinación de la dispersión activa y pasiva puede afectar a la estructura poblacional del vector, creando patrones de diversidad genética menos correlacionados con distancias geográficas y más relacionados con las vías usadas en este tipo de dispersión (Foley *et al.*, 2013).

La distribución de *T. infestans* a mediados de los 80 era realmente amplia, cubría prácticamente todo Bolivia, el suroeste de Perú, Chile, Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. En la actualidad, se ha visto drásticamente reducida, debido a las intervenciones llevadas a cabo por campañas de control vectorial a gran escala (Bargues *et al.*, 2006). El mayor obstáculo con el que se han topado estas campañas a la hora de eliminar *T. infestans* son las poblaciones peridomésticas ya que los insecticidas piretroides, con los que se tratan las zonas afectadas, en estos ecotopos son menos efectivos. Sin embargo, aprovechando que esta especie se encuentra casi exclusivamente domiciliada, las campañas de control han conseguido reducir e incluso erradicar la transmisión de la enfermedad de Chagas, a través de estos vectores, en algunos países de la Iniciativa Cono Sur (Noireau *et al.*, 2005).

### 3.1.3 Estudios genéticos previos

*T. infestans* se incluye dentro del subcomplejo *infestans* junto a *T. platensis*, *T. delpontei* y *T. melanosoma* (Dujardin *et al.*, 2000). Estas especies suelen habitar nidos de diversas aves. *T. platensis* se encuentra en Paraguay, Uruguay y Argentina y es muy probable que se cruce con *T. infestans* en gallineros. *T. delpontei* no tiene relevancia en la transmisión de la enfermedad de Chagas, se encuentra en Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. *T. melanosoma*, fue descrito originalmente como una subespecie de *T. infestans*, después adquirió el rango de especie y recientemente, se ha sinonimizado con *T. infestans*. Ha sido encontrado exclusivamente en Argentina, difiere de *T. infestans* solamente en el color negro de su exoesqueleto. Un patrón similar de color al que ha sido descrito para *T. infestans* dark morph, que se encuentra principalmente en huecos de árboles del Chaco Boliviano (Bargues *et al.*, 2006).

*T. infestans* tiene 22 cromosomas con un contenido variable en DNA haploide. Estas variaciones se deben a diferencias en la cantidad de heterocromatina-C (Bargues *et al.*, 2006), lo que ha permitido hallar variaciones intra e interpoblacionales en esta especie (Guevara *et al.*, 2011). Actualmente,

mediante especiación alopátrica se distinguen 3 grupos cromosómicos en función de la altitud de la que proceden (Panzera *et al.*, 2004; Guevara *et al.*, 2011). Para esta especie se distinguen: i) El grupo Andino compuesto por poblaciones de Bolivia, Perú y Chile (Torres-Pérez *et al.*, 2011), los cuales poseen bloques de heterocromatina-C presentando de 14 a 20 cromosomas heterocromáticos y con un contenido en ADN superior al resto; ii) el grupo no-Andino compuesto por poblaciones de Argentina, Paraguay, Brasil, Uruguay y Bolivia, los cuales poseen entre 4 y 7 cromosomas con banda de heterocromatina-C es decir, menor contenido en ADN por célula (Bargues *et al.*, 2006); iii) y el grupo intermedio, en un área restringida y bien marcada geográficamente situada en el extremo norte de Argentina (en la provincia de Salta) y el sur de Bolivia (en el departamento de Tarija) con bloques de heterocromatina-C presentes entre 7 y 11 de sus cromosomas (Panzera *et al.*, 2007; Guevara *et al.*, 2011). La mayoría de los autores agrupan a los *T. infestans* en los dos primeros grupos. Se ha sugerido que estas diferencias heterocromáticas son las responsables de una variación de aproximadamente el 30% del contenido del ADN entre estos grupos (Panzera *et al.*, 2004). A pesar de esto, los individuos de todas las poblaciones parece que hibridan normalmente y generan descendencia fértil (Bargues *et al.*, 2006).

La diversidad genética dentro de la especie *T. infestans* se puede medir utilizando minisatélites como marcadores. Estos se distribuyen de forma abundante en regiones codificantes y no codificantes del genoma y permiten obtener resultados reproducibles. La determinación de minisatélites en *T. infestans* permite distinguir el origen silvestre, peridoméstico o doméstico y estudiar la reinfestación tras el rociamiento con insecticida (García *et al.*, 2004, 2013; Bargues *et al.*, 2006; Marcet *et al.*, 2006, 2008; Harry *et al.*, 2008, 2009; Pérez de Rosas *et al.*, 2008, 2013; Foley *et al.*, 2013; Khatchikian *et al.*, 2015; Piccinalli & Gürtler, 2015; Belisário *et al.*, 2017).

## 3.2 Distribución actual de *T. infestans* en Perú

La distribución actual en Perú de *T. infestans* se limita al sureste del país afectando a los departamentos de Lima, Ica, Ayacucho, Apurímac, Arequipa, y

Moquegua, no se incluye Tacna puesto que no ha sido detectado en las últimas colectas en el campo realizadas por expertos de este departamento (Cabrera *et al.*, 2002; Cáceres *et al.*, 2002; Cuba *et al.*, 2002; Chávez, 2006; Cabrera, 2006; Náquira & Cabrera, 2009) (Figura 22).

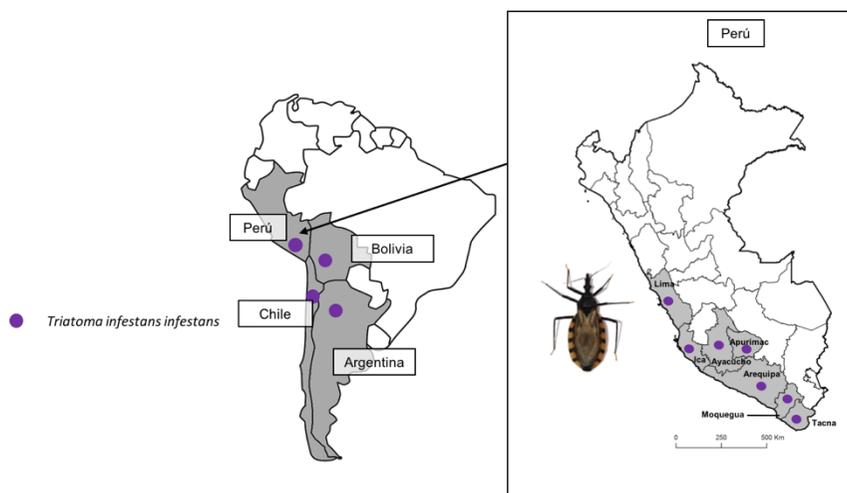


**Figura 22:** Mapa político de Perú en el que aparecen marcados en color gris los departamentos en los que se encuentra actualmente *Triatoma infestans*.

Los departamentos de Tacna y Moquegua han sido considerados libres de transmisión vectorial por la Organización Panamericana de la Salud, aunque en Moquegua se siguen encontrando ejemplares de *T. infestans*. En Arequipa, la transmisión vectorial además de producirse en los núcleos rurales, tiene lugar en las ciudades, principalmente en la ciudad de Arequipa (Bowman *et al.*, 2008; Bayer *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2013; Barbu *et al.*, 2014; Náquira, 2014; Khatchikian *et al.*, 2015). En la ciudad de Lima también se han observado *T. infestans* (Cuba *et al.*, 2002) si bien hasta la fecha no se ha registrado ningún caso humano transmisión de Chagas (RENACE, 2017). Actualmente, *T. infestans* es el único vector de la enfermedad de Chagas encontrado en los departamentos de Apurímac e Ica, con una distribución exclusiva en zonas rurales (Solis *et al.*, 1997), en Lima y Ayacucho comparte distribución con otros vectores de los géneros *Panstrongylus* y *Rhodnius* (Cabrera, 2006; Chávez, 2006).

### 3.3 Procedencia geográfica de los especímenes de *T. infestans* estudiados

Se han analizado un total de 127 ejemplares de *T. infestans* de los cuales 113 proceden de Perú; con fines comparativos se han analizado también 12 ejemplares de Bolivia, 2 de Argentina y 2 de Chile. Los ejemplares de Perú proceden de domicilios y peridomicilios y fueron colectados en los departamentos de Ica, Ayacucho, Apurímac, Arequipa, Moquegua y Tacna; cuyas altitudes van desde los 432 a los 2.979 metros. El resto de *T. infestans* proceden de domicilios y peridomicilios, excepto una de las muestras de Bolivia que es silvestre (Figura 23). Los datos sobre la localización exacta de las muestras se incluyen en la tabla (Tabla 3) del capítulo 2 Material y métodos.



**Figura 23:** Mapa de la distribución geográfica de los ejemplares de *Triatoma infestans* estudiados. Aparece a la izquierda la procedencia por países de los insectos en América del Sur y a la derecha, la procedencia por departamentos en Perú.

## 3.4 Objetivos

### 3.4.1 Objetivo general

El presente capítulo tiene como objetivo general la caracterización a nivel molecular de la especie *T. infestans* en Perú y en América del Sur mediante la secuenciación y análisis de los marcadores moleculares del ADNr nuclear (ITS-1, 5.8S e ITS-2) y del ADNmt (16S, ND1, COI y Cyt *b*).

### 3.4.2 Objetivos específicos

- Estudiar la distribución geográfica actual del vector *T. infestans* en Perú por diversos niveles altitudinales y departamentos.
- Estudiar la epidemiología de la especie *T. infestans* en Perú.
- Estudiar la historia demográfica y la distribución geográfica actual de *T. infestans* en América del Sur.
- Creación de una base de datos unificada de haplotipos de *T. infestans*.
- Estudiar la genética poblacional de *T. infestans* para poder enfocar las campañas de control y frenar su expansión y colonización de nuevos ecotopos.

## 3.5 Resultados moleculares de los especímenes de Perú

### 3.5.1 Resultados obtenidos en el estudio del ADN nuclear ribosomal (ADNr)

#### 3.5.1.1 Análisis del ITS-1 del ADNr

El análisis de las secuencias obtenidas del marcador ITS-1 de los 113 especímenes de *T. infestans* de Perú estudiados ha permitido obtener un único haplotipo: T.inf-HA [longitud: 673 pares de bases (pb); 65,8% de composición en Adenina y Timina (AT)], idéntico 100% al haplotipo AJ576051 publicado en la base de datos de secuencias genéticas *GenBank* por Bargues y colaboradores (2006). No se han encontrado diferencias ni en el estudio por departamentos de Perú, ni por altitudes geográficas desde los 432 a los 2.979 metros sobre el nivel del mar.

#### 3.5.1.2 Análisis del ITS-2 del ADNr

El análisis de las secuencias obtenidas del marcador ITS-2 de los 113 especímenes de *T. infestans* de Perú estudiados ha permitido obtener un único haplotipo: T.inf-H1 (longitud: 476 pb; 77,7% AT), idéntico 100% al haplotipo AJ576051 publicado en *GenBank* por Bargues y colaboradores (2006). No se han encontrado diferencias ni en el estudio por departamentos de Perú, ni por altitudes geográficas desde los 432 a los 2.979 metros sobre el nivel del mar.

### 3.5.1.3 Análisis de la región intergénica completa (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr

El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica completa del ADNr que engloba los dos marcadores transcritos internos ITS-1 e ITS-2 y el gen 5.8S de los 113 especímenes de *T. infestans* de Perú estudiados ha permitido obtener un único haplotipo T.inf-CH1A (longitud:1.304 pb; 67,4% AT), idéntico 100% al haplotipo AJ576051 publicado en *GenBank* por Bargues y colaboradores (2006). En esta región el ITS-1 va desde la base 1 a la 700; el gen 5.8S desde la 701 hasta la 855; y finalmente, el ITS-2 desde la 856 hasta la 1.304. No se han encontrado diferencias ni en el estudio por altitudes geográficas desde los 432 a los 2.979 metros sobre el nivel del mar, ni en el estudio por departamentos de Perú.

## 3.5.2 Resultados obtenidos en el estudio del ADN mitocondrial (ADNmt)

### 3.5.2.1 Análisis del gen ribosomal 16S del ADNmt

El análisis de las secuencias obtenidas del gen ribosomal 16S componente de la subunidad 30S de los ribosomas de los 113 especímenes de *T. infestans* de Perú estudiados ha permitido obtener un único haplotipo: T.inf-16S.A (longitud: 543 pb; 68,7% AT). No se han encontrado diferencias ni en el estudio por departamentos de Perú, ni por altitudes geográficas desde los 432 a los 2.979 metros sobre el nivel del mar..

### 3.5.2.2 Análisis del gen ND1 del ADNmt

El análisis de las secuencias obtenidas del gen ND1 de los 113 especímenes de *T. infestans* de Perú estudiados ha permitido obtener un único haplotipo nucleotídico T.inf-ND1.CH1ABC (longitud: 912 pb; 68,6% AT), idéntico 100% al haplotipo AM980622 publicado en *GenBank* por Mas-Coma y

Bargues (2009). Este gen codifica para el haplotipo aminoacídico T.inf-ND1.I [longitud: 303 aminoácidos (Aa)]. No se han encontrado diferencias ni en el estudio por departamentos de Perú, ni por altitudes geográficas desde los 432 a los 2.979 metros sobre el nivel del mar.

### 3.5.2.3 Análisis del gen COI del ADNmt

El análisis de las secuencias obtenidas del gen COI de los 113 especímenes de *T. infestans* de Perú estudiados han permitido obtener dos haplotipos nucleotídicos: T.inf-COI.a (longitud: 699 pb; 59,4% AT) en el 71,4% de las muestras y T.inf-COI.b (longitud: 699 pb; 59,4% AT) en el 28,6%, con una mutación entre ellos. Estos haplotipos nucleotídicos codifican para los haplotipos aminoacídicos T.inf-COI.I (longitud: 233 Aa) y T.inf-COI.II (longitud: 233 Aa), respectivamente. En el estudio por departamentos y altitudes T.inf-COI.a se encuentra en Ayacucho, Ica y Moquegua con una amplia distribución altitudinal que va desde los 432 a los 2.919 metros; y T.inf-COI.b se localiza en el sur en los departamentos de Arequipa y Moquegua, donde coexisten ambos haplotipos, y su distribución altitudinal se limita de los 1.617 a los 2.576 metros sobre el nivel del mar (Tabla 6).

Gen COI de <i>T. infestans</i>					
Haplotipos nucleotídicos/aminoacídicos del gen COI	Longitud pb	%AT	Posiciones variables nucleotídicas	Longitud Aa	Posiciones variables aminoacídicas
			4 5 2		1 5 1
T.inf-COI.a / T.inf-COI.I	699	59,4	G	233	R
T.inf-COI.b / T.inf-COI.II	699	59,4	A	233	H

**Tabla 6:** Alineamiento de las posiciones variables de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del gen COI halladas en el estudio de *Triatoma infestans* de Perú. Aparecen indicadas las longitudes de los haplotipos nucleotídicos [pares de bases (pb)] y de los aminoacídicos (Aa) y la proporción en Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas.

### 3.5.2.4 Análisis del gen *Cyt b* del ADNmt

El análisis de las secuencias obtenidas del gen *Cyt b* de los 113 especímenes de *T. infestans* de Perú estudiados ha permitido obtener por primera vez un único haplotipo nucleotídico del gen completo T.inf-Cytb.a (longitud: 1.134 pb; 65,2% AT). Este gen codifica para el haplotipo aminoacídico T.inf-Cytb.I (longitud: 377 Aa). No se han encontrado diferencias ni en el estudio por departamentos de Perú, ni por altitudes geográficas desde los 432 a los 2.979 metros sobre el nivel del mar.

### 3.5.2.5 Análisis de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 del ADNmt

Se ha obtenido por primera vez en *T. infestans* la región intergénica del ADNmt que separa los genes *Cyt b* y ND1. El análisis de las secuencias obtenidas de los 113 especímenes de *T. infestans* de Perú estudiados ha permitido obtener por primera vez dos regiones: T.inf-ARnt.a (longitud: 160 pb; 74,4% AT) en el 79,3% de los insectos y T.inf-ARnt.b (longitud: 160 pb; 75% AT) en el 20,7% de los insectos. En el estudio por departamentos y altitudes T.inf-ARnt.a se localiza en Arequipa, Ayacucho, Apurímac e Ica desde los 432 a los 2.979 metros. T.inf-ARnt.b tiene una distribución más limitada puesto que se encuentra en Moquegua y Arequipa, desde los 1.439 a los 2.576 metros sobre el nivel del mar (Tabla 7).

Región intergénica ARnt del ADNmt que separa los genes <i>Cyt b</i> y ND1 de <i>T. infestans</i>			
Haplotipos nucleotídicos	Longitud pb	%AT	Posiciones variables nucleotídicas
			1 241 121
T.inf-ARnt.a	160	74,4	CGT
T.inf-ARnt.b	160	74,5	TAC

**Tabla 7:** Alineamiento de las posiciones variables de las regiones intergénicas ARnt del ADNmt halladas en el estudio de *Triatoma infestans*. Aparecen indicadas la posiciones de las mutaciones nucleotídicas encontradas.

En total, para cada uno de los 113 especímenes estudiados de *T. infestans* de Perú se han obtenido tres marcadores del ADNr (ITS-1, ITS-2 y el gen 5.8S) y cinco marcadores del ADNmt, dos de los cuales son genes completos (ND1 y *Cyt b*), dos son parciales o incompletos (16S, COI) y una región intergénica (ARNt) (Tabla 8). Los resultados obtenidos del análisis del ADN ribosomal y mitocondrial de todos los especímenes de *T. infestans* estudiados se detallan en el ANEXO I y ANEXO II.

Gen mitocondrial	Longitud (pb)	Dirección de lectura	Codón de inicio	Codón de parada
<b>Cyt b</b>	1.134	F	ATG	TAG
<b>ARNt</b>	*160	F	TCA	*
<b>ND1</b>	912	R	ATA	TAA

**Tabla 8:** Genes mitocondriales completos y la región de ARNt que los separa obtenidos en el presente estudio de *Triatoma infestans* de Perú. El orden de aparición se basa en el orden que tienen en el ADN mitocondrial. La dirección de lectura F= del inglés *forward* se refiere a la lectura del extremo 5' al 3' y R= del inglés *reverse* se refiere a la lectura 3' a 5'. (\*) El número exacto de nucleótidos de esta secuencia no se puede determinar puesto que se superpone con el gen siguiente (ND1).

Hasta la fecha no se ha obtenido ningún espécimen de *T. infestans* silvestre en Perú. Los ejemplares hallados en el departamento de Tacna debido a que son antiguos (del año 1.989 y 1.990) no se ha podido obtener ninguna secuencia. Tacna fue declarado libre de transmisión vectorial y actualmente no se encuentran ejemplares de *T. infestans* en este departamento.

## 3.6 Resultados moleculares de especímenes de Bolivia, Argentina y Chile

### 3.6.1 Resultados obtenidos en el estudio del ADNr

#### 3.6.1.1 Análisis del ITS-1 del ADNr

El análisis de las secuencias obtenidas del ITS-1 de los 12 especímenes *T. infestans* de Bolivia estudiados ha permitido obtener 3 haplotipos: T.inf-HA (longitud: 673 pb; 65,8% en AT), T.inf-HB (longitud: 692 pb; 65,75% AT) y T.inf-HC (longitud: 699; 66,1% AT). Estos haplotipos son idénticos a los publicados en *GenBank* por Bargues y colaboradores (2006) como: AJ576051, AJ582024 y AJ582025. El análisis de las secuencias obtenidas del ITS-1 de los especímenes de Argentina y Chile ha permitido obtener un haplotipo T. inf-HA, el mismo que ha sido encontrado en Bolivia y Perú.

Dentro del ITS-1 se observan minisatélites compuestos por secuencias de 10 nucleótidos denominadas  $\alpha$  (CCGCAAAGAC) y por secuencias de 15 nucleótidos denominadas  $\beta$  (TAAATAAAATAAAAA) que se repiten a partir de la posición 153, alternándose regularmente y separándose por un nucleótido. El haplotipo T.inf-HA posee 2 repeticiones  $\alpha$  y 2  $\beta$ , el haplotipo T.inf-HB posee una repetición de cada minisatélite y el haplotipo T.inf-HC posee 4 repeticiones de  $\alpha$  y 3 de  $\beta$  (Tabla 9).

#### 3.6.1.2 Análisis del ITS-2 del ADNr

El análisis de las secuencias obtenidas del ITS-2 de los 12 especímenes *T. infestans* de Bolivia estudiados ha permitido obtener 2 haplotipos: T.inf-H1 (longitud: 476 pb; 77,7% AT) y T.inf-H4 (longitud: 474 pb; 77,6% AT). Estos haplotipos son idénticos a los publicados en *GenBank* por Bargues y colaboradores (2006) como: AJ576051 y AJ576053. El análisis de las secuencias



3.6.1.3 Análisis de la región intergénica (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr

El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNr de los 12 especímenes de *T. infestans* de Bolivia estudiados ha permitido obtener 4 haplotipos: T.inf-CH1A (longitud: 1.304 pb; 67,4% AT), T.inf-CH1B (longitud: 1.323 pb; 67,3% AT), T.inf-CH1C (longitud: 1.330 pb; 67,5% AT) y T.inf-CH4A (longitud:1.304 pb; 67,4% AT). Estos haplotipos son idénticos a los publicados en *GenBank* por Bargues y colaboradores (2006) como: AJ576051, AJ582025, AJ582024 y AJ576053. El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNr de los especímenes de Argentina y Chile ha permitido obtener un haplotipo T.inf-CH4A, el mismo que ha sido encontrado en Bolivia.

Las diferencias entre haplotipos se localizan en los espaciadores transcritos internos y se concentran principalmente al inicio de la secuencia, en el marcador ITS-1. El gen 5.8S englobado entre los marcadores es idéntico para todos los ejemplares y presenta una longitud de 115 pb y 42,6% AT. En cuanto a las posiciones variables entre secuencias se observan: 37 indels, de los cuales 31 se localizan en el ITS-1; y una sola mutación en la base 909, en el marcador ITS-2 (Tabla 11).

Región intergénica del ADNr (ITS-1, 5.8S, ITS-2) de <i>T. infestans</i>				
Haplotipos región intergénica ADNr	País de origen	Longitud pb	%AT	Posiciones variables nucleotídicas
				111111111111112222222222222222239990000 6689999999999000000000111111110227777 34901234567890123456789012345659894567
T.inf-CH1A	Perú, Bolivia	1304	67,4	TAA-----GT--AATA
T.inf-CH1B	Bolivia	1323	67,3	-----TAAAATAAAAAGCCGCAAAGACC-.-.-.-.
T.inf-CH1C	Bolivia	1330	67,5	...TAAATAAAATAAAAAGCCGCAAAGACC-.-.-.-.
T.inf-CH4A	Bol., Arg., Chile	1304		...-----AAT----

**Tabla 11:** Alineamiento de las posiciones variables de los haplotipos hallados en el presente estudio de la región intergénica completa del ADNr (ITS-1 + 5.8S + ITS-2) de *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). El marcador ITS-1 va desde la base 1 a la 700, el gen 5.8S continúa hasta la base 855 y finalmente, el ITS-2 va desde la base 856 hasta la última base (1.304, 1.323 o 1.330), cuya longitud depende del haplotipo. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú.

### 3.6.2 Resultados obtenidos en el estudio del ADNmt

#### 3.6.2.1 Análisis del gen ribosomal 16S del ADNmt

El análisis de las secuencias obtenidas del gen ribosomal 16S de los 12 especímenes de *T. infestans* de Bolivia estudiados ha permitido obtener 2 haplotipos: T.inf-16S.A (longitud: 543 pb; 68,7% AT) y T.inf-16S.B (longitud: 541 pb; 68,4% AT). El análisis de las secuencias obtenidas del gen 16S de los especímenes de Argentina ha permitido obtener un haplotipo T.inf-16S.B, el mismo que ha sido encontrado en Bolivia. No se ha podido obtener este gen en los especímenes de Chile.

Se observan dos grupos de secuencias: las de Perú y Bolivia por un lado, y las de Bolivia y Argentina por otro. Las diferencias entre ambos grupos se deben a una mutación nucleotídica y a 2 indels (Tabla 12).

Gen 16S de <i>T. infestans</i>				
Haplotipos 16S	País de origen	Longitud pb	%AT	Nucleótidos
				455 333 156
T.inf-16S.A	Perú, Bolivia	543	68,7	AAA
T.inf-16S.B	Bolivia, Argentina	541	68,4	G--

**Tabla 12:** Alineamiento de las posiciones variables de los haplotipos hallados en el presente estudio del gen 16S de *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se observa una mutación nucleotídica en la posición 431; (-) indica inserción-delección. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú.

### 3.6.2.2 Análisis del gen ND1 del ADNmt

El análisis de las secuencias obtenidas del gen ND1 de los 12 especímenes *T. infestans* de Bolivia estudiados ha permitido obtener tres haplotipos: T.inf-ND1.CH1ABC (longitud: 912; pb; 68,6% AT), T.inf-ND1.melanosoma (longitud: 912 pb; 68,8% AT) y T.inf-ND1.d (longitud: 912 pb; 68,9% AT). Los dos primeros haplotipos son idénticos a los publicados en *GenBank* por Bargues y colaboradores (2006) como: AM980622 y AM9806249. El haplotipo T.inf-ND1.d ha sido obtenido por primera vez. Los haplotipos hallados codifican respectivamente para 3 secuencias de 303 aminoácidos de longitud: T.inf-ND1.I, T.inf-ND1.II y T.inf-ND1.III. El análisis de las secuencias obtenidas del gen ND1 de los especímenes de Argentina y Chile ha permitido obtener un único haplotipo: T.inf-ND1.melanosoma que, al igual que en Bolivia, codifica para T.inf-ND1.II.

Se observan dos grupos de secuencias: las de Perú y Bolivia que se corresponden con el haplotipo T.inf-ND1.CH1ABC; y las de Bolivia, Argentina y Chile similares al haplotipo T.inf-ND1.melanosoma. Las diferencias entre grupos se deben a 19 mutaciones. Dentro del grupo tipo melanosoma sólo hay una mutación silenciosa entre haplotipos que no genera ningún cambio aminoacídico (Tabla 13).

Gen ND1 de <i>T. infestans</i>						
Haplotipos nucleotídicos/ aminoacídicos del gen ND1	País de origen	Longitud pb	%AT	Posiciones variables		
				nucleotídicas	Longitud Aa	Aa
T.inf-ND1.CH1ABC/T.inf-ND1.I	Pe, Bol	912	68,6	CCGACGAATTGTGACGGTG	303	V
T.inf-ND1.melanosoma/T.inf-ND1.II	Bol, Chi, Arg	912	68,8	TTAGTAGGCCTCAGTAAC.	303	A
T.inf-ND1.d/T.inf-ND1.III	Bol	912	68,9	TTAGTAGGCCTCAGTAACA	303	A

**Tabla 13:** Alineamiento de las posiciones variables de los haplotipos hallados en el presente estudio del gen ND1 de *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y en aminoácidos (Aa) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Aparecen indicadas las posiciones de las mutaciones observadas en la secuencia nucleotídica y en su traducción en aminoácidos. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú (Pe). Bol: Bolivia. Arg: Argentina y Chi: Chile.

3.6.2.3 Análisis del gen COI del ADNmt

Los 12 especímenes *T. infestans* de Bolivia han generado un nuevo haplotipo del gen mitocondrial COI T.inf-COI.c (longitud: 699 pb; 59,3% AT) que codifica para el haplotipo aminoacídico T.inf-COI.II (longitud: 233 Aa). Los especímenes de Argentina y Chile han generado un nuevo haplotipo T.inf-COI.d (longitud: 699 pb; 59,1 % AT) que codifica para T.inf-COI.IV (longitud: 233 Aa).

Las secuencias se dividen en dos grupos: el de Perú por un lado, y el de Bolivia, Argentina y Chile, por otro. Se observan 14 posiciones variables entre grupos de secuencias, tanto en nucleótidos, como en aminoácidos sin embargo, las diferencias dentro de los grupos se deben a una sola mutación entre secuencias (Tabla 14).

Gen COI de <i>T. infestans</i>						
Haplotipos nucleotídicos/aminoacídicos del gen COI	País de origen	Longitud pb	%AT	Posiciones variables nucleotídicas	Longitud Aa	Posiciones variables aminoacídicas
				12222333334446 10236356791251 22958721312226		111111112 36779112233450 88790381518116
T.inf-COI.a/T.inf-COI.I	Perú	699	59,4	CTCTGAACCATCGT	233	RWRSENMPRIFPRY
T.inf-COI.b/T.inf-COI.II	Perú	699	59,4	.....A.	233	.....H.
T.inf-COI.c/T.inf-COI.III	Bolivia	699	59,3	TCT.AGGTTGCT.C	233	WRW.KDVS CVLL.H
T.inf-COI.d/T.inf-COI.IV	Arg, Chi	699	59,1	TCTCAGGTTGCT.C	233	WRWPKDVS CVLL.H

**Tabla 14:** Alineamiento de las posiciones variables de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, halladas en el presente estudio, del gen COI en *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y en aminoácidos (Aa) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Aparecen indicadas las posiciones de las mutaciones observadas tanto en las secuencias nucleotídicas como en su traducción en aminoácidos. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú.

#### 3.6.2.4 Análisis del gen *Cyt b* del ADNmt

Los 12 especímenes *T. infestans* de Bolivia han generado, cuatro haplotipos de *Cyt b*, dos del gen completo: T.inf-Cytb.a (longitud: 1.134 pb; 65,2% AT); y T.inf-Cytb.c (longitud: 1.134 pb; 65,3 % AT) que codifican para T.inf-Cytb.I (longitud: 377 Aa) y T.inf-Cytb.III (longitud: 377 Aa), respectivamente. Y también se han obtenido dos haplotipos del gen parciales: T.inf-Cytb.d, (longitud: 1.005 pb; 78,9% AT), del cual no se han podido obtener las últimas bases del gen, cuyo haplotipo aminoacídico es T.inf-Cytb.IV (longitud: 335 Aa); y el haplotipo T.inf-Cytb.e (longitud: 789 pb; 64,5% AT) del cual falta el inicio del gen y cuyo haplotipo aminoacídico es T.inf-Cytb.V (longitud: 262 Aa). Los especímenes de Argentina y Chile han generado un nuevo haplotipo del gen completo T.inf-Cytb.b (longitud: 1.134 pb; 65,4% AT) que codifica para T.inf-Cytb.II (longitud: 377 Aa).

En la comparativa de haplotipos del gen *Cyt b* completo se observan dos grupos de secuencias que se diferencian en 24 mutaciones. Por un lado, las procedentes de Perú y de la zona Andina de Bolivia y por otro, las procedentes de zonas no-Andinas de Bolivia, Chile y Argentina; dentro de este último grupo los dos haplotipos hallados se diferencian en una sola mutación silenciosa. A pesar de las 24 mutaciones entre los grupos, solamente se observan 2 cambios aminoacídicos en su traducción (Tabla 15).

#### 3.6.2.5 Análisis de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 del ADNmt

Los 12 especímenes *T. infestans* de Bolivia generan tres regiones intergénicas: T.inf-ARNt.a (longitud: 160 pb; 74,4% AT); T.inf-ARNt.c (longitud: 160 pb; 74,4% AT); y T.inf-ARNt.d (longitud: 160 pb; 73,7% AT). Los especímenes de Argentina y Chile generan la región T.inf-ARNt.c (Tabla 16).

Gen Cyt <i>b</i> de <i>T. infestans</i>						
Haplotipos nucleotídicos / aminoácidos del gen completo Cyt <i>b</i>	País de origen	Longitud pb	%AT	Posiciones variables		Longitud Aa
				nucleotídicas	Aa	
				11111111 1223333335678999000011 750813368902221160245623 207281271314625832616881	11 12 13	
T.inf-Cytb.a/T.inf-Cytb.I	Perú, Bolivia	1134	65,2	CCTCAACACAGCCTTCTCACCTCT	TM	377
T.inf-Cytb.b/T.inf-Cytb.II	Chile y Argentina	1134	65,4	TTCTGGTGTGATACATCTGTCTC	VV	377
T.inf-Cytb.c/T.inf-Cytb.III	Bolivia	1134	65,3	T.CTGGTGTGATACATCTGTCTC	VV	377

**Tabla 15:** Alineamiento de las posiciones variables de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas, halladas en el presente estudio únicamente del gen completo Cyt *b* en *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y en aminoácidos (Aa) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Aparecen indicadas las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como en su traducción en aminoácidos. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú.

Región intergénica del ADNmt de <i>T. infestans</i> que separa los genes Cyt <i>b</i> y ND1				
Regiones ARNt	País de origen	Longitud pb	%AT	Posiciones variables nucleotídicas
				11111 245700112 120208180
T.inf-ARNt.a	Perú, Bolivia	160	74,4	CGCATCTCT
T.inf-ARNt.b	Perú	160	75,0	TA....C..
T.inf-ARNt.c	Bolivia, Argentina, Chile	160	74,4	.ATGCTCTC
T.inf-ARNt.d	Bolivia	160	73,0	.....C..

**Tabla 16:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas de las regiones intergénicas ARNt del ADNmt halladas en el presente estudio en *Triatoma infestans*. Se indica para cada haplotipo la longitud en pares de bases (pb) y el porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Aparecen indicadas la posiciones de las mutaciones encontradas. Se incluyen también los resultados obtenidos en el análisis de las muestras procedentes de Perú.

### 3.7 Análisis comparado de los resultados obtenidos con las secuencias de *T. infestans* publicadas en *GenBank*

Se han analizado muestras de *T. infestans* procedentes de Perú, Bolivia, Argentina y Chile. Los haplotipos obtenidos se comparan con todas las secuencias publicadas en *Genbank*, hasta la fecha, sobre *T. infestans*. Muchas de las secuencias son homólogas por tanto, se han agrupado en haplotipos y se han nombrado de forma estandarizada siguiendo las pautas de Bargues y colaboradores (2006) y Mas-Coma y Bargues (2009).

#### 3.7.1 Análisis comparado del ADNr

En este punto se comparan las secuencias obtenidas de *T. infestans* con todas las publicadas en *GenBank*. Para poder llevar a cabo parte de los análisis de estructura poblacional los individuos se dividen en dos grupos: el grupo Andino formado por los ejemplares procedentes de Perú y Andes Bolivianos; y el grupo no-Andino formado por ejemplares del resto de Bolivia, Chile, Argentina, Uruguay, Brasil y Paraguay.

##### 3.7.1.1 Análisis comparado del ITS-1 del ADNr

Se han obtenido 137 secuencias del ITS-1 (126 en el presente estudio y 11 del *GenBank*) de *T. infestans* procedentes de Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Uruguay, Brasil y Paraguay, con longitudes que van desde 544 a 699 pb. Estas secuencias se agrupan en 5 haplotipos (3 completos y 2 parciales) (Anexo III).

El alineamiento de los 3 haplotipos completos revela la presencia de 31 indels, ningún *singleton* ni ninguna posición parsimónicamente informativa (Tabla 17).

ITS-1 de <i>T. infestans</i>		
Identificación GB	Haplotipo de ITS-1	Posiciones variables nucleotídicas
		11111111111112222222222222222223 6689999999999000000000111111111 3490123456789012345678901234565
AJ576051 AJ582024 AJ582025	T.inf-HA T.inf-HB T.inf-HC	TAA-----G -----TAAAATAAAAAGCCGCAAAGACC- ...TAAAATAAAAAGCCGCAAAGACC-

**Tabla 17:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en los 3 haplotipos completos comparados del marcador ITS-1 del ADNr de *Triatoma infestans*. Se observa como todas las posiciones variables se deben a indels.

El haplotipo más extendido es T.inf-HA que se localiza en todos los países estudiados tanto en poblaciones domésticas como peridomésticas y silvestres. El país con mayor número de haplotipos completos descritos es Bolivia con T.inf-HA (hallados en todos los ecotopos), T.inf HB (exclusivo de poblaciones silvestres) y T.inf-HC (hallado en poblaciones domésticas y peridomésticas) (Bargues *et al.*, 2006).

En Argentina, además de los haplotipos completos han sido hallados dos haplotipos parciales [T.inf-HE (HQ437706) y T.inf-HD (HQ437705)] en ejemplares silvestres del Chaco Argentino. Estos ejemplares poseen un patrón característico de minisatélites puesto que poseen 3 secuencias  $\alpha$  y 2  $\beta$ . No se han utilizado en la comparativa porque han sido publicados incompletos.

#### *Análisis de genética poblacional del ITS-1*

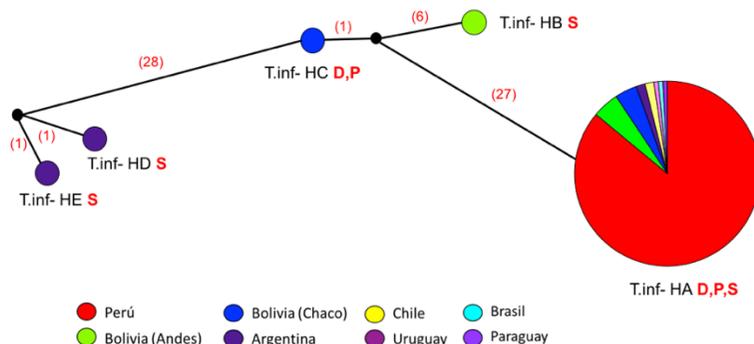
Para el análisis poblacional se han utilizado las 135 secuencias (126 de los ejemplares analizados y 9 de *GenBank*) que generan 3 haplotipos completos del ITS-1 de *T. infestans*. Los parámetros obtenidos y el total de las secuencias analizadas se muestran en la Tabla 18. El test de neutralidad D de Tajima es igual a 0 ya que para ser calculado utiliza los sitios segregantes y en este caso no hay ningún polimorfismo. Un valor de D igual a 0 significa la hipótesis de neutralidad no puede ser rechazada. Por otro lado, el valor  $F_s$  de  $F_u$  es positivo aunque no significativo por tanto, la especie ha sido sometida a una drástica

reducción o se encuentra bajo selección dominante, donde ciertos haplotipos predominan.

Se ha obtenido una red de haplotipos Network del ITS-1 mediante *Median-Joining* en la que se han añadido las dos secuencias parciales del Chaco Argentino (T.inf-HE y T.inf-HD) y se ha comparado un fragmento de 572 pb. El haplotipo T.inf-HA es el más extendido puesto que se ha encontrado en todos los países estudiados y en todos los ecotopos. Los haplotipos silvestres Argentinos quedan en un lado de la red un tanto aislados del resto. En el otro extremo, se sitúan los haplotipos Bolivianos y el haplotipo T.inf-HA. Se indican los ecotopos de los haplotipos mediante letras en rojo: S silvestre, P peridomiciliado y D domiciliado (Figura 24).

Parámetros	Valores del análisis de ITS-1 en todas las secuencias <i>T. infestans</i>	Valores ITS-1 en el grupo Andino	Valores ITS-1 grupo no-Andino
Nº de secuencias	135	124	11
Longitud (pb)	673 a 699	673 a 692	673 a 699
Nº de haplotipos	3	2	2
Hd	-		
$\pi$	20,67	0,8639	9,038
S	0	0	0
K	-		
D de Tajima	0 p>0,001	0 p>0,001	0 p>0,001
F <sub>s</sub> de Fu	1,89 p>0,001	4,2002 p>0,001	12,6 p>0,001

**Tabla 18:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del ITS-1 en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica no se puede calcular porque el programa DNAsp v.5.10.1 no tiene en cuenta los gaps;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias no la puede calcular porque el programa DNAsp v.5.10.1 no tiene en cuenta los gaps. D de Tajima y F<sub>s</sub> de Fu: test de neutralidad. El grupo Andino se compone de un haplotipo exclusivamente (T.inf-HA) por lo que no hay polimorfismos.



**Figura 24:** Red Network del ITS-1 de *Triatoma infestans* generada con el algoritmo *Median Joining*. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. Los puntos pequeños de color negro son vectores insertados por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1.

### 3.7.1.2 Análisis comparado del ITS-2 del ADNr

Se han obtenido 141 secuencias del ITS-2 (126 en el presente estudio y 15 del *GenBank*) de *T. infestans* procedentes de Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Uruguay, Brasil y Paraguay, con longitudes que van desde 454 a 482 pb. Estas secuencias se agrupan en 9 haplotipos (7 completos y 2 parciales) (Anexo III).

El alineamiento de los 7 haplotipos completos revela la presencia de 12 posiciones variables: 10 indels, 1 *singleton* y 1 posición parsimónicamente informativa (P) (Tabla 19).

En Perú se ha encontrado el haplotipo T.inf-H1 que también se localiza en Bolivia y Chile. El haplotipo más extendido es T.inf-H2 puesto que se encuentra en Chile, Uruguay, Argentina, Brasil y Paraguay. El país con mayor variabilidad genética en este marcador es Bolivia con 4 haplotipos.

En el presente estudio se ha descrito por primera vez el haplotipo T.inf-H4 en Bolivia y Chile, hasta el momento solo había sido descrito en Argentina.

ITS-2 de <i>T. infestans</i>		
Identificación GB	Haplotipos	Posiciones variables nucleotídicas
AJ576051	T.inf-H1	T-----AAATA
AJ576054	T.inf-H2	A--ATAT....T
AJ576052	T.inf-H3	ATAATAT....T
AJ576053	T.inf-H4	A--AT-----.
AJ576055	T.inf-H5	A--ATAT.....
AY860387	T.inf-HITInf72	ATAATAT....T
AY860388	T.inf-HITInf74	A-----.....

**Tabla 19:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en los 7 haplotipos completos comparados del ITS-2 del ADNr de *Triatoma infestans*. S= *singleton*; P= posiciones parsimónicamente informativas.

### Análisis de genética poblacional del ITS-2

Para el análisis de genética poblacional se han utilizado las 139 secuencias completas (136 de los ejemplares analizados y 13 del *GenBank*) que generan 7 haplotipos de ITS-2 de *T. infestans*. Los parámetros obtenidos y el total de las secuencias analizadas se muestran en la Tabla 20. Los análisis de genética poblacional se han aplicado a las secuencias completas obtenidas y además, se han aplicado por separado a las secuencias del grupo Andino y a las del no-Andino. En el análisis de toda la población como en el del grupo Andino los valores del test de neutralidad D de Tajima son negativos y los Fs de Fu positivos y en ambos casos, no son estadísticamente significativos. Se deduce que ha habido una fuerte reducción de la población (según Fs) pero el valor D positivo y cercano a cero indicaría que la especie está comenzando a expandirse. En cuanto a los valores del grupo no-Andino son positivos lo que indica que este grupo ha sufrido una fuerte reducción y acumula un exceso de mutaciones.

Parámetros	Valores del análisis de ITS-2 en todas las secuencias <i>T. infestans</i>		Valores ITS-2 en el grupo Andino		Valores ITS-2 grupo no-Andino	
Nº de secuencias	139		116		23	
Longitud (pb)	482		476		482	
Nº de haplotipos	7		1		7	
Hd	0,212		0,103		0,525	
$\pi$	1,35		0,718		1,35	
S	2		1		2	
K	0,85714		0,1026		0,885	
D de Tajima	-0,2456	p>0,001	-0,481	p>0,001	1,4142	p>0,001
F <sub>s</sub> de Fu	0,91215	p>0,001	3,5616	p>0,001	3,0575	p>0,001

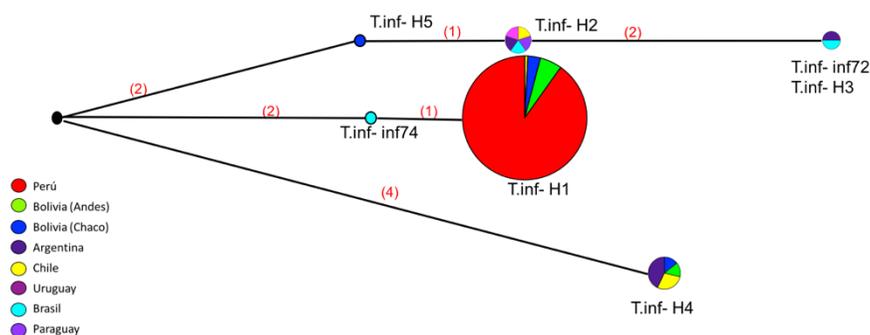
**Tabla 20:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del ITS-2 en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y F<sub>s</sub> de Fu: test de neutralidad.

El estudio de la varianza molecular del ITS-2 se llevó a cabo mediante el test AMOVA anidado estructurando jerárquicamente las poblaciones de *T. infestans* en categorías de mayor a menor tamaño como: i) grupos Andino (incluye secuencias de Perú y los Andes Bolivianos) y no-Andino (incluye secuencias del resto de Bolivia, Chile, Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay); ii) países; y iii) poblaciones. Los resultados del AMOVA revelan que el 65% de la varianza total fue debida a la diferencias entre grupos y un 6,2% a las diferencias entre poblaciones. El índice de fijación es cercano a 1 en todos los niveles lo que indica que según el marcador ITS-2 la especie *T. infestans* está muy estructurada genéticamente y hay poco flujo genético (Tabla 21).

AMOVA del ITS-2					
Fuente de variación	GL	Suma de los cuadrados	Varianza de los componentes ( $\sigma^2$ )	Porcentaje de varianza	Índice de fijación
Entre grupos	1	20,456	0,479	65,11328	$\Phi_{CT}$ 0,65113 p=0,144
Entre países	6	6,717	0,211	28,67713	$\Phi_{SC}$ 0,82201 p=0,022
Entre poblaciones	133	6,075	0,046	6,20960	$\Phi_{ST}$ 0,93790 p<0,001
<b>Total</b>	<b>140</b>	<b>33,248</b>	<b>0,736</b>	<b>100,0</b>	

**Tabla 21:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (Nested AMOVA) que mide la diversidad genética del ITS-2 del ADNr de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a la diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de las poblaciones.

Se ha obtenido una red Network del ITS-2 mediante *Median-Joining*. El grupo Andino y no-Andino comparten haplotipos que no están relacionados entre sí (T.inf-H1 y T.inf-H4). El grupo no-Andino es más heterogéneo y se distribuye en diferentes ramas y haplotipos, dentro de este grupo destaca el haplotipo T.inf-H2 por ser el más extendido en América del Sur, ya que se localiza en 5 países diferentes (Figura 25).



**Figura 25:** Red Network del ITS-2 de *Triatoma infestans* generada con el algoritmo *Median Joining*. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. El punto pequeño de color negro es un vector insertado por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1.

### 3.7.1.3 Análisis comparado de la región intergénica completa (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr

Se han obtenido 138 secuencias de la región intergénica completa del ADNr de *T. infestans* procedentes de Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Uruguay Brasil y Paraguay con longitudes desde 1.302 a 1.330 pb. Estas secuencias se agrupan en 7 haplotipos, de los cuales 4 han sido hallados en el estudio (Anexo III).

El alineamiento de los 7 haplotipos revela la presencia de 43 posiciones variables de las cuales 31 son indels que se localizan en el ITS-1 y 10 son indels y 2 son posiciones parsimónicamente informativas que se localizan en el ITS-2 (Tabla 22).

Posiciones variables del ADNr (ITS-1,5.8S,ITS-2) de <i>T. infestans</i>			
Identificación GB	Haplotipos	Posiciones variables nucleotídicas	
		ITS-1	ITS-2
		11111111111112222222222222222223	11111
668999999999990000000000111111111	9999999900002		
3490123456789012345678901234565	011233388880		
	912901212347		
	P	P	
AJ576051	T.inf-GT1A	TAA-----	T-----AAATA
AJ576054	T.inf-GT2A	...-----	A--TATA...T
AJ576052	T.inf-GT3A	...-----	AATTATA...T
AJ576053	T.inf-GT4A	...-----	A--TA-----
AJ576055	T.inf-GT5A	...-----	A--TATA....
AJ582024	T.inf-GT1B	-----TAAATAAAAAGCCGCAAAGACC	.-----
AJ582025	T.inf-GT1C	...TAAATAAAAATAAAAAGCCGCAAAGACC-	.-----

**Tabla 22:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en los 7 haplotipos comparados de la región intergénica completa del ADNr (ITS-1, 5.8S, ITS-2) de *Triatoma infestans*. El marcador ITS-1 va desde la base 1 a la 700, el gen 5.8S continúa hasta la base 855 y finalmente, el ITS-2 va desde la base 856 hasta la última base (1.302-1.330). P= posiciones parsimónicamente informativas.

En Perú se ha encontrado el haplotipo T.inf-CH1A que también se localiza en Bolivia y Chile. El haplotipo más extendido es T.inf-CH2A puesto que se encuentra en Chile, Uruguay, Argentina, Brasil y Paraguay. El país con mayor variabilidad genética en esta región es Bolivia con 5 haplotipos.

En el presente estudio se ha descrito por primera vez el haplotipo T.inf-CH4A en Bolivia y Chile ya que previamente había sido descrito únicamente en Argentina (Bargues *et al.*, 2006).

*Análisis de genética poblacional de la región intergénica completa del ADNr*

Para el análisis de genética poblacional se han utilizado las 138 secuencias (126 de este estudio y 12 de *GenBank*) que generan 7 haplotipos de la región intergénica del ADNr de *T. infestans*. Los parámetros obtenidos y el total de las secuencias analizadas se muestran en la Tabla 23. Los análisis de genética poblacional se han aplicado a todas las secuencias obtenidas y además, se han aplicado por separado a las secuencias del grupo Andino y a las del no-Andino. Los test de neutralidad aplicados a toda la población muestran valores negativos de D de Tajima y positivos para  $F_s$  de  $F_u$  lo que mostraría, al igual que en el marcador ITS-2, que ha habido una fuerte reducción de la población (según  $F_s$ ) pero el valor D positivo y cercano a cero indicaría que la especie está comenzando a expandirse. En el grupo Andino puesto que las variables entre haplotipos se deben a indels, el valor D de Tajima es igual a cero. En el grupo no-Andino los valores positivos de los test de neutralidad indican que en estas zonas los especímenes poseen un déficit de mutaciones y una disminución del tamaño poblacional

Parámetros	Valores del análisis de la región intergénica del ADNr (ITS-1, 5.8S, ITS-2) en <i>T. infestans</i>		Valores región intergénica del ADNr	
			Grupo Andino	Grupo no-Andino
Nº de secuencias	138		123	15
Longitud (pb)	1.337		1.331	1.310
Nº de haplotipos	7		3	5
Hd	0,201		-	0,514
$\pi$	2,89464		1,791	0,00039
S	2		0	2
K	0,27896		-	0,51429
D de Tajima	-0,33758	p>0,001	0	p>0,001 0,769 p>0,001
$F_s$ de $F_u$	3,62428	p>0,001	5,707 p>0,001	3,3066 p>0,001

**Tabla 23:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias de la región intergénica del ADNr en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y  $F_s$  de  $F_u$ : test de neutralidad.

El estudio de la varianza molecular del la región intergénica del ADNr se llevó a cabo mediante el test AMOVA anidado estructurando

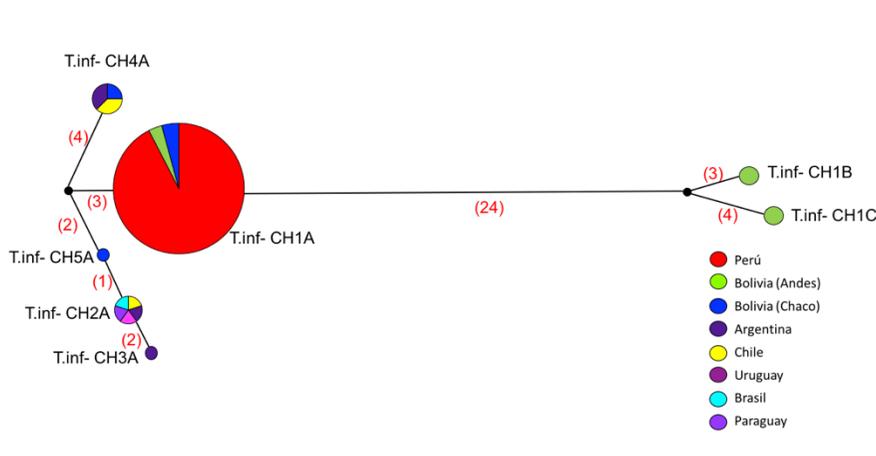
jerárquicamente las poblaciones de *T. infestans* en categorías de mayor a menor tamaño como: i) grupos Andino (incluye secuencias de Perú y los Andes Bolivianos) y no-Andino (incluye secuencias del resto de Bolivia, Chile, Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay); ii) países; y iii) poblaciones. Los resultados del AMOVA revelan que el 58,7% de la varianza total fue debida a las diferencias entre países, el 24,1% a las diferencias entre poblaciones y el 17,2% a las diferencias entre grupos. Los índices de fijación tanto en las poblaciones ( $\Phi_{ST} = 0,76$ ) como en los países ( $\Phi_{SC} = 0,71$ ) son los más elevados y son cercanos al 1 lo que indica que a estos niveles, las poblaciones de *T. infestans* están muy estructuradas y hay poco flujo genético entre individuos. A nivel de grupos los resultados en este marcador son los más bajos lo que indica que hay poca estructura poblacional y se da una situación de panmixia en la que las diferencias genéticas de los individuos se deben a cruzamientos al azar (Tabla 24).

AMOVA de la región intergénica completa del ADNr							
Fuente de variación	GL	Suma de los cuadrados	Varianza de los componentes ( $\sigma^2$ )	Porcentaje de varianza	Índice de fijación		
Entre grupos	1	48,903	0,50568	17,20	$\Phi_{CT}$	0,17197	p> 0,001
Entre países	6	57,336	1,72678	58,72	$\Phi_{SC}$	0,70921	p< 0,001
Entre poblaciones	130	92,044	0,70803	24,08	$\Phi_{ST}$	0,75921	p< 0,001
<b>Total</b>	<b>137</b>	<b>198,283</b>	<b>2,94049</b>	<b>100,0</b>			

**Tabla 24:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (*Nested* AMOVA) que mide la diversidad genética de la región intergénica del ADNr de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a la diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de las poblaciones.

Se ha obtenido una red Network de la región intergénica del ADNr mediante *Median-Joining* con 3 ramas. La rama central agrupa los haplotipos Andinos y algunas secuencias del Chaco Boliviano. Se observan dos haplotipos que se pueden considerar ancestrales. Por un lado, T.inf-CH1A que engloba muestras de ambos grupos a partir del cual emergen tras una gran separación de 24 pasos mutacionales dos haplotipos de los Andes Bolivianos, los cuales pueden estar aislados y de ahí el gran número de diferencias. Por otro lado, el

haplotipo T.inf.CH2A también puede considerarse ancestral ya que engloba especies de diversos países y se encuentra unido a otros dos haplotipos con escasos pasos mutacionales entre ellos. Las ramas más externas contienen el resto de haplotipos del grupo no-Andino (Figura 26).



**Figura 26:** Red Network de la región intergénica completa del ADNr de *Triatoma infestans* generada con el algoritmo *Median Joining*. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. Los puntos pequeños de color negro son vectores insertados por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1.

### 3.7.2 Análisis comparado del ADNmt

#### 3.7.2.1 Análisis comparado del gen ribosomal 16S

Se han obtenido 166 secuencias del gen 16S (124 en el presente estudio y 42 de *GenBank*) de *T. infestans* procedentes de Perú, Bolivia, Argentina, Uruguay y Brasil, con longitudes desde 313 a 596 pb. Estas

secuencias se agrupan en 22 haplotipos: 2 nuevos hallados en el presente estudio y 20 obtenidos de las secuencias publicadas en *GenBank* (Anexo IV).

Las secuencias obtenidas poseen diferentes longitudes por lo que para poder compararlas se han alineado y se ha seleccionado el fragmento que más secuencias comparten. Este fragmento tiene una longitud de 509 pb y está presente en 15 haplotipos, su alineamiento ha revelado la presencia de 2 indels y 17 posiciones variables: 12 *singletons* y 5 posiciones parsimónicamente informativas (Tabla 25).

Gen 16S de <i>T. infestans</i>		
Identificación GB	Haplotipos	Posiciones variables nucleotídicas
		1111233444444 111122355770002579 0278234675457244976 SS SSSSPSPSSPPSSS
P.E.	T.inf-16S.A	-TT-TATGAAGAACTAGTA
P.E.	T.inf-16S.B	-...-.....G...
P.E.	T.inf-16S.C*	-...-.....T.....
P.E.	T.inf-16S.D*	-...-.....G.A...CG...
AY226901	T.inf-16S.E	-...-.....G...T
KC249023	T.inf-16S.68	-...-.....GAG.
AY226900	T.inf-16S.D Arg	G..-.....G...
EU143698	T.inf-16S.R	-...-.....G.....G...
EU143695	T.inf-16S.O	-...-...A.....G...
EU143694	T.inf-16S.Nie	-...-G.....G...
EU143693	T.inf-16S.N	-...-.....G...G...
AY226898	T.inf-16S.C Arg	-...-.....G...G...
AY226897	T.inf-16S.B Arg	-A-.....G...
KC249025	T.inf-16S.44	-C-...C.G.....G...
KC249016	T.inf-16S.60	-...-C....G.....

**Tabla 25:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en las 509 pares de bases de los 15 haplotipos comparados del gen 16S de *Triatoma infestans*. P.E: haplotipos hallados en el presente estudio; (\*): Nombre estandarizado para las agrupaciones de secuencias homólogas, del presente estudio y publicadas en *GenBank*; T.inf-16S.C= agrupa 7 secuencias, T.inf-16S.D= agrupa 2 secuencias. La información sobre las secuencias se puede consultar en el Anexo IV. S= *singleton*. P= posiciones parsimónicamente informativas.

El haplotipo hallado en Perú T.inf-16S.A se localiza también en Bolivia, en la zona de Cochabamba (Andes). El haplotipo más extendido es T.inf-16S.B puesto que se encuentra en Bolivia, Argentina y Brasil. Ambas secuencias han

sido descritas por primera vez en el presente estudio. El país con mayor variabilidad de haplotipos publicados, hasta el momento, del gen 16S de *T. infestans* es Argentina con un total de 16 diferentes.

#### *Análisis de genética poblacional del gen 16S*

Para el análisis de genética poblacional se han utilizado 140 secuencias (124 procedentes de los ejemplares analizados en el presente estudio y 16 secuencias publicadas en *GenBank*) que generan 15 haplotipos del gen 16S de *T. infestans*. Los parámetros obtenidos y el total de las secuencias analizadas se muestran en la Tabla 26. Los análisis de genética poblacional se han aplicado a las secuencias comparadas y además, se han aplicado por separado a las secuencias del grupo Andino y a las del no-Andino. Todos los valores de los test de neutralidad han sido negativos y la mayoría son estadísticamente significativos, por lo que según el gen 16S la especie está comenzando su expansión tras haber sufrido una fuerte reducción que puede ser consecuencia de un evento de “cuello de botella”.

Parámetros	Valores del gen 16S en <i>T. infestans</i>	Valores del gen 16S Grupo Andino	Valores del gen 16S Grupo no-Andino	
Nº de secuencias	140	117	23	
Longitud (pb)	509	509	508	
Nº de haplotipos	15	8	12	
Hd	0,341	0,084	0,737	
$\pi$	0,61285	0,17006	1,51779	
S	17	3	14	
K	0,59856	0,17006	1,431	
D de Tajima	-2,1845	p<0,001	-2,1012 p<0,001	-1,94062 p>0,001
F <sub>s</sub> de Fu	-14,72305	p<0,001	-6,5626 p<0,001	-8,80878 p<0,001

**Tabla 26:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del gen 16S de *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (lugares polimórficos); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y F<sub>s</sub> de Fu: test de neutralidad.

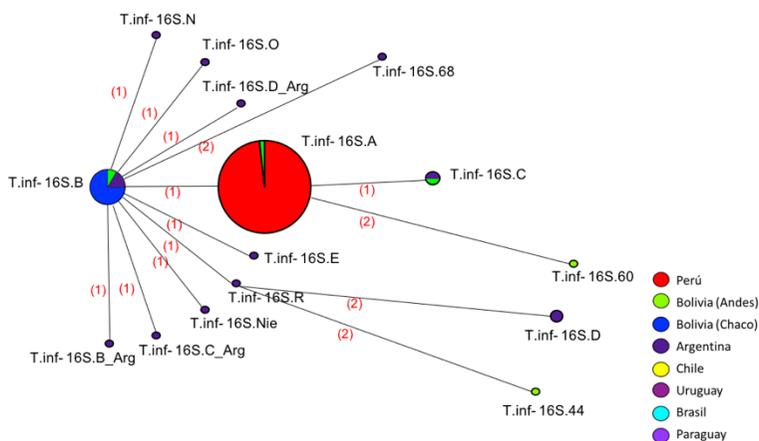
El estudio de la varianza molecular del gen 16S se llevó a cabo mediante el test AMOVA anidado estructurando jerárquicamente las poblaciones de *T.*

*infestans* en categorías de mayor a menor tamaño como: i) grupos Andino (incluye secuencias de Perú y los Andes Bolivianos) y no-Andino (incluye secuencias del resto de Bolivia, Chile, Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay); ii) países; y iii) poblaciones. Los resultados del test AMOVA revelan que el 57,97% de la varianza total fue debida a las diferencias entre grupos y un 27,65% a las diferencias entre poblaciones. Los índices de fijación más elevados son los de las poblaciones ( $\Phi_{ST} = 0,72$ ) y grupos ( $\Phi_{CT} = 0,58$ ), en ambos casos es cercano a 1, lo que indica que para el gen 16S en ambos niveles, la población están muy estructurada y hay poco flujo genético (Tabla 27).

AMOVA del gen 16S					
Fuente de variación	GL	Suma de los cuadrados	Varianza de los componentes ( $\sigma^2$ )	Porcentaje de varianza	Índice de fijación
Entre grupos	1	16,971	0,35865	57,97	$\Phi_{CT}$ 0,57969 p>0,001
Entre países	2	2,355	0,08897	14,38	$\Phi_{SC}$ 0,34213 p>0,001
Entre poblaciones	136	23,267	0,17198	27,65	$\Phi_{ST}$ 0,72349 P<0,001
<b>Total</b>	<b>137</b>	<b>198,283</b>	<b>2,94049</b>	<b>100,0</b>	

**Tabla 27:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (*Nested AMOVA*) que mide la diversidad genética del gen 16S de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de las poblaciones.

La distribución en red de haplotipos obtenida por *Median-Joining* muestra un haplotipo central (T.inf-16S.B) que se puede considerar que es el ancestro ya que a partir de este surgen otros 10 haplotipos como consecuencia de una o dos mutaciones con respecto al origen. Los haplotipos Andinos se localizan en el centro de la red, uno de ellos (T.inf-16S.C) engloba secuencias de los Andes Bolivianos y de Argentina, este hecho puede suceder ya que para la elaboración de esta red se han utilizado secuencias parciales. Otra opción es que la población Argentina derive de las primeras que iniciaron la colonización geográfica desde Bolivia. Los haplotipos no-Andinos se distribuyen de forma heterogénea alrededor del haplotipo central (T.inf-16S.B) separados por uno o dos pasos mutacionales, dentro de este grupo se observa un haplotipo Andino (T.inf-16S.44) que como ya se ha mencionado, puede ser el resultado de la construcción de la red con secuencias parciales (Figura 27).



**Figura 27:** Red Network del gen ribosomal 16S de de *Triatoma infestans* generada con el algoritmo *Median Joining*. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. El haplotipo T.inf-16S.B agrupa a las secuencias: T.inf-16S.F, T.inf-16S.D Arg, T.inf-16S.A/C y T.inf-16S.C Arg. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1.

### 3.7.2.2 Análisis comparado del gen ND1 del ADNmt

Se han obtenido 130 secuencias del gen ND1 (126 en el presente estudio y 4 de *GenBank*) de *T. infestans* procedentes de Perú, Bolivia, Argentina y Chile, con una longitud de 912 pb. Estas secuencias se agrupan en 5 haplotipos, uno de ellos (T.inf-ND1.d) hallado por primera vez en este estudio (Anexo V).

El alineamiento de los 5 haplotipos revela la presencia de 34 posiciones variables, 15 de estas son *singletons* y 19 posiciones son parsimónicamente informativas, la mayoría de los cambios se producen en la última parte del gen. La traducción de los haplotipos revela 2 posiciones variables en la secuencia aminoacídica: un *singleton* y una posición parsimónicamente informativa (Tabla 28).

Gen ND1 de <i>T. infestans</i>			
Identificación GB	Haplotipos nucleotídicos/aminoácídicos del gen ND1	Posiciones variables	
		nucleotídicas	Aa
		112333344456666777777888888	22
		5577803538992386133441222349003568	13
		7868128867033297309386136818141818	59
		SPPSPSSSSPSPSPSPSPSPSPSPSPSPSPSP	SP
AM980622	T.inf-ND1.CH1ABC/T.inf-ND1.I	CCCGTATATTCGGACATTAGTTGGCGACGGTGG	SV
AM980621	T.inf-ND1.CH2A/T.inf-ND1.IV	.TTA.G...T.AG.GC.C.TC.AT..GTAAC..	.A
AM980624	T.inf-ND1.melanosoma/T.inf-ND1.II	.TTA.G...T.AG.GC.C.TC.A...GTAAC..	.A
P.E.	T.inf-ND1.d/T.inf-ND1.III	.TTA.G...T.AG.GC.C.TC.A...GTAAC.A	.A
AM980623	T.inf-ND1.dark.morph/T.inf-ND1.V	TTTAC.CGCCTA...C.G...CA.TTG...CA.	G.

**Tabla 28:** Alineamiento de las posiciones variables halladas en los 5 haplotipos publicados del gen ND1 de *Triatoma infestans*. P.E.= haplotipo hallado en el presente estudio. (Aa)= aminoácidos. S= singleton. P= posiciones parsimónicamente informativas.

El haplotipo hallado en Perú T.inf-ND1.CH1ABC se localiza también en los Andes Bolivianos. El haplotipo más extendido es T.inf-ND1.melanosoma puesto que se encuentra en Bolivia, Chile y Argentina. En el presente estudio ha sido descrito por primera vez fuera de Argentina. El nuevo haplotipo T.inf-ND1.d, a pesar de las mutaciones nucleotídicas, genera la misma proteína que T.inf-ND1.melanosoma y T.inf-ND1.CH2A. El país con mayor variabilidad de haplotipos publicados, hasta el momento del gen ND1 de *T. infestans* es Bolivia ya que posee 4 de los 5 haplotipos descritos para este gen.

### *Análisis de genética poblacional del gen ND1*

Para el análisis de genética poblacional se han utilizado las secuencias completas del gen mitocondrial ND1 de todas las muestras estudiadas de *T. infestans*: 130 secuencias (126 procedentes de los ejemplares analizados en el presente estudio y 4 secuencias publicadas en *GenBank*). Los parámetros obtenidos y el total de las secuencias analizadas se muestran en la Tabla 29. Los análisis de genética poblacional se han aplicado a las secuencias obtenidas y además, se han aplicado por separado a las secuencias del grupo Andino y a las del no-Andino. Los resultados de los test de neutralidad en el análisis de todas las secuencias no son estadísticamente significativos, ambos  $F_s$  de Fu (positivo) y  $D$  de Tajima (negativo) indican que la población ha sufrido un reciente cuello de botella y que existen haplotipos dominantes. En el grupo

Andino no se han podido aplicar estos análisis puesto que se compone de un haplotipo, los resultados del grupo no-Andino coinciden con los calculados para toda la población.

Parámetros	Valores del análisis del gen ND1 en todas las secuencias de <i>T. infestans</i>		Valores del gen ND1 en el grupo Andino	Valores del gen ND1 en el grupo no-Andino
Nº de secuencias	130		116	14
Longitud (pb)	912		912	912
Nº de haplotipos	5		1	4
Hd	0,2		-	0,571
$\pi$	0,00398		-	0,00447
S	34		-	27
K	3,62731		-	4,07692
D de Tajima	-1,256	P>0,1	Sin polimorfismos	-2,1719 p<0,01
F <sub>s</sub> de Fu	7,8952	P=0,983	Sin polimorfismos	3,404 p<0,01

**Tabla 29:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del gen ND1 del ADNmt en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y Fu's F<sub>s</sub>: test de neutralidad.

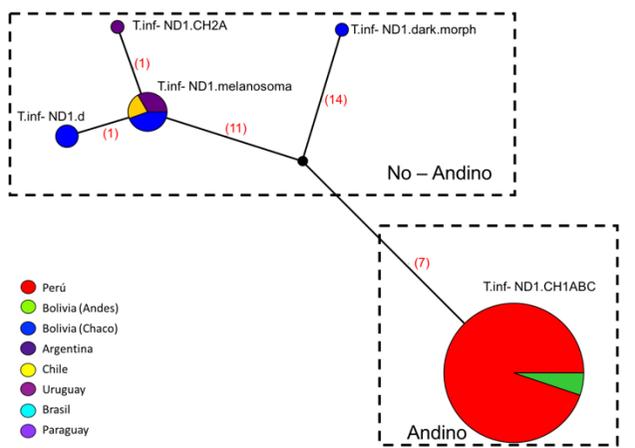
El estudio de la varianza molecular del gen ND1 se llevó a cabo mediante el test AMOVA anidado estructurando jerárquicamente las poblaciones de *T. infestans* en categorías de mayor a menor tamaño como: i) grupos Andino (incluye secuencias de Perú y los Andes Bolivianos) y no-Andino (incluye secuencias del resto de Bolivia, Chile, Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay); ii) países; y iii) poblaciones. Los resultados del test AMOVA revelan que el 97,02% de la varianza total fue debida a las diferencias entre grupos y un 2,34% a las diferencias entre poblaciones. Los índices de fijación tanto en los grupos ( $\Phi_{CT}=0,97$ ) como en las poblaciones ( $\Phi_{ST}=0,97$ ) son muy cercanos a 1, lo que supone que este gen está muy estructurado genéticamente y el flujo genético es limitado (Tabla 30).

Se ha obtenido una red Network del gen ND1 mediante *Median-Joining*. Se observan los cinco haplotipos del gen, uno de ellos recoge todas las muestras del grupo Andino (Perú y los Andes Bolivianos) y el grupo no-Andino

se divide en 4 haplotipos. Dentro de este grupo se observan dos ramas diferentes por un lado, un haplotipo T.inf-ND1.dark.morph, muy alejado genéticamente del resto con 14 pasos mutacionales y por otro, con 11 pasos mutacionales el haplotipo T.inf-ND1.melanosoma. A partir de este último surgen dos haplotipos con un solo paso mutacional, los tres generan la misma proteína (Figura 28).

AMOVA del gen ND1					
Fuente de variación	GL	Suma de los cuadrados	Varianza de los componentes ( $\sigma^2$ )	Porcentaje de varianza	Índice de fijación
Entre grupos	1	207,462	8,25808	97,02	$\Phi_{CT}$ 0,97023 $p > 0,001$
Entre países	3	1,611	0,05431	0,64	$\Phi_{SC}$ 0,21432 $p > 0,001$
Entre poblaciones	125	24,889	0,19911	2,34	$\Phi_{ST}$ 0,97023 $P < 0,001$
<b>Total</b>	<b>137</b>	<b>198,283</b>	<b>2,94049</b>	<b>100,0</b>	

**Tabla 30:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (*Nested* AMOVA) que mide la diversidad genética del gen ND1 de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a la diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a la diferenciación genética dentro de las poblaciones.



**Figura 28:** Red Network del gen mitocondrial ND1 de *Triatoma infestans* generada con el algoritmo *Median Joining*. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. El punto pequeño de color negro es un vector insertado por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. Imagen modificada a partir del programa Network 5.0.0.1.

3.7.2.3 Análisis comparado del gen COI del ADNmt

Se han obtenido 185 secuencias parciales del gen COI (32 en el presente estudio y 153 de *GenBank*) de *T. infestans* procedentes de Perú, Bolivia, Argentina, Chile y Uruguay con longitudes de 408 a 1.090 pb. Estas secuencias se agrupan en 64 haplotipos: 4 nuevos hallados en el presente estudio y 60 obtenidos de las secuencias publicadas en *GenBank* (Anexo VI).

Las secuencias obtenidas poseen diferentes longitudes por lo que para poder compararlas se han alineado y se ha seleccionado el fragmento que más secuencias comparten. Este fragmento tiene una longitud de 446 pb y está presente en 52 haplotipos. El alineamiento y comparación de estos haplotipos revela la presencia de 42 posiciones variables, 14 *singletons* y 28 posiciones parsimónicamente informativas. Los 52 haplotipos nucleotídicos codifican para 3 secuencias de 148 aminoácidos con 2 posiciones variables entre ellas, un *singleton* y una posición parsimónicamente informativa (Tabla 31).

Gen COI de <i>T. infestans</i>			
Identificación GB	Haplotipos nucleotídicos / aminoácidos del gen COI	Posiciones variables	
		nucleotídicas	Aa
		1111111111111111112222222233333333444	
		123448890011233445678900333466002345689123	68
		843891762512328140226812148315677954649898	80
		PSPSSSPSPPPPPPPPPSPPPPPSPSPSSSPSPSPPP	PS
P.E.	T.inf-COI.a/T.inf-COI.I	GCCTTGAAACCCCAATTTCAACGAGGATCTTCTATTATTC	VE
P.E.	T.inf-COI.b/T.inf-COI.II	.....A.....	I.
P.E.	T.inf-COI.c/T.inf-COI.I	A....G.G.T.T.G..CT.....C.....	..
P.E.	T.inf-COI.d/T.inf-COI.I	A....G.G.T.T.G..CT.....C.....	..
P.E.	T.inf-COI.e*/T.inf-COI.II	.....A.....CT	I.
P.E.	T.inf-COI.f*/T.inf-COI.I	.....CT	..
P.E.	T.inf-COI.i*/T.inf-COI.I	A....G...T.T.G..CT.....C...CT	..
P.E.	T.inf-COI.j*/T.inf-COI.I	A....G..T.....T.....C..C...CT	..
P.E.	T.inf-COI.k*/T.inf-COI.II	A....G...T.T.G..CT...A...C.....C...CT	I.
P.E.	T.inf-COI.l*/T.inf-COI.I	A....G...T.T.G..CT.....C.....C...CT	..
P.E.	T.inf-COI.m*/T.inf-COI.I	A....G.....G.....T.....T.....C...CT	..
P.E.	T.inf-COI.n*/T.inf-COI.I	A.T...G..T.T.....T.....C...CT	..
P.E.	T.inf-COI.h*/T.inf-COI.I	A....G.G.T.T.G..CT.....C...CT	..
HQ437704	T.inf-COI.aad/T.inf-COI.I	A....G...T.T.GCCT.....C.....CT	..
HQ437703	T.inf-COI.aac/T.inf-COI.I	A.....T.T.G..T.....C...CT	..
GQ479005	/T.inf-COI.I	A....G...T.T.....CT.....CG..CT	..
GQ479004	T.inf-COI.aaa/T.inf-COI.I	A....G...T.G...T.....T.....C...CT	..
GQ479003	T.inf-COI.az/T.inf-COI.I	.....G...A.....C...CT	..
GQ479002	T.inf-COI.ay/T.inf-COI.I	A...C.G..T.....T...G.....C...CT	..
GQ479001	T.inf-COI.ax/T.inf-COI.I	ATTCA...T.....T...G...T...C...CT	..
GQ479000	T.inf-COI.av/T.inf-COI.I	A....G..T.T.....T.....C...CT	..
GQ478999	T.inf-COI.au/T.inf-COI.I	A....G.T.T.G..CT.....C...CT	..
GQ478997	T.inf-COI.aq/T.inf-COI.I	A....G...T.T.G..CT.....C...CT	..
GQ478996	T.inf-COI.ap/T.inf-COI.I	.....G.....C...CT	..
GQ478995	T.inf-COI.ao/T.inf-COI.I	A....G...T.T.G..CT.....C...C.	..
GQ478993	T.inf-COI.al/T.inf-COI.I	A....G...T.T.....CT.....C...C...CT	..
FJ811848	T.inf-COI.Arg8/T.inf-COI.I	A....G.....G.....T.....T.....CT	..
FJ811847	T.inf-COI.Arg7/T.inf-COI.I	A....G..TT.T...CT...A.....C...CT	..
FJ811846	T.inf-COI.Arg6/T.inf-COI.I	A....G...T.T.....CT.....G.....C...CT	..
FJ811845	T.inf-COI.Arg4/T.inf-COI.I	A....G..T...T...T.....C...CCT	..
EF451040	T.inf-COI.LE 215/T.inf-COI.I	A....G...T.T.G..CT...A.....C...CT	..
EF451039	T.inf-COI.LE 214/T.inf-COI.I	A....G...T.T...CT.....C...CT	..
EF451038	T.inf-COI.LE 213/T.inf-COI.I	A....GG...T.T.G..CT.....C.....C...CT	..

EF451037	T.inf-COI.LE_220/T.inf-COI.II	A....G.G.T.T..G..CT...A.....C...CT	I.
EF451036	T.inf-COI.LE_218/T.inf-COI.I	A....G...T.T..G..CT.....G.C...CT	..
EF451034	T.inf-COI.LE_152/T.inf-COI.I	A....G.....T.....C...CT	..
EF451031	T.inf-COI.LE_333/T.inf-COI.I	A....G.G.T.T..G..CTG.....C...CT	..
EF451030	T.inf-COI.LE_128/T.inf-COI.I	A....G...TTT..G..CT.....C...CT	..
EF451029	T.inf-COI.LE_217/T.inf-COI.I	A....G...T.T...CT.....C...CT	..
EF451028	T.inf-COI.LE_156/T.inf-COI.I	A....G...T.T..GC.CT.....C...CT	..
EF451025	T.inf-COI.LE_579/T.inf-COI.I	A....G...T.T...CT.....C...CT	..
EF451024	T.inf-COI.LE_146/T.inf-COI.I	A....G...T.T..G..CTG.....C...CT	..
EF451023	T.inf-COI.LE_088/T.inf-COI.I	A....G.G.T.T..G..CT.....C...CT	..
EF451022	T.inf-COI.LE_089/T.inf-COI.III	A....G.G.T.T..G..CT...A.....C...CT	.K
EF451020	T.inf-COI.LE_118/T.inf-COI.I	A....G...T.T..G..CT...A...C...C...CT	..
EF451019	T.inf-COI.LE_039/T.inf-COI.I	A....G...T.T..G..CT.....C.C.C...CT	..
EF451017	T.inf-COI.LE_034/T.inf-COI.I	A....G..T.....C.T.....C...CT	..
EF451016	T.inf-COI.LE_031/T.inf-COI.I	A....G...T.T..G..CT.....C...CT	..
EF451011	T.inf-COI.LE_071/T.inf-COI.I	A....G..T...T...T.....C...CCT	..
EF451009	T.inf-COI.LE_197/T.inf-COI.I	.....C...CT	..
EF451008	T.inf-COI.LE_196/T.inf-COI.I	.....G.....C...CT	..
EF451007	T.inf-COI.LE_194/T.inf-COI.I	.....C...CT	..

**Tabla 31:** Alineamiento de las posiciones variables nucleotídicas halladas en las 446 pares de bases de los 52 haplotipos comparados del gen COI de *Triatoma infestans*. (Aa)= aminoácidos; (\*)= Nombre estandarizado para las agrupaciones de secuencias homólogas halladas en *GenBank*: T.inf-COI.e = agrupa 2 secuencias, T.inf-COI.f = 15, T.inf-COI.i = 13, T.inf-COI.j = 21, T.inf-COI.k = 31, T.inf-COI.l = 6, T.inf-COI.m = 2, T.inf-COI.n = 3, T.inf-COI.h = 14. La información sobre las secuencias se puede consultar en el Anexo IV; S= *singleton*; P= posiciones parsimónicamente informativas.

El gen COI de *T. infestans* es el más variable de todos los estudiados en Perú, se han encontrado tres haplotipos nucleotídicos: T.inf-COI.a que coincide con una secuencia de los Andes Bolivianos publicada en *GenBank*, T.inf-COI.b y T.inf-COI.f que también se localizan en los Andes Bolivianos y en el norte de Chile. El país con mayor variabilidad de haplotipos publicados del gen COI, hasta el momento, es Argentina con un total de 40.

### *Análisis de genética poblacional del gen COI*

Para el análisis de genética poblacional se han utilizado las secuencias de los 52 haplotipos comparados del gen COI de *T. infestans*. En total, se han utilizado 178 secuencias (32 procedentes de los ejemplares analizados en el presente estudio y 146 secuencias publicadas en *GenBank*). Los parámetros obtenidos y el total de las secuencias analizadas se muestran en la Tabla 32. Los análisis de genética poblacional se han aplicado al conjunto de todas las secuencias comparadas y además, se han aplicado por separado a las secuencias del grupo Andino y a las del no-Andino. Los resultados de los test de neutralidad en el análisis de todas las secuencias y en el grupo no-Andino

muestran valores negativos de D de Tajima no significativos y valores de  $F_s$  de Fu también negativos, pero significativos estadísticamente cuando son aplicados a toda la población, lo que indica un exceso de polimorfismos en baja frecuencia, que es un indicio de una expansión del tamaño poblacional. En el grupo Andino, los valores de los test de neutralidad son positivos y no significativos estadísticamente por lo que este grupo se encuentra bajo una disminución en el tamaño poblacional y/o una selección balanceante donde determinados polimorfismos prevalecen por encima de los demás.

Parámetros	Valores del análisis del gen COI en <i>T. infestans</i>		Valores del gen COI en el grupo Andino	Valores del gen COI en el grupo no-Andino
Nº de secuencias	178		43	135
Longitud (pb)	446		446	446
Nº de haplotipos	52		4	48
Hd	0,919		0,576	0,901
$\pi$	0,01395		0,00258	0,01061
S	42		3	42
K	6,22167		1,15172	4,73013
D de Tajima	-0,43617	p>0,1	1,41548 p>0,10	-1,16441 p>0,10
$F_s$ de Fu	-18,96	p<0,001	1,131 p>0,10	-24,700 p>0,10

**Tabla 32:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del gen COI del ADNmt en *Triatoma infestans*.

Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y  $F_s$  de Fu: test de neutralidad.

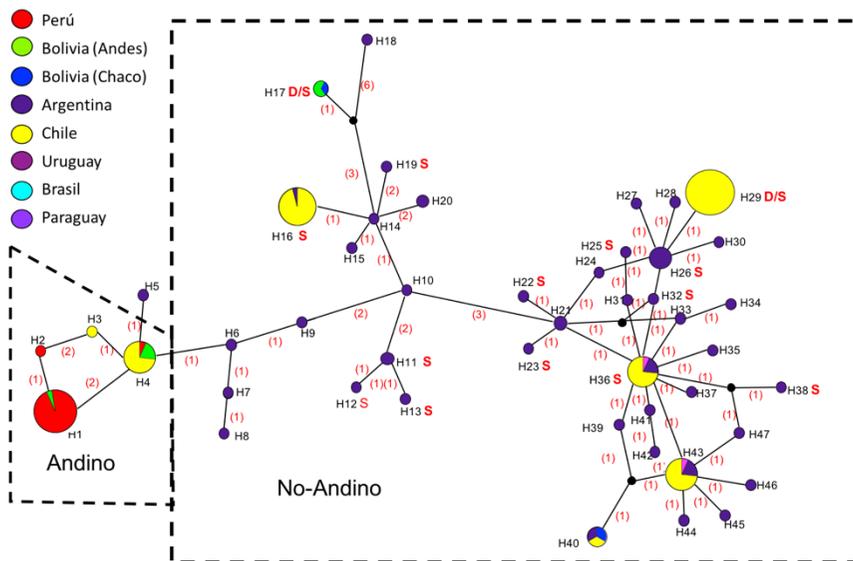
El estudio de la varianza molecular del gen COI se llevó a cabo mediante el test AMOVA anidado estructurando jerárquicamente las poblaciones de *T. infestans* en categorías de mayor a menor tamaño como: i) grupos Andino (incluye secuencias de Perú y los Andes Bolivianos) y no-Andino (incluye secuencias del resto de Bolivia, Chile, Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay); ii) países; y iii) poblaciones. Los resultados del test AMOVA revelan que el 52,99% de la varianza total fue debida a las diferencias entre grupos y un 42,49% a las diferencias entre poblaciones. El índice de fijación es similar entre grupos ( $\Phi_{CT}=0,52$ ) y poblaciones ( $\Phi_{ST}=0,57$ ), el valor del índice puede considerarse

intermedio por lo que se observa cierta estructura genética intermedia entre la panmixia y el aislamiento genético para este gen (Tabla 33).

AMOVA del gen COI							
Fuente de variación	GL	Suma de los cuadrados	Varianza de los componentes ( $\sigma^2$ )	Porcentaje de varianza		Índice de fijación	
Entre grupos	1	150,676	2,69425	52,99	$\Phi_{CT}$	0,52990	P>0,001
Entre países	4	28,343	0,22972	4,52	$\Phi_{SC}$	0,09611	p<0,001
Entre poblaciones	172	371,599	2,16046	42,49	$\Phi_{ST}$	0,57508	p<0,001
<b>Total</b>	<b>177</b>	<b>550,618</b>	<b>5,08443</b>	<b>100,0</b>			

**Tabla 33:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (*Nested* AMOVA) que mide la diversidad genética del gen COI de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10.000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a diferenciación genética dentro de las poblaciones.

Se ha obtenido una red de haplotipos Network del gen COI mediante *Median-Joining* en la que se pueden diferenciar dos grupos delimitados con recuadros negros. Este gen es el que más variabilidad ha mostrado para el grupo Andino (Perú, Andes Bolivianos y norte de Chile). Por primera vez, se observan varios haplotipos nucleotídicos peruanos que además codifican para secuencias aminoacídicas distintas. Se considera que el haplotipo ancestral en esta red es T.inf-COI.f (H4) ya que además de ser el más extendido geográficamente, es del que más haplotipos surgen y está conectado con ambos grupos. El grupo no-Andino tiene una distribución muy heterogénea con muchos haplotipos separados por escasos pasos mutacionales, lo que concuerda con los resultados de los test de neutralidad que apuntaban hacia un exceso de polimorfismos de baja frecuencia. Los haplotipos procedentes de ecotopos silvestres se localizan en el exterior de la red y aislados del resto. Los haplotipos Bolivianos se localizan en el exterior de la red aislados del resto. En un mismo haplotipo T.inf-COI.n (H17) se agrupan secuencias de todo Bolivia (Andes y Chaco) y de ecotopos silvestres y domiciliados. El haplotipo Argentino T.inf-COI.LE.197 (H5) pertenece al grupo no-Andino (Figura 29).



**Figura 29:** Red de haplotipos Network del gen mitocondrial COI de *Triatoma infestans* generada con el algoritmo *Median Joining*. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. Los puntos pequeños de color negro son vectores insertados por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de pasos mutacionales aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. **S** = haplotipos de especímenes silvestres; **D** = haplotipos de especímenes domésticos. Numeración de los haplotipos: H1: T.inf-COI.a; H2: T.inf-COI.b; H3: T.inf-COI.e; H4: T.inf-COI.f; H5: T.inf-COI.LE197; H6: T.inf-COI.LE194; H7: T.inf-COI.ap; H8: T.inf-az; H9: T.inf-COI.LE196; H10: T.inf-COI.LE152; H11: T.inf-COI.m (silvestre); H12: T.inf-COI.aaa (silvestre); H13: T.inf-COI.Arg8 (silvestre); H14: T.inf-COI.av; H15: T.inf-COI.LE034; H16: T.inf-COI.j (silvestre); H17: T.inf-COI.n (domiciliado y silvestre); H18: T.inf-COI.ax; H19: T.inf-COI.Arg4 (silvestre); H20: T.inf-COI.ay; H21: T.inf-COI.LE124; H22: T.inf-COI.Arg6 (silvestre); H23: T.inf-COI.aab (silvestre); H24: T.inf-COI.al; H25: T.inf-COI.aad (silvestre); H26: T.inf-COI.l (silvestre); H27: T.inf-COI.LE213; H28: T.inf-COI.LE039; H29: T.inf-COI.k (domiciliado y silvestre); H30: T.inf-COI.LE031; H31: T.inf-COI.LE156; H32: T.inf-COI.Arg7 (silvestre); H33: T.inf-COI.LE215; H34: T.inf-COI.LE118; H35: T.inf-COI.LE128; H36: T.inf-COI.i (silvestre); H37: T.inf-COI.LE218; H38: T.inf-COI.aac (silvestre); H39: T.inf-COI.ao; H40: T.inf-COI.c, T.inf-Coi.d; H41: T.inf-COI.LE146; H42: T.inf-COI.LE333; H43: T.inf-COI.h; H44: T.inf-COI.LE220; H45: T.inf-COI.LE089; H46: T.inf-COI.LE088; H47: T.inf-COI.au. Imagen modificada a partir del programa Network 5.0.0.1.





JN006793	T.inf-Cytb.XXXVI/ T.inf-Cytb.I	.....
JN006798	T.inf-Cytb.VII/ T.inf-Cytb.I	.....
GU807598	T.inf-Cytb.42/ T.inf-Cytb.II	.....PS.....
GU807597	T.inf-Cytb.41/ T.inf-Cytb.I	.....
GU807596	T.inf-Cytb.40/ T.inf-Cytb.III	.....PS.....N.....M.
GU807595	T.inf-Cytb.39/ T.inf-Cytb.IV	.....M.
GU807594	T.inf-Cytb.38/ T.inf-Cytb.V	.....S.....K.....
GU807593	T.inf-Cytb.37/ T.inf-Cytb.VI	.....N.....
GU807592	T.inf-Cytb.36/ T.inf-Cytb.VII	.....SV.....LSQS.....
GU807591	T.inf-Cytb.35/ T.inf-Cytb.VIII	.....
GU807590	T.inf-Cytb.34/ T.inf-Cytb.IX	.....F.....Y.....M.....
GU807589	T.inf-Cytb.33/ T.inf-Cytb.I	.....
GU807588	T.inf-Cytb.32/ T.inf-Cytb.X	.....G.....
GU807587	T.inf-Cytb.31/ T.inf-Cytb.XI	.....V.....S.....
GU807586	T.inf-Cytb.30/ T.inf-Cytb.XII	.....V.....N.....C.....
GU807585	T.inf-Cytb.29/ T.inf-Cytb.XIII	.....S.....V.....P.YT.S.....
GU807584	T.inf-Cytb.28/ T.inf-Cytb.XIV	.....V.....
GU807583	T.inf-Cytb.27/ T.inf-Cytb.XV	.....L.....
GU807582	T.inf-Cytb.26/ T.inf-Cytb.XVI	.....I.....L.EV.....
GU807581	T.inf-Cytb.25/ T.inf-Cytb.XVII	.....Y.....Q.....F.....
GU807580	T.inf-Cytb.24/ T.inf-Cytb.XVIII	.....F.....
GU807579	T.inf-Cytb.23/ T.inf-Cytb.XIX	.....I.....
GU807578	T.inf-Cytb.22/ T.inf-Cytb.XX	.....MS.....
GU807577	T.inf-Cytb.21/ T.inf-Cytb.XXI	.....P.....L.....N.....
GU807576	T.inf-Cytb.20/ T.inf-Cytb.XXII	.....M.....
GU807575	T.inf-Cytb.19/ T.inf-Cytb.XXIII	D.....N.....
GU807574	T.inf-Cytb.18/ T.inf-Cytb.XXIV	.....N.....
GU807573	T.inf-Cytb.17/ T.inf-Cytb.XXV	.....FV.F.....
GU807572	T.inf-Cytb.16/ T.inf-Cytb.XXVI	.....VY.....Y.....EF.....
GU807571	T.inf-Cytb.15/ T.inf-Cytb.XXVII	M.....V.....
GU807570	T.inf-Cytb.14/ T.inf-Cytb.XIX	.....I.....
GU807569	T.inf-Cytb.13/ T.inf-Cytb.XXVIII	.....MY.....
GU807568	T.inf-Cytb.12/ T.inf-Cytb.XXIX	.....S.....C.....I.....
GU807567	T.inf-Cytb.11/ T.inf-Cytb.XXX	.....Y.....
GU807566	T.inf-Cytb.10/ T.inf-Cytb.XXXI	.....L.....S.....I.....
GU807565	T.inf-Cytb.9/ T.inf-Cytb.XXXII	.....S.....S.....
GU807564	T.inf-Cytb.8/ T.inf-Cytb.XXXIII	.....Y.G.I.S.....
GU807563	T.inf-Cytb.7/ T.inf-Cytb.XXXIV	.....Y.....P.....D.....I.....
GU807562	T.inf-Cytb.6/ T.inf-Cytb.XXXV	.....Y.....
GU807561	T.inf-Cytb.5/ T.inf-Cytb.XXXVI	.....F.....N.....
GU807560	T.inf-Cytb.4/ T.inf-Cytb.XXXVII	.....I.....
GU807559	T.inf-Cytb.3/ T.inf-Cytb.I	.....
GU807558	T.inf-Cytb.2/ T.inf-Cytb.XVIII	.....F.....
AY062165	T.inf-Cytb.cBRA/ T.inf-Cytb.I	.....
EF639038	T.inf-Cytb.clone/T.inf-Cytb.I	.....
HQ848648	T.inf-Cytb.XL/ T.inf-Cytb.I	.....

**Tabla 35:** Alineamiento de las posiciones variables aminoácidas halladas en el fragmento de 149 aminoácidos de los 37 haplotipos para los que codifican el fragmento comparado del gen *Cyt b* de *Triatoma infestans*. P.E.= nuevos haplotipos hallados en el presente estudio; (\*)= agrupación de secuencias homólogas halladas en *GenBank* a las que se le ha dado un nombre estandarizado: T.inf-Cytb f= 2 secuencias; S= *singleton*; P= posiciones parsimónicamente informativas.

La distribución de los haplotipos completos hallados es: T.inf-Cytb.a en Perú y Bolivia, T.inf-Cytb.b en Argentina y Chile y T.inf-Cytb.c es exclusivo de Bolivia. El país con mayor variabilidad de haplotipos publicados, hasta el momento, del gen *Cyt b* de *T. infestans* es Bolivia con 40 haplotipos obtenidos como resultado de comparar las 12 muestras analizadas y las 55 secuencias del gen publicadas en *GenBank*.

*Análisis de genética poblacional del gen Cyt b*

Para el análisis de genética poblacional se han utilizado las secuencias de los 56 haplotipos comparados del gen *Cyt b* de *T. infestans*. En total se han utilizado 178 secuencias (126 procedentes de los ejemplares analizados en el presente estudio y 52 secuencias publicadas en *GenBank*). Los parámetros obtenidos y el total de las secuencias analizadas se muestran en la Tabla 36. Los análisis de genética poblacional se han aplicado al conjunto de todas las secuencias comparadas y además, se han aplicado por separado a las secuencias del grupo Andino y a las del no-Andino. Los resultados de los test de neutralidad aplicados al análisis de todas las secuencias de la población muestran valores negativos y estadísticamente significativos de  $D$  de Tajima y de  $F_s$  de  $F_u$  lo que indica un exceso de polimorfismos en baja frecuencia, que es un indicio de una expansión del tamaño poblacional. El grupo Andino solo tiene un haplotipo por lo que no se le pueden aplicar los test. El resultado de los test de neutralidad aplicados en el grupo no-Andino muestran valores negativos, estadísticamente negativos en la  $D$  de Tajima (al igual que en análisis de toda la población) y sin embargo, valores positivos y estadísticamente significativos para el test  $F_s$  de  $F_u$ , por lo que la población presenta menos mutaciones de las esperadas, que puede significar que o bien la población acaba de sufrir recientemente una situación de cuello de botella, y al reducirse la población hay menos variabilidad de la esperada o bien, hay una situación de selección dominante donde unos haplotipos predominan por encima de otros.

Parámetros	Valores del gen <i>Cyt b</i> en <i>T. infestans</i>		Valores del gen <i>Cyt b</i> Grupo Andino	Valores del gen <i>Cyt b</i> Grupo no-Andino
Nº de secuencias	178		115	63
Longitud (pb)	448		448	448
Nº de haplotipos	54		1	53
Hd	0,58		-	0,971
$\pi$	0,0109		-	0,01576
S	88		-	87
K	4,88326		-	7,06144
D de Tajima	-2,11523	p<0,001	Sin polimorfismos	-2,21719 p<0,01
$F_s$ de $F_u$	-25,28827	p<0,001	Sin polimorfismos	3,404 p<0,01

**Tabla 36:** Parámetros de variabilidad genética de las secuencias del gen *Cyt b* del ADNmt en *Triatoma infestans*. Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica expresada como la media de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias; S: número de sitios segregantes (mutaciones); k: media de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. D de Tajima y  $F_s$  de  $F_u$ : test de neutralidad.

El estudio de la varianza molecular del gen *Cyt b* se llevó a cabo mediante el test AMOVA anidado estructurando jerárquicamente las poblaciones de *T. infestans* en categorías de mayor a menor tamaño como: i) grupos Andino (incluye secuencias de Perú y los Andes Bolivianos) y no-Andino (incluye secuencias del resto de Bolivia, Chile, Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay); ii) países; y iii) poblaciones. Los resultados del test AMOVA revelan que el 57,12% de la varianza total fue debida a las diferencias entre grupos y un 27,74% a las diferencias entre poblaciones. El índice de fijación más elevado y significativo es el de las poblaciones ( $\Phi_{ST}= 0,72$ ) y entre grupos ( $\Phi_{CT}= 0,57$ ) en estos niveles según el gen *Cyt b*, *T. infestans* muestra que está estructurado genéticamente y que el flujo genético entre individuos es escaso (Tabla 33).

AMOVA del gen <i>Cyt b</i>						
Fuente de variación	GL	Suma de los cuadrados	Varianza de los componentes ( $\sigma^2$ )	Porcentaje de varianza	Índice de fijación	
Entre grupos	1	213,264	2,22490	57,12	$\Phi_{CT}$	0,57124 p>0,001
Entre países	5	34,130	0,58939	15,13	$\Phi_{SC}$	0,35294 p<0,001
Entre poblaciones	171	184,775	1,08056	27,74	$\Phi_{ST}$	0,72257 p<0,001
<b>Total</b>	<b>177</b>	<b>550,618</b>	<b>5,08443</b>	<b>100,0</b>		

**Tabla 37:** Análisis jerárquico anidado de la varianza molecular AMOVA (*Nested* AMOVA) que mide la diversidad genética del gen *Cyt b* de *Triatoma infestans*. GL: grados de libertad. Los índices estadísticos han sido calculados con una significación de 10. 000 permutaciones. Índices de fijación:  $\Phi_{CT}$ : asociado a diferenciación genética entre poblaciones;  $\Phi_{SC}$ : asociado a diferenciación genética dentro de los países;  $\Phi_{ST}$ : asociado a diferenciación genética entre poblaciones.

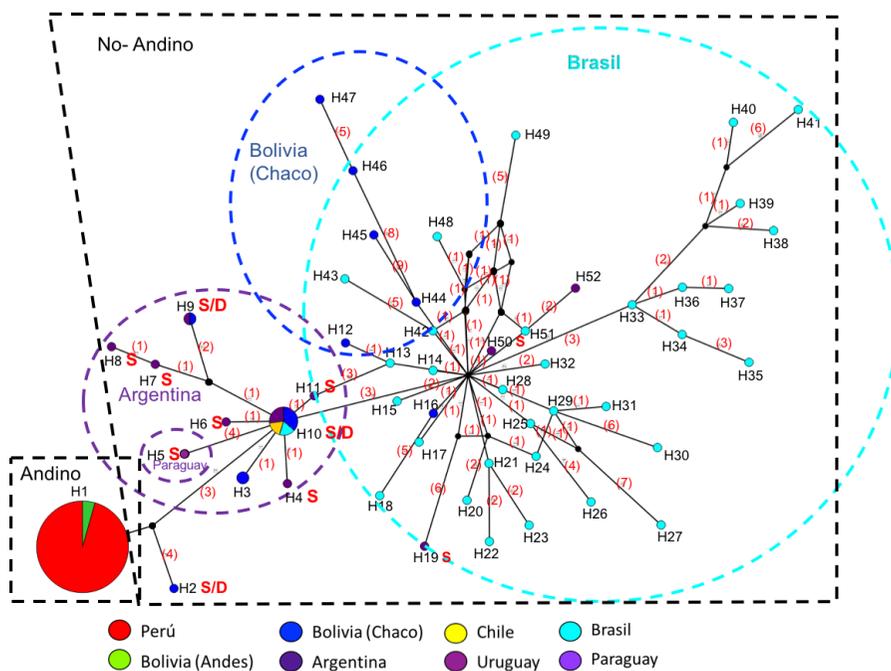
Se ha obtenido una red Network del gen *Cyt b* mediante *Median-Joining*. En el centro de la red se sitúa el haplotipo H10 que podría considerarse el ancestro y que engloba secuencias silvestres y domiciliadas procedentes de Bolivia, Argentina, Chile y Brasil. A partir de este, emergen ocho haplotipos, la mayoría con una separación de un solo paso mutacional, uno de ellos es el único haplotipo que el grupo Andino posee para este gen y el resto son del no-Andino. Este último grupo es muy heterogéneo pero sus haplotipos quedan distribuidos en la red por países, la mayoría de las separaciones entre haplotipos, dentro del grupo, se deben a un o dos pasos mutacionales, por lo que se refuerza el resultado negativo en el test D de Tajima, ya que hay un

elevado número de polimorfismos en baja frecuencia. La mayoría de los haplotipos que contienen secuencias procedentes de ecotopos silvestres se localizan cerca del haplotipo central (H10), el resto proceden de muestras domiciliadas y peridomiciliadas. En la red de haplotipos se puede observar como la variabilidad del gen es diferente en función del país. En Bolivia a pesar de ser el origen geográfico de la especie se detectan menos haplotipos que en otros países y los pasos mutacionales entre ellos son más elevados (Figura 30).

#### 3.7.2.5 Análisis comparado de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 del ADNmt

No existen resultados publicados sobre esta región en *T. infestans* en *GenBank*. Actualmente, como ya se ha comentado solo se han publicado dos genomas completos en vectores de la enfermedad de Chagas, el de *T. dimidiata* y el de *R. prolixus*, de este último solo se han publicado las secuencias de los genes codificantes del ADN mitocondrial por lo que no se tiene esta zona.

En la comparativa de las regiones intergénicas de *T. infestans* y *T. dimidiata* se observa que la longitud de ambas es distinta, mientras que *T. infestans* presenta 160 pb, *T. dimidiata* es más larga con 309 pb. Se observan además 211 posiciones variables de las cuales: 150 son debidas a indels, 5 son posiciones parsimónicamente informativas y 61 son *singletons*.



**Figura 30:** Red de haplotipos Network del gen mitocondrial *Cyt b* de *Triatoma infestans* estudiados generada con el algoritmo *Median Joining*. El área de cada haplotipo es proporcional al tamaño total de la muestra. Cada color representa un área geográfica. Los puntos pequeños de color negro son vectores insertados por el programa Network 5.0.0.1 para unir haplotipos. El número de mutaciones aparece indicado mediante números rojos entre paréntesis. **S** = haplotipos de especímenes silvestres. **S/D** = el haplotipo engloba especímenes silvestres y domiciliados. Numeración de los haplotipos: H1: *T.inf-Cytb.a*; H2: *T.inf-Cytb.e* (silvestre y domiciliado); H3: *T.inf-Cytb.d*; H4: *T.inf-Cytb.V* (silvestre); H5: *T.inf-Cytb.XL* (silvestre); H6: *T.inf-Cytb.XXVII* (silvestre); H7: *T.inf-Cytb.VII* (silvestre); H8: *T.inf-Cytb.VIII* (silvestre); H9: *T.inf-Cytb.f* (silvestre y domiciliado); H10: *T.inf-Cytb.b*, *T.inf-Cytb.c*, *T.inf-Cytb.XXXVI*, *T.inf-Cytb.Cbra*, *T.inf-Cytb.clone* (silvestre y domiciliado); H11: *T.inf-Cytb.II* (silvestre); H12: *T.inf-Cytb.39*; H13: *T.inf-Cytb.3*; H14: *T.inf-Cytb.33*; H15: *T.inf-Cytb.14*; H16: *T.inf-Cytb.37*; H17: *T.inf-Cytb.23*; H18: *T.inf-Cytb.25*; H19: *T.inf-Cytb.36*; H20: *T.inf-Cytb.21*; H21: *T.inf-Cytb.18*; H22: *T.inf-Cytb.31*; H23: *T.inf-Cytb.19*; H24: *T.inf-Cytb.5*; H25: *T.inf-Cytb.28*; H26: *T.inf-Cytb.17*; H27: *T.inf-Cytb.16*; H28: *T.inf-Cytb.32*; H29: *T.inf-Cytb.2*; H30: *T.inf-Cytb.30*; H31: *T.inf-Cytb.24*; H32: *T.inf-Cytb.15*; H33: *T.inf-Cytb.4*; H34: *T.inf-Cytb.6*; H35: *T.inf-Cytb.7*; H36: *T.inf-Cytb.11*; H37: *T.inf-Cytb.13*; H38: *T.inf-Cytb.12*; H39: *T.inf-Cytb.10*; H40: *T.inf-Cytb.9*; H41: *T.inf-Cytb.8*; H42: *T.inf-Cytb.27*; H43: *T.inf-Cytb.26*; H44: *T.inf-Cytb.41*; H45: *T.inf-Cytb.38*; H46: *T.inf-Cytb.42*; H47: *T.inf-Cytb.40*; H48: *T.inf-Cytb.22*; H49: *T.inf-Cytb.29*; H50: *T.inf-Cytb.35*; H51: *T.inf-Cytb.20*; H52: *T.inf-Cytb.34*. Imagen modificada a partir de la obtenida mediante el programa Network 5.0.0.1.

## 3.8 Discusión

### 3.8.1 Análisis de la evolución genética de la especie *T. infestans*

La distribución actual de la especie *T. infestans* es consecuencia de los movimientos humanos, sobretodo los que tuvieron lugar durante los siglos XIX y XX (Segura *et al.*, 2009). Estos movimientos incrementaron la variabilidad genética de la especie ya que favorecieron su introducción en nuevas áreas, lo que generó hibridaciones entre especies (Mas-Coma & Bargues, 2009). Los estudios genéticos de *T. infestans* pueden ayudar a entender la expansión geográfica y la domiciliación de estos triatominos, dos fenómenos estrechamente relacionados en la enfermedad de Chagas (Bargues *et al.*, 2006).

Se han aplicado los test de neutralidad Tajima y Fu a cada marcador de *T. infestans*. En el caso del valor D de Tajima, en la mayoría de los marcadores (excepto para ITS-1) es negativo; lo que indica que la especie en América del Sur ha sufrido recientemente una rápida expansión (Tajima, 1989), que podría deberse no solo a los movimientos humanos sino que también podría haberse producido tras un evento de cuello de botella, probablemente consecuencia de las campañas de control que han conseguido acabar con estos vectores en muchas zonas. Los valores de  $F_s$  de Fu para el ADNr son positivos y por el contrario, son negativos para el ADNmt. Los valores positivos muestran que la especie presenta pocos *singletons* (mutaciones) y por tanto, una baja variabilidad genética lo que sugiere que la especie ha sufrido un rápido descenso por ejemplo, tras una situación de cuello botella (Ramos-Onsins & Rozas, 2002; Joyce *et al.*, 2003; Holsinger, 2010) además, el ADNr presenta una tasa de mutación inferior y es más conservado que el ADNmt (Bargues & Mas-Coma, 1997; Bargues *et al.*, 2000; Mas-Coma & Bargues, 2009). Los valores negativos del ADNmt indican que la especie tras el drástico descenso se está recuperando, está en expansión (Ramos-Onsins & Rozas, 2002; Joyce *et al.*, 2003; Holsinger, 2010), lo que podría explicar la recolonización de domicilios en algunas zonas por *T. infestans* tras las intervenciones de control. La expansión poblacional se refleja mejor en el ADNmt puesto que evoluciona más rápido que el ADNr nuclear (Desalle *et al.*, 1987; Moriyama & Powel, 1997; Monteiro & Pierce, 2001), la mayoría de los cambios que se producen son

sustituciones nucleotídicas simples (Mas-Coma & Bargues, 2009) y por ello, el número de mutaciones es más elevado.

Los valores de los test de neutralidad, alejados del cero, indican que la especie no se encuentra bajo la teoría neutral. *T. infestans* se encuentra bajo selección disruptiva, las formas intermedias se han eliminado y actualmente la especie se divide en dos grandes poblaciones o grupos divergentes en función de su área geográfica mostrando una evolución diferente en cada grupo. En el estudio mediante test de neutralidad de las secuencias de cada grupo por separado, el grupo Andino, en la mayoría de los genes estudiados, o no presenta polimorfismos o presenta valores positivos, lo que quiere decir que se encuentra bajo presión selectiva. Las condiciones climáticas (temperaturas extremas, humedad,...), la altitud y las campañas de control han ejercido un efecto que ha hecho que solo unos pocos haplotipos puedan sobrevivir (Panzer *et al.*, 2004; Piccinali *et al.*, 2009; Torres-Pérez *et al.*, 2011; Waleckx *et al.*, 2011) además, puede que estos haplotipos descendan de las primeras poblaciones capaces de invadir domicilios (Bargues *et al.*, 2006) y por tanto, mantengan las características de estas poblaciones. El grupo no-Andino en los test de neutralidad presenta valores positivos en los marcadores ribosomales, ya que la evolución de estos dentro de una misma especie es más lenta (Desalle *et al.*, 1987; Moriyama & Powel, 1997; Monteiro & Pierce, 2001; Mas-Coma & Bargues, 2009), y esencialmente negativos en los mitocondriales, lo que quiere decir que contiene muchas secuencias (no necesariamente en alta proporción dentro de la población) con polimorfismos. Los resultados del grupo no-Andino coinciden con los del estudio del conjunto de la especie *T. infestans*, este grupo se haya encuentra bajo expansión poblacional tras el exterminio de las campañas de control vectorial aplicadas repetidamente en América del sur en las últimas décadas, que han tenido un fuerte impacto en estas áreas no-Andinas, ya que en algunos de estos países han logrado eliminar al vector (Noireau *et al.*, 2005; Costa, 1999). Los países en los que no han tenido éxito, las poblaciones remanentes siguen re-infestando domicilios y de ahí la expansión. Las variaciones genéticas observadas en la especie y su diferenciación está influenciada por varios factores y no solo por el rociamiento con insecticidas, existen factores como las extinciones locales y los eventos fundador que pueden actuar junto con los cuello de botella en la estructura genética de la especie (Segura *et al.*, 2009).

Para estudiar la estructura genética de las poblaciones de *T. infestans* se aplicó el test de varianza molecular anidado *Nested* AMOVA en cada marcador, con las poblaciones organizadas jerárquicamente por tamaños

como: grupo Andino (Perú y Andes Bolivianos) y grupo no-Andino (Chaco Boliviano, Argentina, Chile, Uruguay, Brasil y Paraguay), países y poblaciones. El análisis de la varianza molecular AMOVA evidencia que no se puede clasificar ni estructurar a la especie *T. infestans* por países sin embargo, se encuentra estructurada genéticamente en poblaciones y en dos grandes grupos: el Andino y el no-Andino. El índice de fijación en ambos niveles en la mayoría de los marcadores estudiados son superiores a 0,5 (cuanto más se acercan al valor 1 más estructura y aislamiento genético presenta la población (Holsinger & Weir, 2009). En la mayoría de los marcadores estudiados, el porcentaje de varianza observado entre grupos es superior al resto lo que quiere decir que la variabilidad entre poblaciones es superior a la intrapoblacional.

Los resultados mediante el algoritmo *Median - Joining* también muestran que la especie se diferencia en dos grupos alopátricos: el grupo Andino con un mayor contenido en ADN que se localiza en Perú, Bolivia y Norte de Chile; y el no-Andino con menor contenido en ADN por célula que se localiza en Bolivia, Argentina, Chile, Uruguay, Brasil y Paraguay (Dujardin *et al.*, 1998; Noireau *et al.*, 1999; Panzera *et al.*, 2004; Bargues *et al.*, 2006; Torres-Pérez *et al.*, 2011; Waleckx *et al.*, 2011). Esta dicotomía ya había sido puesta de manifiesto previamente, mediante estudios citogenéticos, filogenéticos y mediante bandas de heterocromatina-C (Panzera *et al.*, 2004, Bargues *et al.*, 2006). El origen geográfico de la especie se sitúa en los Andes Bolivianos y desde aquí las especies se dividen en dos grupos: el grupo Andino, más homogéneo y delimitado geográficamente; y el grupo no-Andino que ha sufrido una rápida expansión y aislamiento a través del Chaco, lo que ha supuesto una evolución acelerada que ha reducido el tamaño genómico y ha dado lugar a un mayor número de haplotipos, en la mayoría de los marcadores estudiados.

En cuanto al origen geográfico de la especie, la red de haplotipos obtenida por *Median -Joining* en todos los marcadores apunta a que se sitúa en Bolivia ya que este país se encuentra representado en todos los nodos considerados ancestros de la especie, que son los que se localizan en posiciones centrales y a partir de estos emergen el resto de haplotipos. Actualmente, uno de los mayores impedimentos para establecer el origen exacto, los Andes o el Chaco, es que la mayoría de los trabajos usan especies colectadas en ambientes domésticos y peridomésticos. Este tipo de poblaciones han sufrido transporte pasivo por humanos y rociamiento con insecticida, lo que ha marcado su evolución reciente. Por tanto, es necesario hacer más estudios que incluyan especies de ecotopos silvestres para dilucidar realmente el origen de la especie (Torres-Pérez *et al.*, 2011; Waleckx *et al.*, 2011).

### 3.8.1.1 Marcadores del ADNr

#### *ITS-1 del ADNr*

Los haplotipos hallados del ITS-1 no presentan polimorfismos en *T. infestans* por lo que se diferencian en su longitud y en los minisatélites que contienen, los cuales permiten distinguir no solo entre haplotipos, sino entre ecotopos (Bargues *et al.*, 2006; Piccinali *et al.*, 2011).

En el ITS-1, a diferencia del resto de marcadores, el grupo Andino es el más variable. Los test de neutralidad indican que la especie ha sufrido una drástica reducción. En cuanto a la red de haplotipos obtenida quedan en un extremo los haplotipos silvestres tipo dark morph del Chaco Argentino obtenidos por Piccinali y colaboradores (2011). Estos autores además, obtuvieron la secuencia del gen COI para estos ejemplares que se corresponden con los haplotipos (H25 y H38) en la red de haplotipos obtenida para el gen COI y al igual que en el ITS-1, se localizan en los extremos de la red con una sola conexión. Las poblaciones silvestres dark morph son consideradas de las más antiguas y por ello, han podido acumular más mutaciones que el resto (Piccinali *et al.*, 2011) y como resultado se sitúan en los extremos de la red. En la red de haplotipos del ITS-1 los vectores silvestres Argentinos y Bolivianos (*T.inf-HB*) tipo dark morph, no se relacionan lo que podría ser una prueba de la amplia distribución y el aislamiento de este tipo de *T. infestans* a lo largo del Chaco, aunque para asegurar esta hipótesis se necesitan analizar más ejemplares de distintos puntos (Piccinali *et al.*, 2011). El haplotipo *T.inf-HA* es el más extendido en toda América del Sur, ya que se ha encontrado en todos los países estudiados y además, es el único adaptado a todos los ecotopos. Por estas razones *T.inf-HA* parece que proviene de las poblaciones que originaron la colonización. El marcador ITS-1 en *T. infestans* es el marcador del que menos haplotipos se han encontrado.

#### *ITS-2 del ADNr*

El marcador ITS-2 contiene menos repeticiones en tándem de minisatélites lo que hace que su longitud sea más corta que la del ITS-1 sin embargo, presenta una mayor variabilidad genética, ya que se han encontrado

9 haplotipos entre los que sí hay polimorfismos, aunque en bajo número (Bargues *et al.*, 2006; Waleckx *et al.*, 2011).

Los bajos niveles de polimorfismo junto con los resultados de los test de neutralidad indican que el marcador ITS-2: i) o bien, ha sufrido una fuerte reducción del tamaño de población, por lo que se encuentra en una situación de colapso; ii) o bien este marcador es neutral (Waleckx *et al.*, 2011). El test AMOVA muestra que el flujo genético es escaso. La mayoría de los polimorfismos en el ITS-2 se observan exclusivamente en áreas No-Andinas (Waleckx *et al.*, 2011). Los haplotipos T.inf-H1 y T.inf-H4 se pueden considerar de los más antiguos puesto que están extendidos en las dos áreas estudiadas. El haplotipo T.inf-H4 ha sido hallado en áreas donde no había sido descrito previamente poniendo así de manifiesto la expansión del grupo no-Andino a través del Chaco.

#### *Región intergénica completa (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr*

La región intergénica comprende dos espaciadores transcritos internos (ITS-1 sin polimorfismos e ITS-2 con un bajo número de polimorfismos) que enmarcan el gen 5.8S, el cual es homólogo para toda la especie. Se han descrito 7 haplotipos de esta región en *T. infestans*: uno exclusivo de poblaciones silvestres (T.inf-CHB), cuatro para poblaciones domésticas (T.inf-CH2A, CH3A, CH4A y CH5A), 1 para domésticas y peridomésticas (T.inf-CH1C) y 1 para domésticas, peridomésticas y silvestres (T.inf-CH1A).

Los resultados de los test de neutralidad indican una fuerte reducción del tamaño de la población, en ambos grupos el número de haplotipos es bajo y en el caso del grupo no-Andino, a pesar de haber más variedad, ciertos haplotipos predominan por encima de otros reduciendo la variabilidad genética.

Los haplotipos Andinos (T.inf-HA, T.inf-HB y T.inf-HC) han estado sometidos a condiciones extremas de altitud y clima (Bargues *et al.*, 2006; Mas-Coma & Bargues, 2009), este hecho ha generado una presión selectiva sobre las poblaciones de forma que la variabilidad genética se ha visto reducida. Los haplotipos actuales proceden de las poblaciones originales que iniciaron la invasión de los peridomicilios y los domicilios (Mas-Coma & Bargues, 2009), las diferencias entre ellos se deben exclusivamente a la longitud de las secuencias

y se relacionan con sus ecotopos. El haplotipo más ampliamente extendido T.inf-CH1A se ha visto favorecido además de por las condiciones mencionadas, por las campañas de control vectorial que también han hecho una presión selectiva de forma que sólo el haplotipo más resistente se ha expandido.

Dentro de los haplotipos no-Andinos destaca T.inf-CH2A por su amplia distribución en todos los países no-Andinos, hecho que fue puesto de manifiesto previamente mediante estudios isoenzimáticos (Dujardin *et al.*, 1998). Esta homogeneidad se debe a la buena adaptación intradomiciliaria del haplotipo (Mas-Coma & Bargues, 2009), que le ha permitido llevar a cabo una rápida colonización del Chaco y también, puede que haya sido favorecida por las campañas de control vectorial que han erradicado algunas poblaciones de *T. infestans* (Scofield & Dias, 1999). El resto de haplotipos no-Andinos surgen como consecuencia del aislamiento y/o de la adaptación al domicilio de poblaciones de *T. infestans* (Bargues *et al.*, 2006).

Por tanto, los resultados del análisis de la región intergénica del ADNr en *T. infestans* muestran escasa variabilidad genética en el marcador que es debida: en parte, a que es ADNr y por tanto, al estudiar una única especie presenta escasa variabilidad (Mas-Coma & Bargues, 2009); y en parte, a la presión selectiva que ha sufrido *T. infestans* de forma que solo las poblaciones con alta capacidad de adaptación han sobrevivido.

#### 3.8.1.2 Marcadores del ADNmt

El ADNmt evoluciona más rápido que el ADNr. Por este motivo, las secuencias de *T. infestans* obtenidas de los genes mitocondriales son mucho más variables que las del ADNr. El orden en el que aparecen los genes en el trabajo va en función de la velocidad de evolución en triatominos, del más lento a más rápido (Mas-Coma & Bargues, 2009).

#### *Gen ribosomal 16S del ADNmt*

El marcador más conservado del ADNmt en triatomíneos es el gen ribosomal 16S (Mas-Coma & Bargues, 2009; Segura *et al.*, 2009). En el presente estudio el número de haplotipos y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y haplotípica (Hd) obtenidos para este gen son superiores a los del gen ND1.

Los test de neutralidad muestran que la especie ha sufrido una severa reducción de su población, seguramente consecuencia de los tratamientos con insecticida. A pesar de esta situación, el gran número de haplotipos y los escasos pasos mutacionales obtenidos en la red Network, junto con el valor de estos test en el gen 16S, indican que la especie está comenzando a recuperarse, sobretodo en algunas zonas. La rápida recuperación de la especie *T. infestans* tras una drástica reducción de la población causada por tratamientos con insecticidas, ya había sido puesta de manifiesto previamente en Argentina (García *et al.*, 2003) y en estudios basados en microsatélites en los que se llevaron a cabo test de heterocidad (Segura *et al.*, 2009).

#### *Gen ND1 del ADNmt*

El gen ND1 de *T. infestans* es hasta el momento, el gen mitocondrial que menos haplotipos genera ya que se han encontrado 5 en toda América del Sur. La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) hallada en este gen es la más pequeña de todos los marcadores estudiados por lo que podría estar saturado concentrándose los cambios en la última parte de la secuencia del gen (Mas-Coma & Bargues, 2009).

Los resultados de los test de neutralidad y los del AMOVA apuntan a que este gen mitocondrial está saturado. Los resultados test de neutralidad en lugar de coincidir con los del resto de marcadores del ADNmt, coinciden con los del ADNr es decir, la especie ha sufrido una disminución poblacional y se observa cómo hay haplotipos que predominan sobre otros. Los resultados del AMOVA muestran que según este gen los grupos Andino y no-Andino están muy diferenciados y los coeficientes de diferenciación muestran un escaso flujo genético en este gen.

La red de haplotipos obtenida por *Median – Joining* también ilustra la gran diferenciación entre grupos con un gran número de pasos mutacionales entre ellos y un bajo número de haplotipos a pesar de que han sido estudiados varios países. El grupo no-Andino es más variable y contiene por un lado, el haplotipo dark-morph, en el cual los cambios genómicos se traducen en cambios fenotípicos (Noireau *et al.*, 1999; Bargues *et al.*, 2006), y es el que más alejado está del resto con 14 pasos mutacionales porque o bien, procede de colonias antiguas y por ello puede haber acumulado más mutaciones (Piccinali *et al.*, 2011) o bien, puede ser resultado de un efecto fundador. Por otro lado, y con una separación de 11 pasos mutacionales se localiza el haplotipo T.inf-ND1.melanosoma que presenta también una coloración oscura, este grupo fue descrito en el Gran Chaco Argentino (Ceballos *et al.*, 2009) y en el presente estudio se ha encontrado en el Chaco Boliviano y en Chile. Inicialmente, se pensaba que T.inf-ND1.melanosoma era una especie diferente a *T. infestans* sin embargo, a través de diferentes estudios ambas especies fueron sinonimizadas (Lent *et al.*, 1994; Gumiel *et al.*, 2003; Mas-Coma *et al.*, 2009). T.inf-ND1.melanosoma podría ser el resultado de efecto fundador de *T. infestans* donde un alelo melánico recesivo putativo se fijó (Monteiro *et al.*, 1999). Este haplotipo se encuentra a unido a otros dos que presentan coloraciones normales y sin embargo, en la traducción en aminoácidos de todos ellos se genera la misma proteína. Estos haplotipos de *T. infestans* pueden derivar de un efecto fundador consecuencia de la expansión a través del Chaco y de la saturación del gen además, ponen de manifiesto que todos ellos pertenecen a la misma especie.

#### *Gen COI del ADNmt*

El gen COI de *T. infestans* es uno de los genes más estudiados y como consecuencia es el que mayor número de secuencias publicadas tiene y además, se han descrito haplotipos silvestres en diversos países como Bolivia, Argentina y Chile. La alta variabilidad de este gen lo convierte en uno de los más sensibles para el estudio de estructuras poblacionales (Piccinali *et al.*, 2009) de hecho, es el que presenta el valor de diversidad haplotípica (Hd) más elevado del estudio.

Los resultados de los test de neutralidad aplicados a todas las secuencias del gen COI y al grupo no-Andino son negativos lo que indica que la especie está en expansión y presenta un alto número de mutaciones pero en baja proporción por ello, a pesar del elevado número de haplotipos nucleotídicos comparados, únicamente se traducen en tres secuencias aminoacídicas distintas. Las poblaciones Andinas se encuentran bajo una reducción de su tamaño poblacional y por ello, un menor número de haplotipos se ven favorecidos.

Los resultados del test AMOVA para el gen COI muestran que el flujo genético es superior al del resto de marcadores y por ello, la variabilidad genética observada es mayor.

La red de haplotipos obtenida para el gen parcial COI de *T. infestans* por *Median - Joining* es muy heterogénea ya que hay un elevado número de haplotipos separados únicamente por 1 o 2 mutaciones. El gen COI es el que más haplotipos del grupo Andino contiene y en el caso de Perú, se han observado 3 distintos. La mayoría de las secuencias estudiadas para el gen COI de Bolivia son Andinas puesto que los ejemplares procedían de los valles de Cochabamba, los cuales han sido sometidos a rociamiento con insecticidas frente a malaria varias veces al año durante las últimas dos décadas, hecho que ha afectado a las poblaciones *T. infestans*. Éstas han sufrido repetidas reducciones drásticas en sus poblaciones y re-colonizaciones mediante efecto fundador de los domicilios, que han hecho que acumulen variaciones genéticas que ha aumentado su variabilidad genética (Piccinali *et al.*, 2009). Por ello, en la distribución en red se puede ver como algunos de estos haplotipos quedan distribuidos junto al grupo Andino y otros quedan aislados y fuera del grupo.

En el grupo no-Andino, a diferencia del resto de marcadores, Argentina es el país con mayor variabilidad en el gen COI de *T. infestans* con 31 haplotipos diferentes. La gran variabilidad observada en este gen se puede explicar mediante varias teorías: (1) las poblaciones de Argentina proceden de las poblaciones más antiguas de *T. infestans* y por ello han acumulado un gran número de mutaciones; (2) existen poblaciones que pueden actuar como reservorios de variabilidad genética durante el proceso de reinfestación; y (3) las poblaciones de *T. infestans* pueden dividirse en subpoblaciones dentro de las localidades por tanto, una población que es sometida a efecto fundador puede sufrir una serie de cambios causados por la deriva genética, que podrían preservarse en cada subpoblación manteniéndose así la variabilidad genética (Piccinali *et al.*, 2009). Las teorías 2 y 3 han sido apoyadas por otros autores

mediante diferentes técnicas como: el estudio de patrones de reinfestación espacio temporales (Cecere *et al.*, 2004); morfometría (Schachter-Broide *et al.*, 2004), y minisatélites (Marcet *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos en el presente estudio al aplicar los test de neutralidad y AMOVA, a todas las secuencias del gen COI y a las secuencias del grupo no-Andino, apoyan la teoría 3, tras una situación de cuello de botella como es el rociamiento con insecticida, los nichos vacíos pasan a ser ocupados por individuos que dan lugar a poblaciones que se expanden rápidamente y que hacen que se generen un alto número de haplotipos únicos. Además, según AMOVA este gen tiene un buen flujo genético lo que fomenta la aparición de mutaciones. Los haplotipos silvestres argentinos (tipo melanosoma) están separados por 1 o 2 mutaciones del resto por lo que a pesar de los cambios fenotípicos podrían interactuar con otros ejemplares peridomiciliados y domiciliados (Piccinali *et al.*, 2009), como ocurre en otros países como Bolivia o Chile, y dar lugar a cruzamientos y por tanto a resistencias. En el gen COI, los haplotipos bolivianos se localizan en los extremos, en uno de ellos se observa un haplotipo con secuencias de individuos domiciliados y silvestres bolivianos tanto de los Andes como del Chaco (T.inf-COI.n) que podrían ser un haplotipo ancestral que ha quedado aislado en el país consecuencia del acúmulo de mutaciones; en otro extremo se observa un haplotipo que puede ser uno de los que se extendieron a través del Chaco (T.inf-COI.c) y que además de ser hallado en los domicilios, también se encuentra en los peridomicilios. Chile es el país en el que más secuencias han sido publicadas y sin embargo, no es el país con mayor variabilidad de haplotipos. Chile también contiene haplotipos silvestres que se piensa que podrían ser resultado de una colonización desde poblaciones domésticas Argentinas que llegaron a través de movimientos humanos y que más tarde, cambiaron su ecotopo a silvestre. En Chile al igual que ocurre en Bolivia, también existen ejemplares del grupo Andino principalmente en la zona norte. Se han buscado híbridos en el país entre los dos linajes y no se han hallado. Argentina y Chile comparten numerosos haplotipos lo que refleja que el linaje no-Andino puede contener múltiples eventos de colonización desde Argentina o simplemente implica la retención de polimorfismos ancestrales (Torres-Pérez *et al.*, 2011).

### *Gen Cyt b del ADNmt*

El gen *Cyt b*, dentro del ADNmt, es el que más rápido evoluciona en triatomíneos (Mas-Coma & Bargues, 2009) por lo que su gran cantidad de polimorfismos permite que sea útil en estudios de estructura poblacional (Waleckx *et al.*, 2011). De los genes estudiados, este es el que más posiciones segregantes contiene (con un número similar de secuencias y longitud del fragmento comparado que el gen COI) sin embargo, la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) calculadas para este gen son menores que para el gen COI. Hasta el momento, se habían publicado solamente secuencias parciales de este gen, en el presente estudio se han obtenido por primera vez 3 haplotipos completos en diferentes países de América del Sur.

Los resultados de los test de neutralidad aplicados a todas las secuencias del gen *Cyt b* indican que la especie está en expansión poblacional y además, presenta un exceso de polimorfismos. Los resultados de la aplicación de los test de neutralidad a las secuencias de los grupos por separado señalan que la evolución de cada grupo es diferente. Las poblaciones del grupo Andino son homogéneas, no presentan polimorfismos, a pesar de la gran variabilidad característica de este gen. Las no-Andinas están bajo expansión poblacional y por ello hay numerosos haplotipos con pocas diferencias entre ellos.

Los resultados del test AMOVA también indican que la evolución en cada grupo es distinta puesto que el mayor porcentaje de varianza en el gen *Cyt b* se observa entre los grupos. Los índices de fijación muestran un menor flujo genético para este gen que en COI.

La red de haplotipos obtenida por *Median – Joining* para el gen *Cyt b* es la muy heterogénea y los haplotipos quedan separados por varios pasos mutacionales. El grupo Andino se agrupa en un solo haplotipo que se une a uno de los vectores insertados por el programa. En el grupo no-Andino los haplotipos quedan agrupados por países y en cada uno el número de pasos mutacionales que une los haplotipos es diferente. Los países en los que *T. infestans* se introdujo recientemente tienen menos pasos mutacionales entre haplotipos como es el caso de Brasil y además, se localizan más alejados del haplotipo ancestral.

Han sido hallados un elevado número de secuencias procedentes de vectores silvestres del gen *Cyt b* de *T. infestans*, la mayoría son de Argentina, concretamente de la región del Norte Grande Argentino (perteneciente al Gran

Chaco). Estas secuencias en la red quedan rodeadas de haplotipos del Chaco Boliviano algunos de los cuales también son silvestres y todos ellos a su vez rodean un haplotipo ancestral. Existen autores que defienden que el origen de la especie no se limita a Bolivia sino que se extiende por todo el Gran Chaco (Ceballos *et al.*, 2009) otros autores hablan sobre un segundo foco de dispersión, tras la dispersión inicial desde Bolivia, del grupo no-Andino localizado en Argentina (García *et al.*, 2003). Estas teorías se apoyan precisamente en la gran cantidad de colonias silvestres halladas en la zona del Gran Chaco, en estudios del ADN mt (García *et al.*, 2003) y en estudios del cariotipo de bandas-C (Panzer *et al.*, 2004; Barges *et al.*, 2006). El único haplotipo de Paraguay (T.inf-Cytb.XL) se localiza entre los del Gran Chaco. Este procede de ejemplares de *T. infestans* silvestres dark morph ( que son genética y fenotípicamente diferentes al resto de *T. infestans*) que precisamente se extienden a lo largo del Gran Chaco Boliviano y Argentino. En este caso, los ejemplares de los cuales procede este haplotipo son diferentes a los del Chaco Boliviano y similares a los del Argentino (tipo melanosoma), si bien es cierto que el Chaco Boliviano no se ha estudiado en toda su extensión (Rolon *et al.*, 2011).

En la comparativa de las 3 secuencias completas del gen Cyt *b* obtenidas de Perú, Bolivia, Argentina y Chile, se observan también los dos grandes grupos: el Andino formado por Perú y Bolivia (Andes) y el no-Andino formado por Argentina y Chile; con una variabilidad nucleotídica entre estos del 2,12%. Son necesarios más estudios del gen completo para poder determinar las características evolutivas que presenta dentro de la especie *T. infestans*.

#### *Región intergénica que separa los genes Cyt b y ND1 del ADNmt*

Es la primera vez que se estudia esta región en la especie *T. infestans*, previamente había sido descrita en el estudio del genoma mitocondrial completo de *T. dimidiata* donde fueron halladas 7 regiones con estas características, todas ellas con función desconocida (Dotson & Beard, 2003).

La variabilidad genética de esta región en los individuos estudiados es superior a la de los genes que la rodean (ND1 y Cyt *b*). Se observan también dos grupos distintos (Andino y no-Andino).

### 3.8.2 Estudio de la especie *T. infestans* en Perú

Diversos autores afirman que la especie *T. infestans* se introdujo en Perú a finales del siglo XIX desde el norte de Chile (Torrealva & Torrealva, 1945; Herrero, 1955) por los movimientos humanos que acontecieron en la guerra del Pacífico (1879-1883) (Escomel, 1917). A pesar de que Perú y Bolivia son países vecinos y este último sea el centro de dispersión de la especie, no se ha encontrado ni literatura, ni ejemplares en departamentos fronterizos entre los dos países, que indiquen una posible colonización directamente desde Bolivia. Sin embargo, existen documentos que detallan los movimientos humanos a partir de 1545 desde Potosí (Bolivia), uno de los centros mineros más importantes de América de Sur, hasta el norte de Chile y de ahí a las sierras del sur de Perú (Pease, 1992), por lo que hacen pensar que quizá la llegada de este insecto a Perú podría ser anterior a lo datado hasta el momento. En la comparativa de las secuencias de ADN entre países únicamente, se ha podido observar la relación entre los haplotipos del norte de Chile y Perú en la región intergénica del ADN<sub>r</sub> y en el gen COI. En ambos casos, o comparten haplotipos, o se han observado numerosas similitudes entre ellos y en la red de haplotipos que producen se localizan cercanos o incluso forman parte del mismo haplotipo. En el resto de marcadores, no se han podido relacionar ambos países porque no se han encontrado secuencias que procedan de la región norte de Chile.

El estudio multigénico de la especie *T. infestans* en Perú muestra que presenta una gran homología genética que puede ser consecuencia de una reciente propagación de la especie (Dujardin *et al.*, 1998; Monteiro *et al.*, 1999; Marcilla *et al.*, 2001; Bargues *et al.*, 2006; Segura *et al.*, 2009; Torres-Pérez *et al.*, 2011), que está condicionada por los movimientos migratorios humanos, de los campos a las ciudades, y por las condiciones de las nuevas áreas colonizadas (Mas-Coma & Bargues, 2009). La distribución de esta especie en Perú se limita al suroeste y hasta el momento sus ecotopos son domésticos y peridomésticos, no se han encontrado poblaciones silvestres. Actualmente, la infestación de los domicilios está cambiando de ambiente rural a urbano. Todos los haplotipos hallados son Andinos y a pesar de haber sido colectados en un amplio rango de altitudes y en diferentes departamentos, no se han observado polimorfismos. El único gen de *T. infestans* variable en Perú es el gen COI ya que se han encontrado 3 haplotipos distintos. Este gen permite observar la historia de la expansión de la especie *T. infestans* a través de los Andes y en

Perú. Por un lado, el haplotipo peruano T.inf-COI.f muestra la expansión geográfica desde los Andes, a través del norte de Chile hasta Perú (Usinger *et al.*, 1966; Noireau *et al.*, 1999, 2005; Panzera *et al.*, 2004; Bargues *et al.*, 2006), ya que está relacionado con ejemplares domésticos y silvestres de los Andes Bolivianos y con ejemplares domésticos de la Región de Tarapacá al norte de Chile. Por otro lado, los otros dos haplotipos muestran la evolución de la especie dentro del país. El haplotipo T.inf-COI.a muestra la misma distribución que el resto de genes, está extendido prácticamente por todos los departamentos donde ha sido hallado *T. infestans* y en todas las altitudes. El haplotipo T.inf-COI.b (con una sola mutación nucleotídica con respecto a T.inf-COI.a que genera diferencias en su traducción) se limita a Arequipa y Moquegua, departamentos que junto a Tacna forman parte de los programas de control implementados en la macro región sur, los cuales hacen especial hincapié en el control químico (Cabrera, 2005). Esta distribución sugiere que el haplotipo T.inf-COI.b ha surgido como consecuencia de las medidas de control aplicadas en Perú y es más resistente a los insecticidas.

La rápida tasa evolutiva del gen *Cyt b* no se ve reflejada en los resultados obtenidos en Perú puesto que a diferencia del gen COI, solo se ha hallado un haplotipo. Puede que las campañas de control vectorial, en este caso, estén ejerciendo presión selectiva de forma que solo el haplotipo T.inf-Cytb.a es capaz de sobrevivir y expandirse en el país.

Las campañas de control vectorial instauradas en la macro región Sur concretamente en Arequipa, Moquegua y Tacna, departamentos en los que solamente se ha citado *T. infestans*, han tenido éxito en Tacna puesto que no se detectan nuevos casos desde 2014 y en las últimas expediciones no se ha podido recoger ningún ejemplar en este departamento. En Moquegua parece que también se va a lograr este hito ya que en el año 2016 solamente se registró un caso, y en el presente año todavía no hay constancia de ninguno, si bien es cierto que todavía siguen encontrándose especímenes de *T. infestans*. Arequipa sigue siendo el departamento en el que más casos se registran al año, desde 2004 hasta la fecha, el número se ha visto enormemente reducido principalmente gracias a estas campañas pero siguen apareciendo nuevos casos cada año. Este resultado puede tener relación con el cambio de ambiente rural a urbano que está sufriendo esta especie en la ciudad de Arequipa.

El nuevo reto en la lucha contra *T. infestans* es la urbanización de la enfermedad (Levy *et al.*, 2006; Bowman *et al.*, 2008; Foley *et al.*, 2013; Barbu *et al.*, 2013, 2014; Náquira, 2014; Khatchikian *et al.*, 2015) hecho que está

teniendo lugar en la ciudad de Arequipa. Las ciudades ofrecen nuevos ecosistemas donde las poblaciones de *T. infestans* evolucionan de forma diferente a como lo hacen en medio rural. Las campañas de control vectorial en las ciudades deben aplicarse de forma diferente a como se hacen en los medios rurales. En las ciudades la fumigación inicial debe centrarse en el bloque donde fue detectada la infestación por primera vez (Levy *et al.*, 2006; Khatchikian *et al.*, 2015). Una mejor comprensión de las interacciones sociales y migratorias de los residentes de casas infestadas puede mejorar la perspectiva de eliminar al vector en ambientes urbanos (Khatchikian *et al.*, 2015).

El hecho de que la especie *T. infestans* sea de reciente introducción en Perú y por tanto esté en proceso de adaptación, su distribución esté delimitada y los ecotopos sean domésticos y peridomésticos puede facilitar el éxito de las campañas de control vectorial. El hecho de que esta especie haya sido eliminada en Tacna y se haya interrumpido la transmisión vectorial en Moquegua son claros ejemplos de los buenos resultados de un planteamiento adecuado de las campañas de control. Sin embargo, los progresos más importantes en la eliminación de *T. infestans* han sido llevados a cabo en los países no-Andinos: Uruguay ya está libre de *T. infestans* y países como Chile, Brasil o Paraguay han logrado interrumpir la transmisión vectorial. Parece que el grupo no-Andino es más sencillo de eliminar, quizá porque su expansión es más reciente o porque presentan menor contenido de ADN por célula (Bargues *et al.*, 2006). Es necesario crear campañas de control vectorial con sistemas de vigilancia que estén adaptadas a las nuevas sociedades.



Capítulo 4. Análisis de las  
especies del género  
*Panstrongylus* de Perú



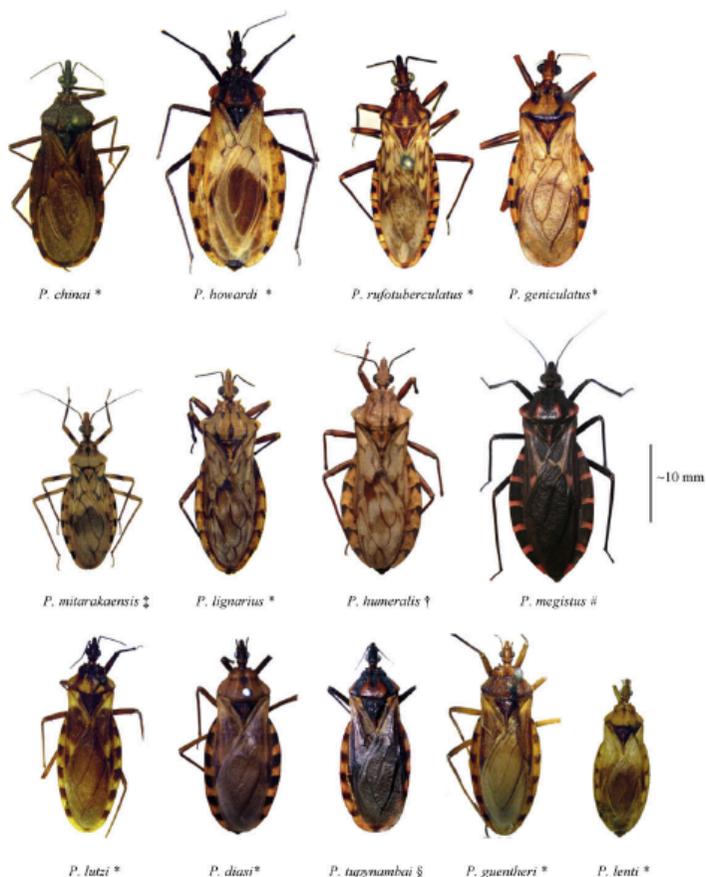
## 4.1 Características generales del género *Panstrongylus*

El género *Panstrongylus* se compone de 13 especies, muchas de las cuales están implicadas en la transmisión de *T. cruzi* a humanos en América Central y del Sur (Lent & Wygodzinsky, 1979; Jurberg *et al.*, 2001; Marcilla *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003; Jurberg & Galvão, 2006; Patterson *et al.*, 2009; Cavassin *et al.*, 2014) (Tabla 38). Parte de las diferencias morfológicas entre especies del género son consecuencia de la adaptación a los ecotopos domésticos (Figura 31). La mayoría de las especies son silvestres se encuentran asociadas a una gran variedad de hábitats y de animales silvestres (muchos de ellos reservorios de *T. cruzi*). Existen especies con un fuerte comportamiento sinantrópico, es decir, con tendencia a invadir domicilios y establecer colonias domésticas como: *P. megistus*, *P. geniculatus*, *P. rufotuberculatus*, *P. chinai* o *P. lignarius/herreri*; otras, son oportunistas como *P. lignarius* en el Amazonas brasileño ya que vuela de ecotopos silvestres a domicilios, si tiene la oportunidad, pero no los coloniza. El género *Panstrongylus* actúa como vector en la transmisión de *T. cruzi* silvestre a humanos y actualmente, se encuentra en proceso de domiciliación por ello es uno de los objetivos en el control de la enfermedad de Chagas (Schofield *et al.*, 1999; Cuba *et al.*, 2002, Patterson *et al.*, 2009).

- |   |  |
|---|--|
| 1. <i>Panstrongylus chinai</i> Del Ponte, 1929<br><i>Triatoma chinai</i> Del Ponte, 1929<br><i>Panstrongylus turpiali</i> Lent, 1997  | 9. <i>Panstrongylus lutzi</i> Neiva & Pinto, 1923<br><i>Triatoma lutzi</i> Neiva & Pinto, 1923<br><i>Panstrongylus sherlocki</i> Jurberg,<br>Carcavallo & Lent, 2001   |
| 2. <i>Panstrongylus diasi</i> Pinto & Lent, 1946  |  |
| 3. <i>Panstrongylus geniculatus</i> Latreille, 1811<br><i>Reduvius geniculatus</i> Latreille, 1811<br><i>Conorhinus lutulentus</i> Erichson, 1848<br><i>Conorhinus geniculatus</i> Walker, 1873<br><i>Lamus geniculatus</i> Stal, 1859<br><i>Mestor geniculatus</i> Brindley, 1931<br><i>Triatoma geniculata</i> Chagas 1912<br><i>Conorhinus lutulentes</i> Erichson, 1848<br><i>Conorhinus corticalis</i> Walker, 1873<br><i>Triatoma tenuis</i> Neiva, 1914<br><i>Triatoma fluminensis</i> Neiva & Pinto, 1922<br><i>Panstrongylus parageniculatus</i> Ortiz, 1971 | 10. <i>Panstrongylus megistus</i> Burmeister, 1835<br><i>Conorhinus megistus</i> Burmeister, 1835<br><i>Lamus megistus</i> Stal, 1859<br><i>Conorhinus gigas</i> Burmeister, 1861<br><i>Conorhinus porrigens</i> Walker, 1873<br><i>Triatoma africana</i> Neiva, 1911<br><i>Triatoma megista</i> Neiva, 1911<br><i>Triatoma wernickei</i> Del Ponte, 1923<br><i>Triatoma megista</i> var. <i>wernickei</i> Del Ponte, 1930<br><i>Panstrongylus africanus</i> Pinto, 1931<br><i>Mestor megistus</i> Usinger, 1944<br><i>Panstrongylus megistus leucofasciatus</i> |

4. <i>Panstrongylus guentheri</i> Berg, 1879 <i>Triatoma guentheri</i> Neiva, 1914 <i>Panstrongylus güntheri</i> Berg, 1879 <i>Panstrongylus larroussei</i> Pinto, 1931 <i>Panstrongylus seai</i> Pinto, 1931 <i>Triatoma larroussei</i> Pinto, 1925 <i>Triatoma seai</i> Del Ponte, 1929	<i>Lucena, 1959</i>
5. <i>Panstrongylus howardi</i> Neiva, 1911 <i>Triatoma howardi</i> Neiva, 1911	11. <i>Panstrongylus mitarakaensis</i> Bérenger & Blanchet, 2007
6. <i>Panstrongylus humeralis</i> Usinger, 1939	12. <i>Panstrongylus rufotuberculatus</i> Champion, 1899 <i>Lamus rufotuberculatus</i> Champion, 1899 <i>Triatoma rufotuberculata</i> Neiva, 1914 <i>Triatoma coxo-rufra</i> Campos, 1932 <i>Mestor rufotuberculatus</i> Usinger, 1939
7. <i>Panstrongylus lenti</i> Galvão & Palma, 1968	13. <i>Panstrongylus tupynambai</i> Lent, 1942
8. <i>Panstrongylus lignarius</i> Walker, 1873 <i>Triatoma lignarius</i> Walker, 1873 <i>Panstrongylus herreri</i> Wygodzinsky, 1948	

**Tabla 38:** Listado de las 13 especies del género *Panstrongylus* y las especies con las que establecen sinonimias. Tabla modificada (Patterson *et al.*, 2009).



**Figura 31:** Fotografías de las 13 especies formadoras del género *Panstrongylus*. (Patterson *et al.*, 2009).

#### 4.1.1 Origen y dispersión

El género *Panstrongylus* se agrupa junto con *Triatoma* y otros 7 géneros en la Tribu Triatomini (Hypsa *et al.*, 2002; Marcilla *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2009). La primera especie descrita de este género fue *P. guentheri* Berg, 1879. Después de *Triatoma* y *Rhodnius* es el tercer género de la subfamilia Triatominae con el mayor número de especies. La distribución geográfica de este género es amplia ya que ocupa desde México hasta Argentina. En total, se han encontrado especies de *Panstrongylus* en 18 países de América del Sur incluyendo algunas islas Caribeñas. Las especies con la distribución más amplia son *P. geniculatus* (encontrado en 19 países), seguido de *P. rufotuberculatus* (10 países) y *P. lignarius/herrerii* (7 países) (Patterson *et al.*, 2009).

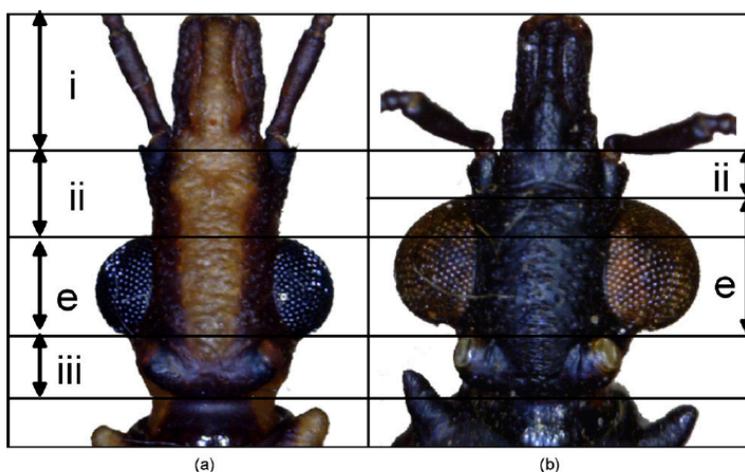
Lent y Wygodzinsky (1979) estudiaron las relaciones intragenéricas entre las especies de *Panstrongylus* construyendo un dendrograma basado en 21 caracteres. Las especies quedaron agrupadas por su distribución geográfica en 2 clados: el del norte (*P. geniculatus*, *P. rufotuberculatus*, *P. chinai*, *P. howardi*, *P. megistus*, *P. humeralis*, *P. lignarius* y *P. lignarius/herrerii*) y el del sur (*P. guentheri*, *P. diasi*, *P. lutzii*, *P. lenti*, *P. tupynambai* y *P. megistus*). Además, esta distribución ha sido apoyada por estudios morfológicos, moleculares y citogenéticos, excepto en el caso de *P. megistus* que se encuentra en ambos clados y presenta unos resultados citogenéticos diferentes al resto de especies (Cossa *et al.*, 2002; Patterson *et al.* 2009).

#### 4.1.2 Morfología y biología

Existen evidencias moleculares que indican que algunas especies de *Panstrongylus* comparten más ancestros comunes con ciertas especies del género *Triatoma* que con algunas de su propio género (Patterson *et al.*, 2009). El primer patrón morfológico que se describió en *Panstrongylus* fue la cabeza, concretamente los tubérculos anteníferos que se sitúan cerca del margen anterior del ojo (Lent & Wygodzinsky, 1979). Una comparación morfométrica de la forma de la cabeza de distintas especies de *Panstrongylus* apoyó que existe una división entre las especies procedentes del norte y del sur. Además

de tener las antenas insertadas cerca de los ojos, las cabezas de *Panstrongylus* son consideradas a menudo relativamente pequeñas. En muchos casos las especies de *Panstrongylus* tienen los ojos más grandes proporcionalmente al tamaño de la cabeza y la talla de su cuerpo (Figura 32). Una interpretación funcional de este hecho es que el gran tamaño de los ojos se consideran una adaptación a la iluminación tenue (Patterson *et al.*, 2009).

En ciertas especies de *Panstrongylus* en las que los ojos son más pequeños, las cabezas tienen una cierta apariencia de *Triatoma* de hecho, durante su desarrollo, las ninfas de estos dos géneros se pueden confundir, como ocurre con *P.rufotuberculatus* (Patterson *et al.*, 2009).



**Figura 32:** Comparación de las cabezas de dos ejemplares adultos de: (a) *Triatoma vitticeps* y (b) *Panstrongylus megistus*. Las imágenes están escaladas a la misma longitud, se observa como el tubérculo antenífero (ii) es más largo en el género *Triatoma* (a) y las antenas quedan más separadas de los ojos, mientras que en *Panstrongylus* (b), los ojos son más grandes, el tubérculo es más pequeño y las antenas quedan más cerca de los ojos (Patterson *et al.*, 2009).

Actualmente, hay menos información sobre la biología de *Panstrongylus* que sobre otros géneros ya que históricamente, se consideraba que la mayoría eran especies silvestres y por tanto, no estaban envueltas en la transmisión humana (Patterson *et al.*, 2009). De las 13 especies que componen el género, 12 han sido encontradas de forma natural infectadas con *T. cruzi*

(Cavassin *et al.*, 2014). A continuación, se citan los ecotopos descritos para cada una de las especies (Patterson *et al.*, 2009):

- Cuatro especies son capaces de desarrollar colonias domésticas y ser infectadas por *T. cruzi*: *P. megistus* (vector con una gran importancia epidemiológica puesto que fue el primer vector descrito de la enfermedad de Chagas), *P. rufotuberculatus*, *P. chinai* y *P. lignarius/herrerii*.
- La especie *P. lenti* ha sido encontrada en domicilios de Brasil pero no se tienen datos sobre si puede estar infectada por *T. cruzi*.
- Seis especies son silvestres y se encuentran ocasionalmente en domicilios: *P. geniculatus*, *P. lutzi*, *P. howardi*, *P. guentheri*, *P. humeralis* y *P. diasi*. Todas ellas excepto *P. diasi* han sido encontradas infectadas con *T. cruzi*.
- Dos especies han sido descritas como exclusivamente silvestres e infectadas con *T. cruzi*: *P. lignarius* procedente del Amazonas brasileño (sinonimizado con *P. herrerii*) (Marcilla *et al.*, 2002), realmente se considera que es oportunista, a pesar de vivir en ambientes silvestre es capaz de ser encontrada en domicilios, sin llegar a colonizarlos; y *P. tupyambai* es considerada estrictamente silvestre.
- La especie *P. mitarakaensis* de la cual se ha encontrado un ejemplar en un afloramiento de granito en las montañas en la Guayana Francesa (costa norte de América del Sur), con formas epimastigotas y tripomastigotas que morfológicamente coincidían con *T. cruzi* (Bérenger & Blanchet, 2007).

La infección natural por *T. cruzi* ha sido detectada en 12 de las 13 especies del género *Panstrongylus*. Se han registrado tasas de infección altas que podrían indicar la cercana proximidad a los hospedadores reservorio y la alta susceptibilidad a *T. cruzi* por parte de estos vectores como ocurre con *P. megistus* en Brasil o *P. lignarius/herrerii* en Perú. Las fuentes alimentarias también son importantes a la hora de controlar el ciclo de estas especies, seis especies (*P. megistus*, *P. geniculatus*, *P. lignarius/herrerii*, *P. rufotuberculatus*, *P. lutzi* y *P. tupyambai*) son capaces de alimentarse de humanos, mientras que de otras especies (*P. diasi* y *P. howardi*) se tiene la sospecha de que efectivamente, también pueden alimentarse de sangre humana (Patterson *et al.*, 2009).

Las especies con mayor importancia epidemiológica son aquellas que colonizan domicilios, existen estudios que reportan el aumento en la frecuencia con la que algunas especies invaden hogares como *P. rufotuberculatus*, *P. geniculatus*, *P. lutzi* y *P. chinai* (Dos Santos *et al.*, 2003).

#### 4.1.3 Estudios genéticos previos

Los estudios filogenéticos moleculares llevados a cabo en especies de *Panstrongylus* sugieren que el género puede ser representado como un ensamblaje polifilético de especies convergentes ya que existe una estrecha relación entre *P. lignarius/herrerii* y las caribeñas “Nesotriatoma” formado por *Triatoma flavida* y otros (Hypsa *et al.*, 2002); y los linajes de *Triatoma* procedentes de Norte América están más relacionados con *Panstrongylus spp.* del norte en particular, con *P. rufotuberculatus* (Marcilla *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2009).

Desde que se estableció que el género *Panstrongylus* es un taxón morfológicamente bien definido, se han llevado a cabo diversos estudios genéticos, de distribución geográfica y morfológicos que apuntan a que las especies de este género no forman un único clado monofilético, lo que muestra el reciente origen del género *Panstrongylus* y su evolución (Marcilla *et al.*, 2002). Hypsa y colaboradores (2002) estudiaron la filogenia de Triatominae mediante la unidad ribosomal 16S y situaron el clado *Panstrongylus* entre *Triatoma*; Marcilla y colaboradores (2002) mediante el estudio del ITS-2 también citan la estrecha relación entre estos géneros, de hecho apuntan a que *Panstrongylus* está relacionado con los ancestros que dieron lugar por un lado, a las especies de *Triatoma* de América del Norte y por otro, a las de América del Sur. Estudios llevados a cabo mediante electroforesis enzimática (Dórea *et al.*, 1982) y microscopía electrónica (Carcavallo *et al.*, 1994) confirman la posición taxonómica de *Panstrongylus* entre especies de *Triatoma*. La distribución geográfica de especies de *Panstrongylus* en América Central y/o en el norte de América del Sur (*P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. humeralis*, *P. lignarius/herrerii*, y *P. rufotuberculatus*) y la gran distribución de *T. flavida* sugieren que una posición “intermedia” del clado *Panstrongylus* puede encajar bien en la dicotomía entre las especies del norte y del sur de América (Hypsa *et al.*, 2002). Estos resultados, unidos a las diferencias morfológicas halladas

principalmente en las alas, indican que el cluster *Panstrongylus* no está aislado del de *Triatoma* (Oliveira *et al.*, 2007).

## 4.2 Distribución actual de especies del género *Panstrongylus* en Perú

En Perú se han encontrado 4 especies de *Panstrongylus*: *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri* y *P. rufotuberculatus* (Cuba *et al.*, 2002; Cabrera, 2006; Chavez, 2006; Patterson *et al.*, 2009) se sabe que todas estas especies se encuentran en domicilios y peridomicilios y que además de humanos, se alimentan de otros animales.

### 4.2.1 *Panstrongylus chinai*

*P. chinai* (Figura 33) se encuentra en Venezuela, Ecuador y Perú (Patterson *et al.*, 2009). Existen estudios que confirman que *P. chinai* era exclusivamente silvestre sin embargo, cada vez se encuentra en más domicilios (Marcilla *et al.*, 2002; Grijalva *et al.*, 2015). En Perú, este vector se considera secundario (Cuba *et al.*, 2002) y su distribución se limita a: Tumbes, Piura, Cajamarca, Amazonas, Lambayeque, La Libertad, Ancash, Lima y Loreto (Pollack *et al.*, 2001; Cuba *et al.*, 2002; Cabrera, 2006; Chavez, 2006; Patterson *et al.*, 2009) Este vector también ha sido citado en Venezuela con el nombre de *P. turpiali* (Figura 34).



Figura 33: Macho adulto de *Panstrongylus chinai*.



**Figura 34:** Mapa de la distribución de *Panstrongylus chinai* en Perú. Se marcan en color gris los departamentos de Perú en los que se ha encontrado este vector, a la izquierda aparecen los nombres de cada departamento con su correspondiente numeración.

Las zonas ecológicas en las que se encuentra esta especie en Perú son desiertos tropicales y premontanos además de, zonas de matorral desérticas, tropicales y premontanas cuyas lluvias anuales van desde los 0 a los 500 metros cúbicos y las temperaturas oscilan entre los 15 y los 30°C. Por otro lado, la altitud de estas zonas va desde los 0 a los 2.500 metros sobre el nivel del mar (Cuba *et al.*, 2002).

Las fuentes alimentarias silvestres de este vector se desconocen pero se sabe que puede alimentarse de gallinas y otros animales domésticos. En Perú, los adultos de *P. chinai* han sido encontrados en casas, al igual que en Ecuador (Patterson *et al.*, 2009).

Se ha estudiado la epidemiología de la enfermedad de Chagas en la zona endémica de la provincia de Loja (al sur de Ecuador) la cual limita con Perú y presenta una ecología muy similar a la de Piura (departamento del norte de Perú), por lo que los resultados se pueden extrapolar. En esta zona, *T. cruzi* se ha encontrado tanto en triatominos silvestres como en domiciliados, el 35% de los hogares están infestados con triatominos y la seroprevalencia es de 3,6 a

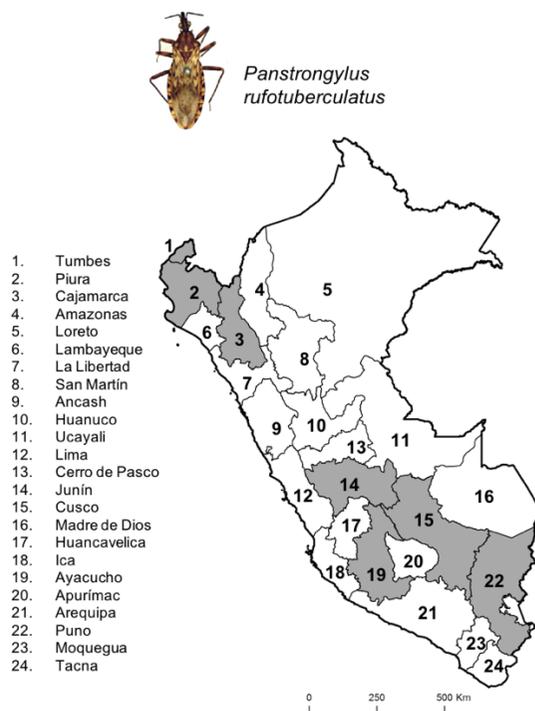
3,9%. *P. chinai* es el tercer vector más prevalente dentro de las casas. La adaptación sinantrópica de esta especie puede verse mediante la tasa de infestación con *T. cruzi* que es mayor en los insectos domiciliados (13,6%), que en los del peridomicilio (9,5%). *P. chinai* aparece en el 32% de los hogares infestados, y además, se asocia a la presencia de animales domésticos como cerdos comunes y cerdos guineanos, a pobres infraestructuras sanitarias, a la acumulación de productos agrícolas y a la presencia de árboles frutales. En Loja es común la aparición simultánea en los domicilios de *P. chinai* junto con *T. carrioni* y *P. rufotuberculatus* (especies que también se encuentran en Perú). Debido a estas características, y ante el éxito de las campañas de control enfocadas a los vectores más relevantes de cada zona, es posible que *P. chinai* ocupe nichos ecológicos liberados por otros vectores (Grijalva *et al.*, 2015). Actualmente, *P. chinai* está considerado como un vector secundario de la enfermedad de Chagas en estas zonas (sur de Ecuador y norte de Perú) pero se incluye en las guías de control de vectorial debido a su capacidad de domiciliación y de recolonización de antiguos nichos (Mosquera *et al.*, 2016).

#### 4.2.2 *Panstrongylus rufotuberculatus*

*P. rufotuberculatus* (Figura 35) se encuentra en México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil y Argentina (Marcilla *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2009). En Perú, este vector se considera secundario (Cuba *et al.*, 2002) y sin embargo, en Colombia y el sur de Ecuador es el segundo vector más domiciliado (Wolff & Castillo, 2002; Grijalva *et al.*, 2015). La distribución en Perú se limita a: Tumbes, Piura, Cajamarca, Junín, Cusco, Ayacucho y Puno (Pollack *et al.*, 2001; Cuba *et al.*, 2002; Cabrera, 2006; Chavez, 2006; Patterson *et al.*, 2009) (Figura 36).



Figura 35: Macho adulto de *Panstrongylus rufotuberculatus*.



**Figura 36:** Mapa de la distribución de *Panstrongylus rufotuberculatus* en Perú. Se marcan en color gris los departamentos de Perú en los que se ha encontrado este vector, a la izquierda aparecen los nombres de cada departamento con su correspondiente numeración.

Las zonas ecológicas en las que se encuentra esta especie en Perú son zonas de matorral tropical, bosque seco y tropical y en los valles del sur de Perú cuyas lluvias anuales van desde los 250 a los 8.000 metros cúbicos y las temperaturas oscilan entre los 19,5 y los 28,5°C. Por otro lado, la altitud de estas zonas va desde los 250 a los 1.750 metros sobre el nivel del mar (Cuba *et al.*, 2002).

Las fuentes alimentarias silvestres de este vector son kinkajúes, murciélagos, armadillos y además, se alimenta de animales domésticos y humanos (Patterson *et al.*, 2009).

*P. rufotuberculatus* presenta características que le ayudan en su capacidad vectorial como son su longevidad, rápida respuesta ante la presencia de un hospedador, gran volumen de sangre ingerido en cada picadura y

frecuentes defecaciones durante su alimentación (Wolff *et al.*, 2004).

La epidemiología de este vector necesita ser estudiada con más profundidad. En Perú parece que se está adaptando cada vez más a los domicilios atraídos por la luz eléctrica (Lent & Wygodzinsky, 1979; Cuba *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2009). *P. rufotuberculatus* se encuentra en el 13% de los hogares infestados en Piura y es el segundo vector más domiciliado. Esta especie parece ser más abundante en los domicilios durante los primeros seis meses del año (desde la época seca hasta el inicio de la época de lluvias) (Zeledón *et al.*, 2001; Patterson *et al.*, 2009).

#### 4.2.3 *Panstrongylus geniculatus*

*P. geniculatus* (Figura 37) es la especie de *Panstrongylus* con la distribución más amplia en América (Patterson *et al.*, 2009), se encuentra en México, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Trinidad, Guyana, Brasil, Ecuador Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina (Marcilla *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2009). *P. geniculatus* es el vector de la enfermedad de Chagas más extendido en Perú, se encuentra en: Cajamarca, Amazonas, Loreto, San Martín, Huánuco, Ucayali, Cerro de Pasco, Junín, Madre de Dios, Ayacucho y Puno (Pollack *et al.*, 2001; Cuba *et al.*, 2002; Cabrera, 2006; Chavez, 2006; Patterson *et al.*, 2009) (Figura 38). Este vector presenta unos ojos grandes a excepción de la población del Valle de la Convención, Cusco, Perú, donde los ojos presentan un tamaño menor. Esta variabilidad puede estar relacionada con la distribución geográfica (Dos Santos *et al.*, 2003).



**Figura 37:** Macho adulto de *Panstrongylus geniculatus*.



**Figura 38:** Mapa de la distribución de *Panstrongylus geniculatus* en Perú. Se marcan en color gris los departamentos de Perú en los que se ha encontrado este vector, a la izquierda aparecen los nombres de cada departamento con su correspondiente numeración.

Las zonas ecológicas en las que se encuentra esta especie en Perú son desiertos tropicales de matorral, bosques tropicales secos y húmedos y bosques premontanos muy húmedos cuyas lluvias anuales van de los 125 a los 4.000 metros cúbicos y las temperaturas oscilan entre los 22,5 y los 29°C. Por otro lado, la altitud de estas zonas va desde los 125 a los 3.700 metros sobre el nivel del mar (Cuba *et al.*, 2002). *P. geniculatus*, en base a sus características ecológicas, se considera eutérmico es decir, capaz de resistir grandes diferencias de temperatura además, esta adaptado a vivir desde zonas secas hasta ecotopos húmedos, pasando por una gran variedad de hábitats silvestres, de ahí su amplia distribución (Patterson *et al.*, 2009; Rabinovich & Feliciangeli, 2015).

Las fuentes alimentarias de este vector, además de humanos, son marsupiales, zarigüeyas, osos hormigueros, armadillos, murciélagos, gatos, pájaros y gallinas ya que se ha encontrado asociado a los nidos y corrales de

estos animales y en huecos de los árboles y hojas de palma (Patterson *et al.*, 2009). Esta especie es frecuentemente capturada en ambientes peridomésticos pero se piensa que atraídos por la luz eléctrica (Wolff & Castillo, 2000; Cuba *et al.*, 2002), entre otros factores, cada vez se registran más capturas de *P. geniculatus* en domicilios sobretodo en Venezuela, Colombia o Bolivia (Carrasco *et al.*, 2014; Rojas-Cortez *et al.*, 2016). En el Amazonas brasileño se ha citado la domiciliación temporal de *P. geniculatus* con cerdos (Cuba *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2009).

En Venezuela, se ha citado una alta incidencia de *P. geniculatus* domiciliado con infecciones concomitantes de *T. cruzi* hecho que resalta la importancia epidemiológica de este vector (Patterson *et al.*, 2009). En cuanto a los hábitos del vector, se sabe que defeca durante su alimentación, lo que lo convierte en un vector competente (Wolff & Castillo, 2000). En 2007, *P. geniculatus* fue el responsable del primer brote reconocido de transmisión oral de la enfermedad de Chagas que provocó casos agudos fatales de miocarditis en niños de una escuela de primaria de Caracas (Venezuela), por ingestión de zumo de frutas contaminado accidentalmente con heces de *P. geniculatus* (Patterson *et al.*, 2009; de Noya *et al.*, 2015). Desde este caso, 10 brotes de casos orales han sido declarados en toda América del Sur, de los cuales el 73,5% de los afectados fueron niños en todos ellos *P. geniculatus* ha sido incriminado (de Noya *et al.*, 2015).

#### 4.2.4 *Panstrongylus lignarius/herrerii*

*P. lignarius* y *P. herrerii* (Figura 39) están sinonimizados ya que morfológicamente (dos Santos *et al.*, 2013), molecularmente (Marcilla *et al.*, 2002) y citogenéticamente son idénticos (Cuba *et al.*, 2000; Crossa *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003; Patterson *et al.*, 2009; Alroy *et al.*, 2015). Este insecto se encuentra en Venezuela, Guyana, Surinam, Brasil, Colombia, Perú y Ecuador (Patterson *et al.*, 2009). Se considera el principal vector domiciliado de la enfermedad de Chagas en el norte de Perú, sobretodo en áreas endémicas rurales y urbanas del valle del río Marañón (Cuba *et al.*, 2000; Cáceres *et al.*, 2002;



**Figura 39:** Hembra de *Panstrongylus lignarius/herrerii*

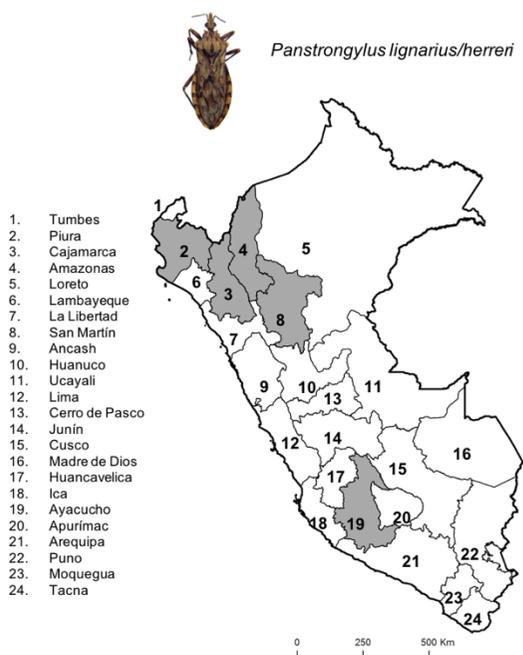
Marcilla *et al.*, 2002; Alroy *et al.*, 2015) (Figura 40) donde se localiza tanto en domicilios, como en peridomicilios, con una distribución que abarca: Piura, Cajamarca, Amazonas, San Martín, Ayacucho y Lima (Pollack *et al.*, 2001; Cuba *et al.*, 2002; Cabrera, 2006; Chavez, 2006; Patterson *et al.*, 2009) (Figura 41).



**Figura 40:** Mapa en el que se observa de color azul, con un trazo más grueso, el río Marañón en Perú, este río atraviesa los departamentos de Huánuco, Ancash, La Libertad, San Martín, Cajamarca, Amazonas y Loreto. Imagen obtenida de: (<https://sierrarios.org>).

La principal diferencia entre *P. lignarius* y *P. herreri* es a nivel de distribución geográfica alopatrica ya que *P. herreri* se encuentra adaptado a domicilios, peridomicilios (vehiculizados a través de cerdos guineanos) (Herrer, 1960) y ambientes silvestres mientras que, *P. lignarius* protegido por su coloración, se localiza principalmente en ecotopos silvestres como troncos de árboles, aunque también se ha encontrado en peridomicilios (Cuba *et al.*, 2002). La primera vez que fue descrito este vector fue capturado en ambiente silvestre y se le dio el nombre de *P. lignarius* más tarde, fue capturado en colonias domésticas y se denominó *P. herreri* por tanto, al ser la misma especie y por orden de descripción, el nombre correcto es *P. lignarius/herreri*. Existe un estatus subespecífico que podría diferenciarlos: *P. lignarius lignarius* procedente de la parte central y este del Amazonas brasileño y Ecuador; y *P. lignarius/herreri* que se localiza en un área más restringida que engloba los Andes ecuatorianos y peruanos y algunos valles inter-andinos relacionados con el Sistema del río Marañón. Este caso es similar al del complejo *Phyllosoma* en México y sus implicaciones epidemiológicas. De hecho, *P. lignarius/lignarius* es

considerado exclusivamente silvestre u oportunista (Patterson *et al.*, 2009) mientras que *P. lignarius/herrerii* es el principal vector domiciliado del norte de Perú ya que posee un fuerte carácter sinantrópico (Marcilla *et al.*, 2002). En la última revisión del género *Panstrongylus* llevada a cabo por Patterson y colaboradores (2009) se agrupan *P. lignarius*, *T. lignarius* y *P. herrerii* dentro del mismo taxón. La literatura asocia la infección en humanos con cepas de *T. cruzi* “domiciliadas” con *P. herrerii* mientras que, la infección con cepas “silvestres” se asocia a *P. lignarius* (Cuba *et al.*, 2002). En el presente estudio, en referencia a la nomenclatura de la bibliografía sobre Perú consultada, se va a nombrar al vector encontrado en Perú *P. lignarius/herrerii* de forma abreviada como *P. herrerii*.



**Figura 41:** Mapa de la distribución de *Panstrongylus herrerii* en Perú. Se marcan en color gris los departamentos de Perú en los que se ha encontrado este vector, a la izquierda aparecen los nombres de cada departamento con su correspondiente numeración.

Las zonas ecológicas en las que se encuentra *P. herreri* en Perú son bosques húmedos tropicales y premontanos cuyas lluvias anuales van desde los 1.000 a los 4.000 metros cúbicos y las temperaturas oscilan entre 21 y 26 °C (Cuba *et al.*, 2002). Por otro lado, la altitud de estas zonas va desde los 468 a los 2.537 metros sobre el nivel del mar.

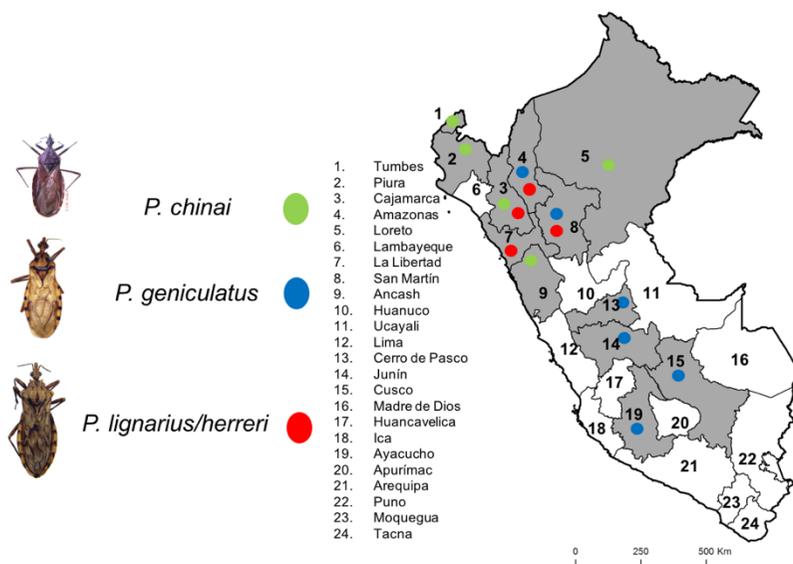
Las fuentes alimentarias de este vector son marsupiales, ratas, murciélagos, osos hormigueros, gallinas, conejos, palomas, perros y por supuesto humanos (Patterson *et al.*, 2009; Alroy *et al.*, 2015). *P. lignarius* ha sido localizado asociado a nidos de pájaros, ratoneras, madrigueras y nidos en los árboles (Patterson *et al.*, 2009). En Perú, las poblaciones domésticas de *P. herreri* además de mostrar hábitos sinantrópicos (Cuba *et al.*, 2002) presentan un fuerte fototropismo (Patterson *et al.*, 2009). Este carácter hace que *P. herreri* sea un buen objetivo para las campañas de control vectorial (Cuba *et al.*, 2002).

En cuanto a la epidemiología de este vector en Perú, ya se ha dicho que *P. herreri* es la especie predominante en los domicilios y peridomicilios del norte del país. Este vector se ha encontrado en el 40% de las casas infestadas y siempre, al menos uno de los ejemplares colectados tenía *T. cruzi* (Alroy *et al.*, 2015). Las zonas donde se encuentra son endémicas de la enfermedad de Chagas y son tanto urbanas como rurales, destacando los departamentos de Cajamarca y Amazonas (Patterson *et al.*, 2009). Este insecto es tan frecuente en el valle del río Marañón que *P. herreri* era vulgarmente conocido, en esta zona, como “animal de compañía” a pesar de que también se encuentra en nichos silvestres. La infraestructura de los domicilios donde se localizan está hecha principalmente de adobe y la mayoría presenta tejados hechos de calamina o materiales con ondulaciones de metal o plástico. Muchos de los domicilios infestados poseen corrales adosados hechos sobretodo de madera (Alroy *et al.*, 2015). El ciclo biológico del vector se ve afectado con la temperatura de forma que a elevadas temperaturas (por encima de 30°C) es más rápido (Franzini *et al.*, 2017).

En cuanto a las tasas de prevalencia humana por infección con *T. cruzi*, en el norte de Perú, se consideran altas (14,9%) (Alroy *et al.*, 2015). Se cree que los perros actúan como reservorios importantes del parásito lo que ayuda a que esta se reestablezca después del tratamiento con insecticidas. El cerdo guineano históricamente ha sido considerado el reservorio por excelencia de *T. cruzi* pero en el caso de este vector no hay resultados concluyentes para corroborarlo (Alroy *et al.*, 2015).

### 4.3 Procedencia geográfica de los especímenes de *Panstrongylus* estudiados

Se han analizado un total de 172 ejemplares del género *Panstrongylus* de Perú capturados en domicilios y peridomicilios: 51 ejemplares de *P. chinai* procedentes de: Tumbes, Piura, Cajamarca, Loreto y Ancash; 14 ejemplares de *P. geniculatus* procedentes de: Amazonas, San Martín, Cerro de Pasco, Junín, Cusco y Ayacucho; 103 ejemplares de *P. herreri* procedentes de Amazonas, Cajamarca, San Martín y La Libertad; y 4 ejemplares de *P. rufotuberculatus* procedentes de Cusco. Las altitudes de colección de los insectos van desde 12 a los 3.644 metros sobre el nivel del mar, (Figura 42) los datos sobre la localización exacta de las muestras se incluyen en la (Tabla 3) del capítulo 2. Material y métodos.



**Figura 42:** Mapa de la distribución geográfica de los ejemplares de *Panstrongylus* estudiados. Aparecen numerados y marcados en color gris los departamentos donde han sido capturados los ejemplares en Perú. Cada especie estudiada se marca mediante un punto de color en el lugar donde fue colectada.

## 4.4 Objetivos

### 4.4.1 Objetivo general

El presente capítulo tiene como objetivo general la caracterización a nivel molecular de las especies capturadas en Perú del género *Panstrongylus* mediante la secuenciación y análisis de los marcadores moleculares ADNr nuclear (ITS-1, 5.8S e ITS-2) y del ADNmt (16S, ND1, COI y Cyt *b*).

### 4.4.2 Objetivos específicos

- Estudiar la distribución geográfica actual de las especies del género *Panstrongylus* capturadas en Perú a diversos niveles altitudinales y departamentos.
- Creación de un mapa de distribución geográfica y genética de las especies de *Panstrongylus*
- Estudiar la historia demográfica del género *Panstrongylus* en Perú
- Creación de una base de datos unificada de haplotipos de todas las especies de *Panstrongylus*
- Estudiar la epidemiología del género *Panstrongylus* en Perú y aplicar medidas para controlar la distribución de estos vectores y la incidencia de la enfermedad de Chagas asociada a transmisión vectorial.

## 4.5 Resultados moleculares

### 4.5.1 Resultados obtenidos en el estudio del ADN nuclear ribosomal (ADNr)

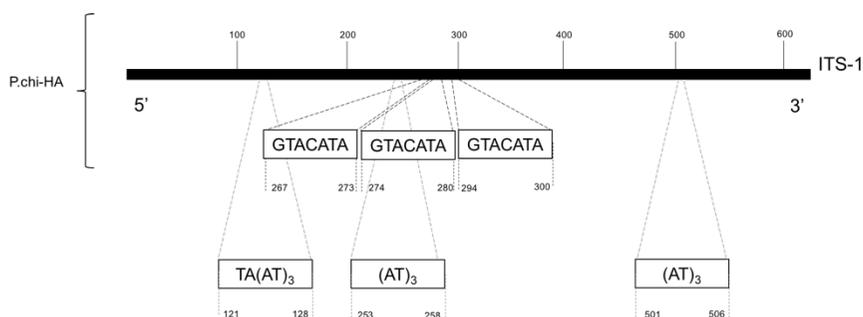
#### 4.5.1.1 Análisis del ITS-1 del ADNr

En el presente estudio se ha obtenido por primera vez las secuencias de ITS-1 de *P. chinai*; y por primera vez en Perú, las de *P. geniculatus* y *P. herreri*.

#### a) ITS-1 de *Panstrongylus chinai*

El análisis de las secuencias obtenidas del marcador ITS-1 de los 51 especímenes analizados de *P. chinai* ha permitido obtener un único haplotipo P.chi-HA (longitud 632 pb; 71,8% AT). Dentro del ITS-1 se han detectado dos minisatélites (GTACATA) y (AT)<sub>3</sub> que se repiten tres veces, cada uno, a lo largo del marcador (Figura 43).

No se han encontrado diferencias en el estudio por altitudes geográficas desde los 12 a los 2.380 metros sobre el nivel del mar, ni en el estudio por departamentos de Perú.



**Figura 43:** Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-1 de los *Panstrongylus chinai* estudiados procedentes de Perú. Se representa la secuencia del haplotipo hallado mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3' los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento. Los dos minisatélites detectados se repiten 3 veces cada uno a lo largo de la secuencia.

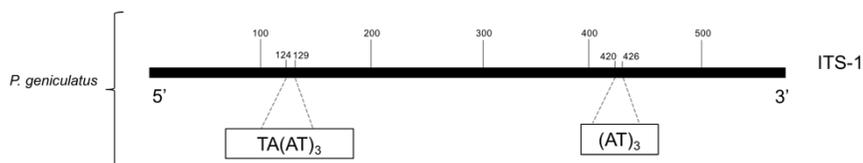
b) *ITS-1 de Panstrongylus geniculatus*

El análisis de las secuencias obtenidas del marcador ITS-1 de los 14 especímenes analizados de *P. geniculatus* ha permitido obtener tres haplotipos: P.gen-HA (longitud 667 pb; 69,8% AT) en el 55,5% de los ejemplares; P.gen-HB (longitud 667 pb; 69,8% AT) en el 33,3%; y P.gen-HC (longitud 667 pb; 69,7% AT) en el 11,1%. Se observan un total de 8 posiciones variables, los haplotipos más homólogos son P.gen-HA y P.gen-HB, los cuales se diferencian en 2 indels. El haplotipo P.gen-HC se diferencia en 5 mutaciones y dos indels con respecto a P.gen-HA y en 4 mutaciones y 4 indels con respecto a P.gen-HB (Tabla 39). Se ha detectado un minisatélite (AT)<sub>3</sub> que se repite dos veces entre las bases 124 y 129 y entre las 420 y las 426 (Figura 44).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú: P.gen-HA se ha encontrado desde los 214 a los 1.813 metros en los departamentos de San Martín y Cerro de Pasco, por lo que se encuentra más al norte; P.gen-HB desde los 800 a los 3.644 metros en los departamentos de Cerro de Pasco, Cusco y Ayacucho, por lo que se localiza más al sur; y P.gen-HC se ha encontrado en el departamento de Amazonas a 468 metros sobre el nivel del mar.

ITS-1 de <i>P. geniculatus</i>				
Haplotipos del marcador ITS-1	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			11122344 37756235 93458514	
P.gen-HA	667	69,87	T-ACAA-A	55,5%
P.gen-HB	667	69,87	.T-. . . -.	33,3%
P.gen-HC	667	69,72	A-.T-CTG	11,1%

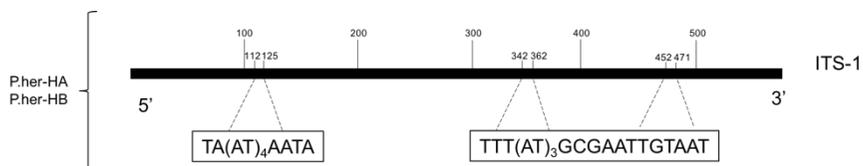
**Tabla 39:** Alineamiento de las posiciones variables de los 3 haplotipos obtenidos en el estudio del espaciador transcrito interno ITS-1 de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (-) indel. (.) la secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.



**Figura 44:** Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-1 de los *Panstrongylus geniculatus* estudiados procedentes de Perú. Se representa la secuencia del haplotipo hallado mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3' los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento.

c) *ITS-1 de Panstrongylus herreri*

El análisis de las secuencias obtenidas del marcador ITS-1 de los 103 especímenes analizados de *P. herreri* ha permitido obtener dos haplotipos, que se diferencian en dos indels en las posiciones 450 y 451: P.her-HA (longitud 572 pb; 72,5%.AT) presente en el 95,2% de las muestras; y P.her-HB (longitud 572 pb; 72,5%.AT) presente en el 4,7%. La secuencia P.her-HA es idéntica al 100% con el haplotipo de *P. herreri* AM949584 publicado en *GenBank* por Mas-Coma y Bargues (2009). Dentro del marcador se localizan 2 minisatélites: uno, en la primera parte cuya secuencia es TA(AT)<sub>4</sub>AATA; y otro, repetido en tándem en la última parte del marcador cuya secuencia es TTT(AT)<sub>3</sub>GCGAATTGTAAT (Figura 45).



**Figura 45:** Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-1 de los *Panstrongylus herreri* estudiados procedentes de Perú. Se representan la secuencias de los haplotipos hallados mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3' los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento.

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú: P.her-HA es el más extendido, se ha encontrado en todas las altitudes desde los 130 a los 2.537 metros y en todos los departamentos estudiados Amazonas, Cajamarca, San Martín y La libertad; P.her-HB presenta una distribución limitada ya que ha sido encontrado exclusivamente en el departamento de Amazonas, a partir de 900 metros sobre el nivel del mar.

#### 4.5.1.2 Análisis del ITS-2 del ADNr

En el presente estudio se ha obtenido por primera vez las secuencias de ITS-2 de *P. chinai* y *P. geniculatus* en Perú.

##### a) *ITS-2 de Panstrongylus chinai*

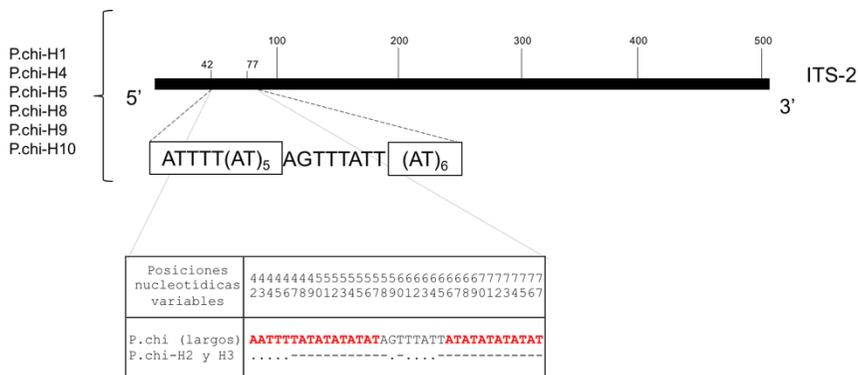
El análisis de las secuencias obtenidas del marcador ITS-2 de los 51 especímenes analizados ha generado 10 haplotipos diferentes: 2 de ellos obtenidos por secuenciación directa y 8 por clonación. Se decidió clonar una de las muestras puesto que en la electroforesis realizada tras la PCR del gen 5.8S e ITS-2 se observaron dos bandas con distinto peso molecular, se secuenciaron ambas bandas y se obtuvo 2 secuencias con distinta longitud del ITS-2. Los cromatogramas de estas secuencias no estaban limpios por lo que se clonó la muestra y como resultado se detectaron 8 clones diferentes con distintas longitudes, entre los que la mayoría de los cambios son debidos a indels.

La longitud de los 10 haplotipos obtenidos varía desde los 354 a los 501 pb con un contenido medio en AT de 77,4%. En función de su longitud los haplotipos se dividen en: largos con 499 a 501 pb que se corresponde con los haplotipos P.chi-H1, H4, H5, H6, H7, H8, H9 y H10; y cortos P.chi-H2 y H3 con 354 y 355 pb, respectivamente. Se observan 159 posiciones variables entre las secuencias comparadas de las cuales, 6 son debidas a mutaciones y 153 a indels. El haplotipo más representado es P.chi-H1 en el 56,6% de las muestras seguido de P.chi-H2 en el 26,35%, el resto tienen una representación de 1,1% cada uno (Tabla 40). P.chi-H1 es homólogo al 100% con los haplotipos,

publicados en *GenBank*, de *P. chinai* (JX400892) y *P. howardi* (JX400896); P.chi-H2 es homólogo al 100% con *P. chinai* (JX400919); y P.chi-H9 es homólogo al 100% con *P. chinai* (JX400891) todos ellos publicados por Sempertegui-Sosa (2012). Se ha obtenido una secuencia de ITS-2 por cada ejemplar sin embargo, uno de los ejemplares de Piura, al ser clonado, generó 10 secuencias para el ITS-2.

En la comparación de los haplotipos obtenidos del gen ITS-2 de *P. chinai* los más homólogos son P.chi-H9 con respecto a P.chi-H4 y H5 puesto que solamente se ha detectado un indel entre ellos, lo que supone una diferencia del 0,2%. Los haplotipos que más diferencias muestran son P.chi-H2 con respecto a P.chi-H4, H5 y H7 puesto que se detectan entre ellos de 153 a 154 indels (debido a la diferencia en sus longitudes) y 1 mutación. Los haplotipos con mayor número de mutaciones son P.chi-H7 con respecto a P.chi-H8 y H10 con un total de 3 mutaciones (Tabla 41). Se han detectado dos minisatélites ATTTT(AT)<sub>5</sub> y (AT)<sub>6</sub> en el inicio de la secuencia, entre las posiciones 42 y 77, en todos los haplotipos largos excepto, en P.chi-H7 que contiene una mutación a mitad del primer minisatélite. En los haplotipos cortos, en los lugares donde se localizan los minisatélites se observan indels por tanto, la diferencia de longitud entre haplotipos es debida en gran parte a si poseen o no minisatélites. En todos los haplotipos en la posición 42 se observan las cuatro primeras bases del minisatélite (ATTTT) y también la región que los separa (AGTTTATT) (Figura 46).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú: P.chi-H1 se ha encontrado desde los 65 a los 104 metros en los departamentos de Piura y Loreto; P.chi-H2 se ha encontrado por debajo de los 100 metros en Piura; el resto de haplotipos (P.chi-H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9 y H10) se han obtenido del mismo espécimen cuya altura de colección son 72 metros sobre el nivel del mar en Piura.



**Figura 46:** Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-2 de los *Panstrongylus chinai* estudiados procedentes de Perú. Se representan las secuencias de los haplotipos largos mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3' y los minisatélites hallados entre las bases 42 y 77. Los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento. La tabla inferior muestra las diferencias en composición nucleotídica entre los haplotipos largos y los cortos en el fragmento donde se hallan los minisatélites (marcados en rojo). Se observa como en la mayoría de las posiciones de los nucleótidos que forman los minisatélites en las secuencias cortas hay indels (-). En la secuencia nucleotídica que separa los minisatélites la diferencia entre ambos haplotipos se deben a un indel en la posición 60

b) *ITS-2 de Panstrongylus geniculatus*

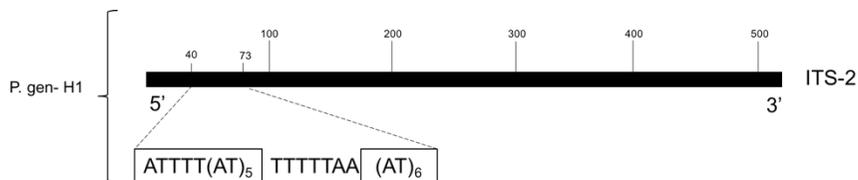
El análisis de las secuencias obtenidas del marcador ITS-2 de los 14 especímenes analizados de *P. geniculatus* ha permitido obtener un haplotipo P.gen-H1 (longitud 506 pb; 77,07% AT). Se observan dos minisatélites en el inicio del marcador ATTTT(AT)<sub>5</sub> y (AT)<sub>6</sub> entre las posiciones 40 y 73 (Figura 47).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú: P.gen-H1 se encuentra extendido desde los 214 a los 3.644 metros, en los departamentos de San Martín, Cerro de Pasco y Ayacucho.



Haplotipo	Pchi-H2	Pchi-H3	Pchi-H4	Pchi-H5	Pchi-H6	Pchi-H7	Pchi-H8	Pchi-H9	Pchi-H10
P.chi-H1	0:152:152/30.3%	2:150:152/30.3%	0:5:5/0.99%	0:5:5/0.99%	0:4:4/0.8%	2:4:6/1.2%	1:3:4/0.8%	0:4:4/0.8%	1:3:4/0.8%
P.chi-H2	2:5:7/1.9%	0:154:154/43.4%	0:154:154/43.4%	0:152:152/42.8%	1:153:154/43.4%	0:152:152/42.8%	0:153:153/43.1%	0:152:152/42.8%	0:152:152/42.8%
P.chi-H3	2:149:151/42.6%	2:149:151/42.6%	0:2:2/0.4%	2:148:150/42.3%	2:148:150/42.3%	2:147:149/42.1%	2:148:150/42.3%	2:147:149/42.1%	2:147:149/42.1%
P.chi-H4			0:2:2/0.4%	0:3:3/0.6%	2:1:3/0.6%	1:2:3/0.6%	0:1:1/0.2%	1:2:3/0.6%	1:2:3/0.6%
P.chi-H5				0:3:3/0.6%	2:1:3/0.6%	1:2:3/0.6%	0:2:2/0.4%	1:1:2/0.4%	1:1:2/0.4%
P.chi-H6					2:2:4/0.8%	1:1:2/0.4%	0:2:2/0.4%	2:0:2/0.4%	3:1:4/0.8%
P.chi-H7						3:1:4/0.8%	2:0:2/0.4%	3:1:4/0.8%	3:1:4/0.8%
P.chi-H8							1:1:2/0.4%	1:1:2/0.4%	0:2:2/0.4%
P.chi-H9									1:1:2/0.4%

**Tabla 41:** Comparativa de las posiciones polimórficas y los indels del marcador ITS-2 del ADN entre los haplotipos hallados para *Panstrongylus chinai* de Perú. Se indica en cada comparativa: (i) número de mutaciones; (ii) número de indels introducidos para el alineamiento; (iii) número total de diferencias (mutaciones + indels); / y (iv) porcentaje de diferencias (mutaciones+indels) con respecto al número total de pares de bases de la secuencia de la primera columna.

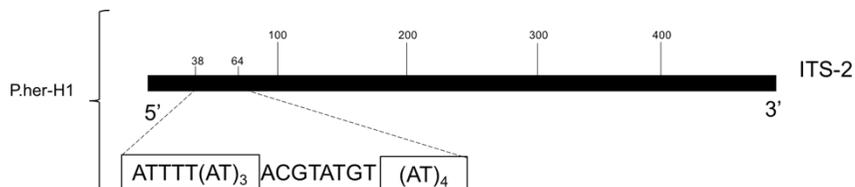


**Figura 47:** Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-2 de los *Panstrongylus geniculatus* estudiados procedentes de Perú. Se representan las secuencias de los haplotipos largos mediante una línea gruesa en sentido 5' - 3'. Los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento. Los minisatélites se localiza al inicio de la secuencia entre las bases 40 y 73. Dentro de los recuadros se indican los minisatélites hallados y en el centro la secuencia nucleotómica que los separa.

c) *ITS-2 de Panstrongylus herreri*

El análisis de las secuencias obtenidas del marcador ITS-2 de los 103 especímenes analizados de *P. herreri* ha permitido obtener un haplotipo P.her-H1 (longitud 492 pb; 78,6%AT) idéntico al 100% con las secuencias de *P. herreri* publicadas en *GenBank* por Marcilla y colaboradores (2002) como: AJ306551; AJ306550; AJ306549 y AJ306548. Se observan dos minisatélites en el inicio del marcador ATTTT (AT)<sub>3</sub> y (AT)<sub>4</sub> entre las posiciones 38 y 64 (Figura 48).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas, este haplotipo ha sido encontrado desde los 130 a los 2.537 metros sobre el nivel del mar en todos los departamentos donde han sido capturados Cajamarca, Amazonas, La Libertad y San Martín.



**Figura 48:** Localización de los minisatélites detectados en el marcador ITS-2 de los *Panstrongylus herreri* estudiados procedentes de Perú. Se representa la secuencia de los haplotipos hallados mediante la línea gruesa en sentido 5' - 3' los números indican las posiciones de los nucleótidos en el alineamiento. Los minisatélites se localiza al inicio de la secuencia entre las bases 38 y 64. Dentro de los recuadros se indican los minisatélites hallados y en el centro la secuencia nucleotómica que los separa.

#### 4.5.1.3 Región intergénica completa (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr

En el presente estudio se ha obtenido por primera vez las secuencias de la región intergénica completa del ADNr de *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. herreri*.

##### a) *Región intergénica completa del ADNr de Panstrongylus chinai*

El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNr de los 51 especímenes analizados de *P. chinai* ha permitido obtener 10 haplotipos diferentes: 2 por secuenciación directa (P.chi-H1A en el 56,6% de las muestras y P.chi-H2A en el 34,4%) y 8 por clonación (desde P.chi-H3 hasta P.chi-H10 cuya representación dentro de la muestra es de 1,1% cada uno); la longitud media de las secuencias es de 1.258 pb y el contenido medio en AT es de 70,3%. La región intergénica comprende el marcador ITS-1 desde la posición 1 a la 632, el gen 5.8S desde la 633 a la 787 y el marcador ITS-2 desde la posición 788 hasta el final de la secuencia, cuya longitud varía en función del haplotipo de 1.141 a 1.288 pb. En total, se observan 159 posiciones variables que se corresponden con 6 mutaciones y 153 indels todos ellos localizados en el ITS-2 (Tabla 42). Se han observado repeticiones de secuencias o minisatélites dentro de los ITSs de *P. chinai*, concretamente se ha detectado un minisatélite repetido 3 veces dentro del ITS-1 y dos minisatélites en el ITS-2, como se ha comentado previamente.

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú: P.chi-H1A se ha encontrado desde los 65 a los 104 metros en los departamentos de Piura y Loreto; P.chi-H2A se ha encontrado desde los 65 a los 72 metros en Piura; el resto de haplotipos (P.chi-H3A, H4A, H5A, H6A, H7A, H8A, H9A y H10A) se han obtenido del mismo espécimen cuya altura de colección son 72 metros sobre el nivel del mar en Piura.



b) *Región intergénica completa del ADNr de Panstrongylus geniculatus*

El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNr de los 14 especímenes analizados de *P. geniculatus* ha permitido obtener 2 haplotipos, cuyas diferencias se localizan en el ITS-1: P.gen-H1A en el 60% de los ejemplares y P.gen-H1B en el 40%, ambos con una longitud de 1.329 pb y un contenido en AT de 69,35%. La región intergénica de *P. geniculatus* comprende el marcador ITS-1 desde la posición 1 a la 668, el gen 5.8S desde la posición 669 a la 823 y el marcador ITS-2 desde la posición 824 hasta la 1.329 (Tabla 43). Se han observado repeticiones de secuencias o minisatélites dentro de los ITSs de la región intergénica de *P. geniculatus*, concretamente se han detectado dos minisatélite en el ITS-1 y dos minisatélites en el ITS-2, como se ha comentado previamente.

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú: P.gen-H1A se encuentra desde los 214 a los 3.644 metros, en los departamentos de San Martín y Cerro de Pasco; y a 1.460 metros se localiza P.gen-H1B en Ayacucho.

Región intergénica del ADNr (ITS-1, 5.8S, ITS-2) de <i>P. geniculatus</i>				
Haplotipos del la región intergénica del ADNr	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			11 77 34	
P.gen-H1A	1329	69,35	-A	60%
P.gen-H1B	1329	69,35	T-	40%

**Tabla 43:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos obtenidos en el estudio de la región intergénica del ADNr de *Panstrongylus geniculatus*. El marcador ITS-1 comprende desde la posición 1 a la 668, el gen 5.8S desde la 669 a la 823 y el marcador ITS-2 desde la posición 824 hasta la 1.329. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (-) indel. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

c) *Región intergénica completa del ADNr de Panstrongylus herreri*

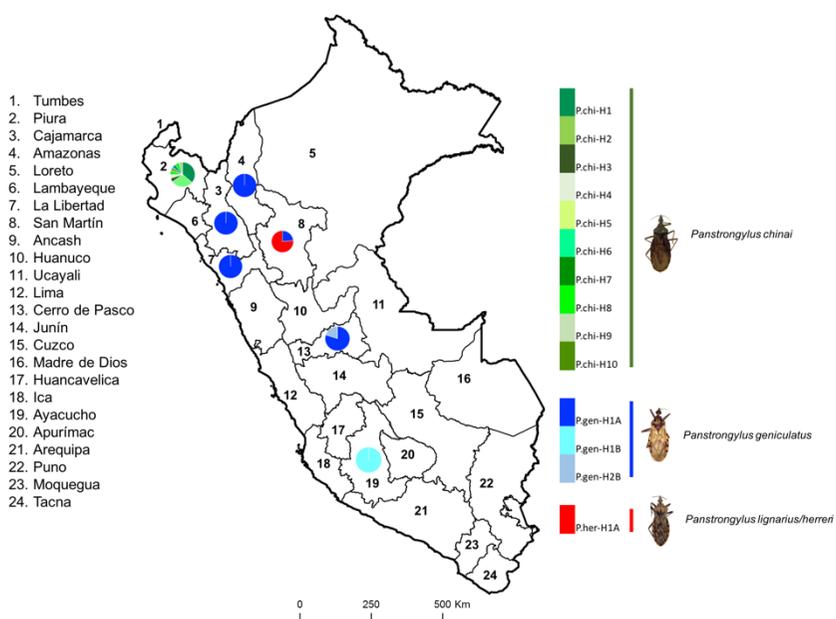
El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNr de los 103 ejemplares analizados de *P. herreri* ha permitido obtener 2 haplotipos, cuyas diferencias se localizan en el ITS-1: P.her-H1A, en el 95,2% de las muestras, y P.her-H1B; en el 4,7%, todos ellos con una longitud de 1.220 pb y un contenido en AT de 71,1%. La región intergénica de *P. herreri* comprende el marcador ITS-1 desde la posición 1 a la 573, el gen 5.8S desde la posición 574 a la 728 y el marcador ITS-2 desde la posición 728 hasta la 1.220 (Tabla 44). Se han observado repeticiones de secuencias o minisatélites dentro de los ITSs de la región intergénica de *P. herreri*, concretamente se han detectado dos minisatélites en el ITS-1 y otros dos en el ITS-2, como se ha comentado previamente.

En cuanto al estudio por altitudes y departamentos el haplotipo P.her-H1A se ha encontrado en todas las altitudes y departamentos estudiados que abarcan desde los 130 a los 2.537 metros sobre el nivel del mar en Amazonas, Cajamarca, San Martín y La libertad . El haplotipo P.her-H1B se ha encontrado exclusivamente en el departamento de Amazonas a partir de 900 metros sobre el nivel del mar.

Región intergénica del ADNr (ITS-1, 5.8S, ITS-2) de <i>P. herreri</i>				
Haplotipos del la región intergénica del ADNr	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			44 55 01	
P.her-H1A	1220	71,12	-A	95,2%
P.her-H1B	1220	71,12	T-	4,7%

**Tabla 44:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos obtenidos en el estudio de la región intergénica del ADNr de *Panstrongylus herreri*. El marcador ITS-1 comprende desde la posición 1 a la 573, el gen 5.8S desde la 574 a la 728 y el marcador ITS-2 desde la posición 729 hasta la 1.220. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (-) indel. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

A continuación, se muestra un mapa con la distribución geográfica de los haplotipos obtenidos para la región intergénica en las especies de *Panstrongylus* de Perú estudiadas. La mayoría de estas especies se localizan en el norte del país. La especie más extendida geográficamente es *P. geniculatus*, se ha encontrado en 6 departamentos y solo en San Martín coincide con *P. herreri*. A pesar del elevado número de haplotipos hallados para *P. chinai*, todos ellos proceden de un único departamento Piura (Figura 49).



**Figura 49:** Mapa de la distribución geográfica de los haplotipos de la región intergénica del ADNr de las especies de *Panstrongylus* de Perú obtenidos en el presente estudio. Se representa cada especie con un color, dentro de cada color las diferentes tonalidades representan diferentes haplotipos

## 4.5.2 Resultados obtenidos en el estudio del ADN mitocondrial (ADNmt)

### 4.5.2.1 Análisis del gen ribosomal 16S del ADNmt

Se ha descrito por primera vez el gen 16S en *P. chinai* y en el caso de *P. geniculatus* y de *P. herreri* se ha descrito este gen por primera vez en Perú.

#### a) Gen 16S del ADNmt de *Panstrongylus chinai*

El análisis de las secuencias obtenidas del gen 16S de los 51 especímenes analizados de *P. chinai* ha permitido obtener dos haplotipos: P.chi-16S.A (longitud 558 pb; 68,1% AT) en el 83,7% de las muestras y P.chi-16S.B (longitud 558 pb; 67,7% AT) en el 16,3%. Estos haplotipos se diferencian en 2 mutaciones en las bases 51 y 525 (Tabla 45).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, el haplotipo P.chi-16S.A se ha encontrado en altitudes por debajo de los 104 metros sobre el nivel del mar en los departamentos de Piura, Loreto y Tumbes. El haplotipo P.chi-16S.B se ha encontrado en altitudes más elevadas desde los 400 a los 2.380 metros sobre el nivel del mar en el departamento de Cajamarca.

Gen 16S de <i>P. chinai</i>				
Haplotipos del gen 16S	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			5 52 15	
P.chi-16S.A	558	68,1	AA	83,7%
P.chi-16S.B	558	67,7	GG	16,3%

**Tabla 45:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos obtenidos en el estudio del gen 16S de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud en pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

b) *Gen 16S del ADNmt de Panstrongylus geniculatus*

El análisis de las secuencias obtenidas del gen 16S de los 14 ejemplares de *P. geniculatus* analizados ha permitido obtener 5 haplotipos: P.gen-16S.A (longitud 554 pb; 68,2% AT) en el 42,8% de las muestras; P.gen-16S.B (longitud 554 pb; 67,7% AT); P.gen-16S.C (longitud 554 pb; 68,2% AT); P.gen-16S.D (longitud 554 pb; 68,1% AT); y P.gen-16S.E (longitud 554 pb; 68,0% AT), se han encontrado con una proporción de 14,3%, respectivamente en la muestra. La secuencia más diferente es la del haplotipo P.gen-16S.B puesto que tiene 7 mutaciones con respecto al haplotipo A, 5 mutaciones con respecto al haplotipo C y 4 mutaciones con respecto a D (Tabla 46).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú: P. gen-16S.A se sitúa en altitudes más bajas de 214 a 231 metros en San Martín, P.gen-16S.B, P.gen-16S.C y P.gen-16S.D se localizan entre 1.460 y 1.813 metros en Cerro de Pasco y P.gen-16S.E se ha capturado a 468 metros sobre el nivel del mar en Amazonas.

Gen 16S de <i>P. geniculatus</i>				
Haplotipos del gen 16S	Longitud pb	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			1333344 67555689 95257198	
P.gen-16S.A	554	68,2	ATAAATCG	42,8%
P.gen-16S.B	554	67,7	GCTTGC.A	14,3%
P.gen-16S.C	554	68,2	G.....A	14,3%
P.gen-16S.D	554	68,1	G.....TA	14,3%
P.gen-16S.E	554	68,0	G....C.A	14,3%

**Tabla 46:** Alineamiento de las posiciones variables de los 5 haplotipos obtenidos en el estudio del gen 16S de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud en pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas. (.) La secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

c) *Gen 16S del ADNmt de Panstrongylus herreri*

El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNr de los 103 ejemplares de *P. herreri* analizados ha permitido obtener un único haplotipo: P.her-16S.A (longitud 553 pb; 66,7%AT), el cual se localiza desde los 130 a los 2.537 metros en los departamentos de Cajamarca, Amazonas, La Libertad y San Martín.

4.5.2.2 Análisis del gen ND1 del ADNmt

En el presente estudio se han descrito por primera vez las secuencias del gen del ADNmt ND1 de *P. chinai* además, se ha descrito por primera vez en *P. geniculatus* y *P. herreri* de Perú.

a) *Gen ND1 de Panstrongylus chinai*

El análisis de las secuencias obtenidas del gen ND1 de los 51 especímenes analizados de *P. chinai* ha permitido obtener el haplotipo P.chi-ND1.a (longitud 924 pb; 74,3% AT) en el 56,7% de las muestras y dos haplotipos parciales, con una representación del 21,6% cada uno, P.chi-ND1.b (longitud 545 pb; 73,9% AT) y P.chi-ND1.c (longitud 545 pb; 73,3% AT). Los haplotipos codifican para 2 secuencias de aminoácidas: la del gen completo P.chi-ND1.I (longitud 307 Aa); y la obtenida de la traducción de los haplotipos parciales, P.chi-ND1.II (longitud: 181 Aa). Los haplotipos P.chi-ND1.b y c son los más homólogos entre sí. Debido a la diferencia longitudinal entre haplotipos se compara el fragmento inicial de 545 pb (Tabla 47).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, los haplotipos P.chi-ND1.a y P.chi-ND1.b se han encontrado por debajo de los 100 metros en Piura, el haplotipo P.chi-ND1.c se localiza en altitudes más elevadas desde los 400 a los 2.380 metros sobre el nivel del mar en Cajamarca.

Gen ND1 de <i>P. chinai</i>					
Haplotipos nucleotídicos/aminoácídicos del gen ND1	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Posiciones variables aminoácídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			23355 33822 49305	11 27 84	
P.chi-ND1.a/P.chi-ND1.I	924	73,27	GGAGG	SI	56,7%
P.chi-ND1.b/P.chi-ND1.II	545	73,94	A...	NV	21,6%
P.chi-ND1.c/P.chi-ND1.II	545	74,31	AAGAA	NV	21,6%

**Tabla 47:** Alineamiento del fragmento inicial de 545 pares de bases de las posiciones variables de los 3 haplotipos nucleotídicos y aminoácídicos obtenidos en el estudio del gen ND1 de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto para la secuencia nucleotídica como para la aminoácídica. (.) La secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido o aminoácido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

b) *Gen ND1 de Panstrongylus geniculatus*

El análisis de las secuencias obtenidas del gen ND1 de los 14 ejemplares de *P. geniculatus* analizados ha permitido obtener 5 haplotipos: P.gen-ND1.a (longitud 924 pb; 71% AT) en el 70,8% de las muestras; P.gen-ND1.b (longitud 924 pb; 71% AT) en el 20%; P.gen-ND1.c (longitud 924 pb; 71% AT) en el 30%; P.gen-ND1.d (longitud 924 pb; 70% AT) y P.gen-ND1.e (longitud 924 pb; 71% AT) en el 10% de las muestras, cada uno. Los 5 haplotipos nucleotídicos codifican para 4 proteínas P.gen-ND1.I (longitud 307 Aa), P.gen-ND1.II (longitud 307 Aa), P.gen-ND1.III (longitud 307 Aa) y P.gen-ND1.IV (longitud 307 Aa). Se observan 5 posiciones variables entre estas. Los haplotipos más homólogos son P.gen-ND1.a y P.gen-ND1.c, con 4 mutaciones entre ellos y los más diferentes son el haplotipo P.gen-ND1.b y P.gen-ND1.e, con 23 mutaciones (Tabla 48).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, en orden de altitudes, de menor a mayor: los haplotipos situados por debajo de los 1.000 metros sobre el nivel del mar son P.gen-ND1.c capturado en San Martín de 214 a 231 metros y P. gen-ND1.e capturado en Amazonas a 468 metros; por encima de los 1.000 metros se han encontrado P.gen-ND1.a y P.gen-ND1.d en Cerro de Pasco entre los 1.460 y los

1.813 y P.gen-ND1.b capturado en Ayacucho a 3.644 metros sobre el nivel del mar.

Gen ND1 de <i>P. geniculatus</i>				
Haplotipos nucleotídicos/aminoácidos del gen ND1	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables	
			nucleotídicas	Aa
			111111222233445666666678888888999	2233
450123461479173382345689111157778112	98900			
518465429663885854354343504690139691	87767			
P.gen-ND1.a/P.gen-ND1.I	924	70,78	TCGTTAGGTGCACTAATGAGAATATACAACACTAGGGG	YMVVV
P.gen-ND1.b/P.gen-ND1.II	924	70,67	.T..CG...A..TT.GG.....T...C.....	F....
P.gen-ND1.c/P.gen-ND1.I	924	70,68	...C.....T..TC.....	.....
P.gen-ND1.d/P.gen-ND1.III	924	70,02	.T..CG...A..TT.GGC.G.C.CGCG.G..C.AA.A	F.II.
P.gen-ND1.e/P.gen-ND1.IV	924	70,78	C.A...AAC.T..C.G.A.A.G..C.TGGT.G..A.	.V..M

**Tabla 48:** Alineamiento de las posiciones variables de los 5 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen ND1 de *Panstrongylus geniculatus*. Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida. Aa= posiciones variables aminoácidas. (.) La secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa.

c) *Gen ND1 de Panstrongylus herreri*

El análisis del gen ND1 de los 103 ejemplares de *P. herreri* analizados ha permitido obtener dos haplotipos: P.her-ND1.a (longitud: 924 pb; 70,45%) en el 89% de las muestras; y P.her-ND1.b (longitud: 924 pb; 70,45%) en el 10,9%. Los 2 haplotipos nucleotídicos codifican para 2 proteínas: P.her-ND1.I (307 Aa) y P.her-ND1.II (307 Aa) (Tabla 49).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, el haplotipo P.her-ND1.a es el que presenta la distribución más amplia, se ha encontrado desde los 468 a los 2.537 metros en Amazonas y Cajamarca. P.her-ND1.b se sitúa entorno a los 700 metros sobre el nivel del mar exclusivamente en Cajamarca.

Gen ND1 de <i>P. herreri</i>							
Haplotipos nucleotídicos/aminoacídicos del gen ND1	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Posiciones variables aminoacídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo		
			8 81 69	2 9		P.her-ND1.a/P.her-ND1.I P.her-ND1.b/P.her-ND1.I	924 924

**Tabla 49:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos nucleotídicos y aminoacídicos obtenidos en el estudio del gen ND1 de *Panstrongylus herreri*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto para la secuencia nucleotídica como para la aminoacídica. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

#### 4.5.2.3 Análisis del gen COI del ADNmt

En el presente estudio se han descrito por primera vez las secuencias del gen mitocondrial COI de *P. chinai* y de *P. geniculatus* además, se ha descrito por primera vez esta secuencia COI en *P. herreri* de Perú.

##### a) Gen COI de *Panstrongylus chinai*

El análisis de las secuencias obtenidas del gen COI de los 51 especímenes analizados de *P. chinai* ha permitido obtener tres haplotipos: P.chi-COI.a (longitud 707 pb; 61,4% AT) en el 64,8% de las muestras; P.chi-COI.b (longitud 707 pb; 61,2% AT) en el 13,5%; y P.chi-COI.c (longitud 707 pb; 61,4% AT) en el 21,6%. Todos los haplotipos codifican para la misma secuencia aminoacídica P.chi-COI.I. con una longitud de 235 aminoácidos (Tabla 50).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, los haplotipos P.chi-COI.a y b se han encontrado a bajas altitudes desde los 65 a los 72 metros sobre el nivel del mar en el departamento de Piura. El haplotipo P.chi-COI.c se ha encontrado en altitudes

más elevadas, desde los 400 a los 2.388 metros sobre el nivel del mar, en Cajamarca.

Gen COI de <i>P. chinai</i>				
Haplotipos nucleotídicos/ aminoacídicos del gen COI	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			12 81 30	
P.chi-COI.a/P.chi-COI.I	707	61,4	TA	64,08%
P.chi-COI.b/P.chi-COI.I	707	61,2	.G	13,5%
P.chi-COI.c/P.chi-COI.I	707	61,4	A.	21,6%

**Tabla 50:** Alineamiento de las posiciones variables de los 3 haplotipos nucleotídicos y aminoacídicos obtenidos en el estudio del gen COI de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto para la secuencia nucleotídica como para la aminoacídica. (.) La secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

b) *Gen COI de Panstrongylus geniculatus*

El análisis de las secuencias obtenidas del gen COI de los 14 ejemplares de *P. geniculatus* analizados ha permitido obtener dos haplotipos: P.gen-COI.a (longitud 713 pb; 60% AT) en el 42,8% de las muestras; y P.gen-COI.b (longitud 713 pb; 60% AT) en el 57,1%. Los haplotipos codifican para 2 secuencias aminoacídicas diferentes P.gen-COI.I (longitud 307 Aa) y P.gen-COI.II (longitud 307 Aa) (Tabla 51).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, el haplotipo P.gen-COI.a se sitúa entorno a los 200 metros en San Martín mientras que, el haplotipo P.gen-COI.b se sitúa en altitudes más elevadas desde los 1.460 a los 1.813 metros sobre el nivel del mar en Cerro de Pasco.

Gen COI de <i>P. geniculatus</i>							
Haplotipos nucleotídicos/aminoácidos del gen COI	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Posiciones variables aminoácidas	Porcentaje de individuos por haplotipo		
			233477 916800 181967	12 23		P.gen-COI.a/P.gen-COI.I P.gen-COI.b/P.gen-COI.II	713 713

**Tabla 51:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen COI de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

c) *Gen COI de Panstrongylus herreri*

El análisis del gen COI de los 103 ejemplares de *P. herreri* analizados ha permitido obtener dos haplotipos: P.her-COI.a (longitud: 694 pb; 60,8% AT) en el 83,7% de las muestras; y P.her-COI.b (longitud: 694 pb; 61,2% AT) en el 16,3%. Los dos haplotipos nucleotídicos codifican para dos proteínas: P.her-COI.I (231 Aa) y P.COI-NDI.II (231 Aa) (Tabla 52).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, el haplotipo P.her-COI.a se sitúa desde los 700 a los 2.537 metros en Cajamarca. El haplotipo P.her-COI.b se sitúa desde los 743 a los 2.041 metros sobre el nivel del mar en San Martín.

Gen COI de <i>P. herreri</i>					
Haplotipos nucleotídicos/aminoácidos del gen COI	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Posiciones variables aminoácidas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			145 38971 27870	1 1	
P.her-COI.a/P.her-COI.I	694	60,8	TGGCC	F	83,7%
P.her-COI.b/P.her-COI.II	694	61,2	CAATT	S	16,3%

**Tabla 52:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen COI de *Panstrongylus herreri*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácídica. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

#### 4.5.2.4 Análisis del gen Cyt *b* del ADNmt

En el presente estudio se han descrito por primera vez las secuencias del gen mitocondrial Cyt *b* de *P. geniculatus* y en el caso de *P. chinai* y *P. herreri* es la primera vez que se describen en Perú.

##### a) Gen Cyt *b* de *Panstrongylus chinai*

El análisis de las secuencias obtenidas del gen Cyt *b* de los 51 especímenes analizados de *P. chinai* ha permitido obtener dos haplotipos: P.chi-Cytb.a (longitud 844 pb; 67,4% AT) en el 81,8% de las muestras; y P.chi-Cytb.b (longitud 844 pb; 67,9% AT) en el 18,2%. La traducción de estos genera dos secuencias aminoácídicas: P.chi-Cytb.I (longitud 281 Aa); y P.chi-Cytb.II (longitud 231 Aa) (Tabla 53).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, el haplotipo P.chi-Cytb.a se ha encontrado desde el nivel del mar hasta los 104 metros en los departamentos de Piura y Loreto. El haplotipo P.chi-Cytb.b se ha encontrado en altitudes más elevadas, desde los 400 a los 2.388 metros sobre el nivel del mar, en Cajamarca.

Gen Cyt b de <i>P. chinai</i>					
Haplotipos nucleotídicos/aminoácidos del gen Cyt b	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Posiciones variables aminoácidas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			112346 554968 133622	2 52 18	
P.chi-Cytb.a/P.chi-Cytb.I	844	67,4	GTCCCG	VA	81,8%
P.chi-Cytb.b/P.chi-Cytb.II	844	67,9	ACTTTA	IT	18,2%

**Tabla 53:** Alineamiento de las posiciones variables de los 2 haplotipos nucleotídicos y aminoácidos obtenidos en el estudio del gen Cyt b de *Panstrongylus chinai*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácida. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

b) *Gen Cyt b de Panstrongylus geniculatus*

El análisis de las secuencias obtenidas del gen Cyt b de los 14 ejemplares de *P. geniculatus* analizados ha permitido obtener tres haplotipos, uno de ellos completo: P.gen-Cytb.a (longitud 1.142 pb; 61,9% AT) es el único haplotipo completo y ha sido hallado en el 60% de las muestras; P.gen-Cytb.b (longitud 617 pb; 62,9% AT) en el 20%; y P.gen-Cytb.c (longitud 968 pb; 61,4% AT) en el 20% de las muestras restantes. Los haplotipos codifican para 3 secuencias aminoácidas diferentes que son respectivamente: P.gen-Cytb.I (longitud 378 Aa), P.gen-Cytb.II (longitud 204 Aa); y P.gen-Cytb.III (longitud 322 Aa). Se han comparado un gen completo y dos fragmentos que se insertan en diferentes partes del gen. Por este motivo, en la comparativa se observa un elevado número de indels. Mientras que al haplotipo P.gen-Cytb.b le falta el inicio del gen, a P.gen-Cytb-c le falta el final (Tabla 54).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, el haplotipo P.gen-Cytb.a se localiza a 1.813 metros y P.gen-Cytb.c a 1.460 metros en Cerro de Pasco y P.gen-Cytb.b se localiza sobre los 400 metros en el departamento de Amazonas.

Gen Cyt <i>b</i> de <i>P. geniculatus</i>					
Haplotipos nucleotídicos/aminoácídicos del gen Cyt <i>b</i>	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Posiciones variables aminoácídicas	%individuo/haplo
			1111 11123333455555555666777789990000 465781355680222457792550026783580224 566163218001568042914472502729473068	111 789 651	
P.gen-Cytb.a/P.gen-Cytb.I	1142	61,9	TGTA ACTATAGATCACTCCCTGTTTCACCTTTAAC	FRV	60%
P.gen-Cytb.b/P.gen-Cytb.II	617	62,9	-----TT.GT..C..C.TGT..CCGGT	LLA	20%
P.gen-Cytb.c/P.gen-Cytb.III	968	61,4	CACGGTCGCTAGC..T..GTCACCC..TTCC-----	LLA	20%

**Tabla 54:** Alineamiento de las posiciones variables de los 3 haplotipos nucleotídicos y aminoácídicos obtenidos en el estudio del gen Cyt *b* de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT). Se indican las posiciones de las mutaciones observadas tanto en la secuencia nucleotídica como aminoácídica. (-) indel. (.) La secuencia en esa posición posee el mismo nucleótido que el primer haplotipo de la comparativa. %Individuo/haplotipo: muestra qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

c) *Gen Cyt b* de *Panstrongylus herreri*

El análisis del gen Cyt *b* de los 103 ejemplares de *P. herreri* analizados ha permitido obtener siete haplotipos: P.her-Cytb.a (longitud: 835 pb; 65% AT) en el 56,9% de la muestra; P.her-Cytb.b (longitud: 835 pb; 65,4% AT) en el 21,1%; P.her-Cytb.c (longitud: 431 pb; 63,1% AT) en el 5,5%; P.her-Cytb.d (longitud: 431 pb; 63,3% AT) en el 1,83%; P.her-Cytb.e (longitud: 431 pb; 62,9% AT) en el 11,9%; P.her-Cytb.f (longitud: 431 pb; 63,1% AT) en el 0,92%; y P.her-Cytb.g (longitud: 431 pb; 62,6% AT) en el 1,83%. Sus traducciones en aminoácidos generan cuatro secuencias: P.her-Cytb.I (longitud 238 Aa); P.her-Cytb.II (longitud 238 Aa); P.her-Cytb.III (longitud 143 Aa); y P.her-Cytb.IV (longitud 143 Aa). Los haplotipos P.her-Cytb.c y P.her-Cytb.d generan la misma proteína son los más homólogos entre sí y muy diferentes al resto. Los haplotipos más cortos se corresponden con un fragmento inicial del gen (Tabla 55).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú: el haplotipo P.her-Cytb.a se localiza desde los 700 a los 2.537 metros y es el más extendido en Cajamarca; P.her-Cytb.b se localiza en el Amazonas desde los 468 a los 2.143 metros; P.her-Cytb.c se localiza sobre los 130 metros en La Libertad y a los 1.990 en Cajamarca; P.her-Cytb.d se ha



a) *Región intergénica que separa los genes Cyt b y ND1 del ADNmt de Panstrongylus chinai*

El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNmt de los 51 especímenes analizados de *P. chinai* ha permitido obtener una secuencia P.chi-tRNA (longitud de 187 pb; 74,3% AT).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, solamente se ha encontrado una secuencia desde los 65 a los 2.388 metros sobre el nivel de mar en Piura, Cajamarca y Loreto.

b) *Región intergénica que separa los genes Cyt b y ND1 del ADNmt de Panstrongylus geniculatus*

El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNmt de los 14 ejemplares de *P. geniculatus* analizados ha permitido obtener dos secuencias: P.gen-tRNA.a (longitud de 334 pb; 69,7% AT) en el 80% de las muestras; y P.gen-tRNA.b (longitud de 335 pb; 71,1% AT) en el 20% (Tabla 56).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, el haplotipo P.gen-tRNA.a se sitúa entre los 1.460 y los 1.813 metros en Cerro de Pasco y P.gen-tRNA.b sobre los 468 metros en Amazonas. Esta distribución es similar a la obtenida en el estudio del gen *Cyt b* para esta especie.

c) *Región intergénica que separa los genes Cyt b y ND1 del ADNmt de Panstrongylus herreri*

El análisis de las secuencias obtenidas de la región intergénica del ADNmt de los 103 ejemplares de *P. herreri* analizados ha permitido obtener dos secuencias: P.her-tRNA.a (longitud de 450 pb; 66,7% AT) en el 75,8% de las muestras; y P.her-tRNA.b (longitud de 450 pb; 65,8% AT) en el 24,2% (Tabla 57).

En cuanto al estudio por altitudes geográficas y distribución por departamentos de Perú, el haplotipo P.her-tRNA.a se sitúa entre los 700 y los 2.537 metros en Cajamarca. EL haplotipo P.her-tRNA.b se sitúa entre los 468 y los 2.143 metros sobre el nivel del mar en Amazonas.

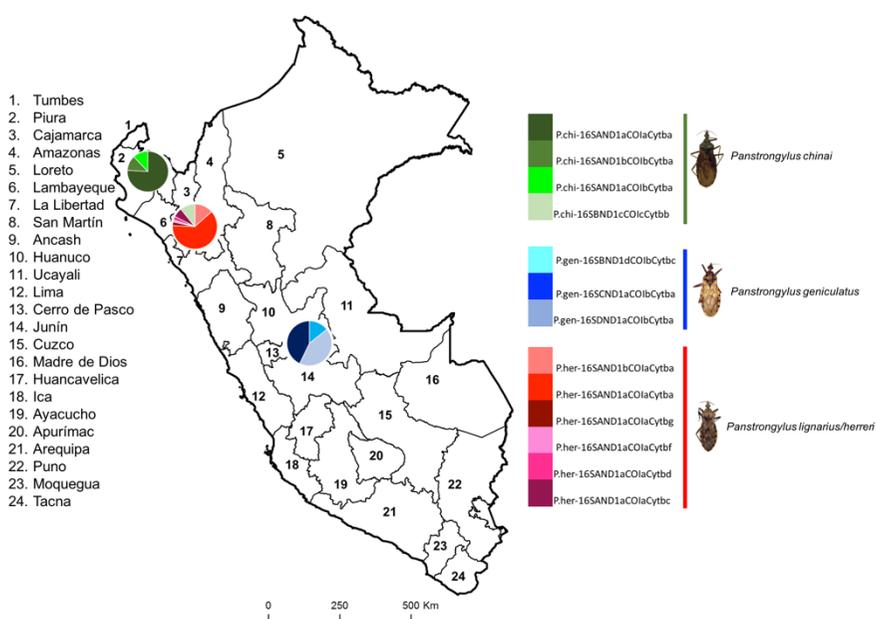
Región intergénica que separa los genes <i>Cyt b</i> y ND1 del ADNmt de <i>P. geniculatus</i>				
Secuencias nucleotídicas de la región intergénica que separa los genes <i>Cyt b</i> y ND1	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			1111111111111222222222223 4444555677771122344578899000222266673 803786893456769278124969342459012325834	
P.gen-tRNA.a	334	69,7	TA-ATCTGAGGTGGGGTC--TCA-ATCTGAGGTGGGGTG	80,0%
P.gen-tRNA.b	335	71,1	CGATCTCAGAA-ATAACGATCTGATCTCAGAA-ATAAC-	20,0%

**Tabla 56:** Alineamiento de las posiciones variables de las 2 secuencias nucleotídicas obtenidas en el estudio de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 del ADNmt de *Panstrongylus geniculatus*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT) . Se indican las posiciones de las mutaciones observadas en la secuencia nucleotídica. (-) indel. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

Región intergénica que separa los genes <i>Cyt b</i> y ND1 del ADNmt de <i>P. herreri</i>				
Secuencias nucleotídicas de la región intergénica que separa los genes <i>Cyt b</i> y ND1	Longitud (pb)	AT%	Posiciones variables nucleotídicas	Porcentaje de individuos por haplotipo
			123 6420 0369	
P.her-tRNA.a	450	66,7	AAAA	75,8,0%
P.her-tRNA.b	450	65,8	GGGG	24,20%

**Tabla 57:** Alineamiento de las posiciones variables de las 2 secuencias nucleotídicas obtenidas en el estudio de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 del ADNmt de *Panstrongylus herreri*. Se muestra la longitud de los haplotipos como pares de bases (pb) y porcentaje de Adenina y Timina (%AT) . Se indican las posiciones de las mutaciones observadas en la secuencia nucleotídica. (-) indel. Se incluye qué porcentaje de los ejemplares estudiados posee cada haplotipo.

Los resultados obtenidos en el estudio del ADNr y ADNmt de todas las muestras de *Panstrongylus* estudiadas se muestran en los Anexos VIII y IX. A continuación, se muestra un mapa con la distribución geográfica de los haplotipos del ADNmt concatenados obtenidos de las especies de *Panstrongylus* de Perú estudiadas (Figura 50).



**Figura 50:** Mapa de la distribución geográfica de los haplotipos concatenados del ADNmt de las especies de *Panstrongylus* de Perú, caracterizadas en el presente estudio. Se representa cada especie con un color, dentro de cada color las diferentes tonalidades representan diferentes haplotipos.

## 4.6 Análisis comparado de los resultados obtenidos de las secuencias de *Panstrongylus* de Perú con las publicadas en *GenBank*

En el presente punto se comparan las secuencias obtenidas con las escasas secuencias publicadas en *GenBank* de este género. Muchas de las secuencias publicadas son homólogas por tanto, se han agrupado en haplotipos y se han nombrado de forma estandarizada siguiendo las pautas de Bargues y colaboradores (2006) y Mas-Coma y Bargues (2009).

### 4.6.1 Análisis comparado del ADNr de *Panstrongylus*

#### 4.6.1.1 Análisis comparado del ITS-1 del ADNr

Se han obtenido un total de 30 secuencias del ITS-1 (6 en el estudio y 24 en *GenBank*) de *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri* y *P. megistus* procedentes de Perú, Ecuador y Brasil; con longitudes que van desde las 572 a las 766 pb. Estas secuencias se agrupan en 27 haplotipos diferentes: 1 de *P. chinai*; 4 de *P. geniculatus*; 2 de *P. herreri*; y 20 de *P. megistus* (Anexo X).

El alineamiento manual de los 27 haplotipos revela la presencia de 567 posiciones variables de las cuales: 213 son posiciones parsimónicamente informativas, 117 son *singletons*; y 237 son indels introducidos para el alineamiento. No se incluye la tabla con las posiciones variables debido a su gran extensión.

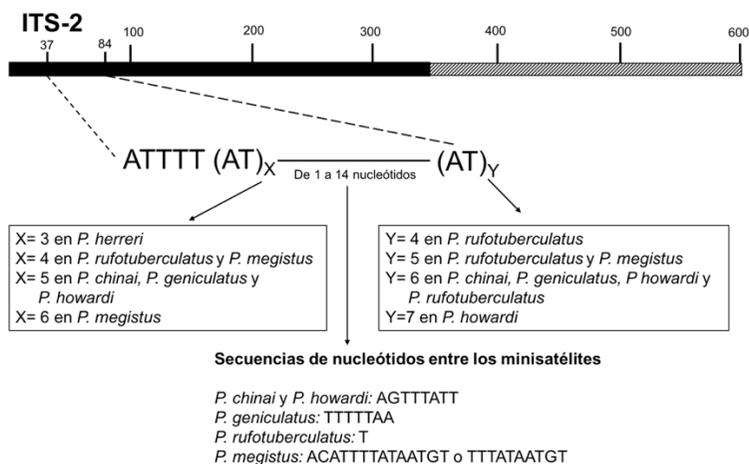
En todas las especies de *Panstrongylus* estudiadas se han encontrado dos minisatélites en el ITS-1: TA(AT)<sub>x</sub> y (AT)<sub>y</sub>. En función de la especie, X se repite 3 o 4 veces e Y se repite 5 o 7 veces. En todos los haplotipos estos minisatélites aparecen en el mismo orden pero en distinta posición.

4.6.1.2 Análisis comparado del ITS-2 del ADN

Se han obtenido un total de 107 secuencias del ITS-2 (12 en el estudio y 95 en *GenBank*) de *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *P. howardi*, *P. megistus* y *P. rufotuberculatus* procedentes de Perú, Ecuador, Brasil, Bolivia y Colombia; con longitudes que van desde las 348 a las 601 pb. Estas secuencias se agrupan en 81 haplotipos diferentes: 26 de *P. chinai*; 3 de *P. geniculatus*; 2 de *P. herreri* (que engloban secuencias publicadas como *P. herreri* y como *P. lignarius*); 26 de *P. howardi*; 14 de *P. megistus*; y 10 de *P. rufotuberculatus* (Anexo XI).

Se han comparado y alineado manualmente 81 haplotipos completos, lo que revela la presencia de 468 posiciones variables de las cuales: 174 son posiciones parsimónicamente informáticas, 46 son *singletons* y 248 son indels introducidos para el alineamiento. No se incluye la tabla con las posiciones variables debido a su gran extensión.

Se han detectado dos minisatélites  $ATTTT(AT)_x$  y  $(AT)_y$  en todas las especies de *Panstrongylus* comparadas, estas secuencias se localizan en la misma zona, al inicio del marcador entre las bases 37 y 84, con una separación de 1 a 14 nucleótidos (Figura 51). Los únicos haplotipos en los que no se ha detectado estos minisatélites han sido en los haplotipos cortos de *P. chinai*.



**Figura 51:** Minisatélites detectados en el marcador ITS-2 en todas las especies de *Panstrongylus* estudiadas. La secuencia del marcador ITS-2 se representa mediante la línea gruesa negra y la línea rayada ya que en función de la especie, la longitud del marcador puede variar de 348 a 601 pb. Cada especie presenta un número de repeticiones diferentes de AT y tiene una secuencia de nucleótidos distinta entre los minisatélites.

#### 4.6.1.3 Análisis comparado de la región intergénica del ADNr

Se han obtenido un total de 40 secuencias de la región intergénica del ADNr (14 en el estudio y 26 en *GenBank*) de *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri* y *P. megistus* procedentes de Perú y Brasil; con longitudes que van desde las 1.142 a las 1.520 pb. Estas secuencias se agrupan en 40 haplotipos diferentes: 10 de *P. chinai*; 2 de *P. geniculatus*; 2 de *P. herreri*; y 26 de *P. megistus* de los cuales 2 son incompletos (Anexo XII).

Se han comparado y alineado manualmente 38 haplotipos completos, como resultado se observan 1.035 posiciones variables de las cuales: 387 son posiciones parsimónicamente informativas y 163 son *singletons*; y 485 son indels introducidos para el alineamiento. No se incluye la tabla con las posiciones variables debido a su gran extensión.

Como se ha comentado, se han encontrado en la mayoría de las secuencias de *Panstrongylus* dos minisatélites en el ITS-1 y dos en el ITS-2.

#### 4.6.2 Análisis comparado del ADNmt de *Panstrongylus*

##### 4.6.2.1 Análisis comparado del gen ribosomal 16S del ADNmt

Se han obtenido un total de 32 secuencias del gen 16S (8 en el estudio y 24 en *GenBank*) de *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *P. lutzi*, *P. megistus* y *P. tupynambai* procedentes principalmente de Perú y Brasil; con longitudes que van desde las 280 a las 558 pb. Estas secuencias se agrupan en 32 haplotipos diferentes: 2 de *P. chinai*; 7 de *P. geniculatus*; 5 de *P. herreri* (de los cuales 2 han sido publicados como *P. lignarius*); 14 de *P. megistus*; 2 de *P. lutzi*; y 2 de *P. tupynambai* (Anexo XIII).

Se ha comparado y alineado un fragmento de 514 pares de bases de 25 haplotipos del gen 16S de *Panstrongylus*, el cual revela la presencia de 113 posiciones variables de las cuales: 97 son posiciones parsimónicamente informativas y 16 son *singletons* (Tabla 58).

#### 4.6.2.2 Análisis comparado del gen ND1 del ADNmt

Se han obtenido un total de 13 secuencias del gen ND1 (10 en el estudio y 3 en *GenBank*) de *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri* y *P. megistus* procedentes de Perú, Ecuador y Brasil; con longitudes que van desde las 545 a las 924 pb, que es la longitud del gen completo. Estas secuencias se agrupan en 12 haplotipos diferentes: 3 de *P. chinai*; 6 de *P. geniculatus*; 2 de *P. herreri*; y 1 de *P. megistus* (Anexo XIV).

Se ha comparado y alineado un fragmento de 545 pares de bases de los 12 haplotipos del gen ND1 de *Panstrongylus*, el cual revela la presencia de 144 posiciones variables de las cuales: 101 son posiciones parsimónicamente informativas; y 43 son *singletons*. El fragmento comparado codifica para 181 aminoácidos con 35 posiciones variables (Tabla 59 y Tabla 60).

#### 4.6.2.3 Análisis comparado del gen COI del ADNmt

Se han obtenido un total de 16 secuencias del gen COI (7 en el estudio y 9 en *GenBank*) de *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *P. lutzi* y *P. megistus* procedentes principalmente de Perú y Brasil; con longitudes que van desde las 334 a las 1.447 pb. Estas secuencias se agrupan en 16 haplotipos diferentes: 3 de *P. chinai*; 2 de *P. geniculatus*; 3 de *P. herreri*; 1 de *P. lutzi*; y 7 de *P. megistus* (Anexo XV).

Se ha comparado y alineado un fragmento de 625 pares de bases de 10 haplotipos del gen COI de *Panstrongylus*, el cual revela la presencia de 159 posiciones variables de las cuales: 152 son posiciones parsimónicamente informativas; y 7 son *singletons*. El fragmento comparado codifica para 208 aminoácidos con 3 posiciones variables (Tabla 61).

#### 4.6.2.4 Análisis comparado del gen *Cyt b* del ADNmt

Se han obtenido un total de 105 secuencias del gen *Cyt b* (12 en el estudio y 93 en *GenBank*) de *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *P. megistus*, *P. howardi*, *P. rufotuberculatus* y *P. tupynambai* procedentes de Perú, Ecuador y Brasil; con longitudes que van desde las 341 a las 1.142 pb. Estas secuencias se agrupan en 62 haplotipos diferentes: 11 de *P. chinai*; 3 de *P. geniculatus*; 8 de *P. herreri* (uno de ellos publicado como *P. lignarius*); 18 de *P. megistus*; 9 de *P. howardi*; 11 de *P. rufotuberculatus*; y 2 de *P. tupynambai* (Anexo XVI).

Se ha comparado y alineado un fragmento de 431 pares de bases de 45 haplotipos del gen *Cyt b* de *Panstrongylus*, el cual revela la presencia de 177 posiciones variables de las cuales: 133 son posiciones parsimónicamente informativas; 28 son *singletons*; y 16 son indels, ya que se ha incluido una muestra de *P. lignarius* más corta que el resto. El fragmento comparado codifica para 143 aminoácidos con 22 posiciones variables (Tabla 62 y 63).

#### 4.6.2.5 Análisis comparado de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 del ADNmt

Se han obtenido 5 secuencias distintas, todas ellas en el presente estudio, de la región intergénica que separa los genes *Cyt b* y ND1 en las especies de Perú estudiadas: *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. herreri*. La longitud varía de 187 (en *P. chinai*) a 450 pb (en *P. herreri*) y el contenido medio en AT es del 69,5% (Véase el apartado 4.5.2.5).

Se han comparado y alineado las regiones intergénicas obtenidas para cada especie y se han observado 224 posiciones variables de las cuales: 154 son mutaciones y 70 son indels. Esta región a pesar de su corta longitud presenta un gran número de mutaciones entre especies. No se incluye la tabla con las posiciones variables debido a su gran extensión.











## 4.7 Reconstrucción filogenética del género *Panstrongylus*

La reconstrucción filogenética de las especies estudiadas del género *Panstrongylus* se ha llevado a cabo utilizando los haplotipos obtenidos en este estudio conjuntamente con otras secuencias ya disponibles en el *GenBank*. Para enraizar el árbol se ha utilizado como grupo externo o *outgroup* secuencias de *T. infestans* de Perú, ya que es una especie que se localiza en un taxón separado pero filogenéticamente próximo al género *Panstrongylus*. Todos los árboles filogenéticos han sido construidos mediante métodos probabilísticos basados en caracteres: máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) (MV) e inferencia Bayesiana (IB). Todos los árboles han sido construidos mediante el modelo evolutivo GTR (*General Time Reversible*). El programa PartitionFinder 2 indicó que la mejor forma de analizar los datos es mediante una matriz donde las tasas evolutivas y las frecuencias se calculan por separado para cada marcador (Anexos XVII, XVIII y XIX).

### 4.7.1 Árbol filogenético del ADNr

Se ha construido un árbol filogenético de haplotipos de especies del género *Panstrongylus* cuya matriz ha sido la combinación de los marcadores del ADNr ITS-1 e ITS-2. El gen 5.8S no se incluye puesto que no varía en triatomíneos. Todos los ejemplares utilizados de *P. megistus* son de Brasil del estudio de Cavassin y colaboradores (2014). Los haplotipos de *P. geniculatus* son de Perú (obtenidos en el presente trabajo) y de Ecuador como resultado de juntar el ITS-1 publicado en *GenBank* por Mas-Coma y Bargues (2009) y el ITS-2 de Marcilla y colaboradores (2002). Las matrices de *P. herreri* y *P. chinai* proceden de Perú y han sido obtenidas en el presente trabajo.

Las filogenias obtenidas de ML (-lnL= 5406,27683) y de IB (-lnL=5498,60) generaron árboles con topología similar. En ambos, los nodos tienen un alto soporte estadístico en las ramas que separan a las especies pero las relaciones entre haplotipos dentro de cada especie quedaron poco resueltas, sobretodo en el análisis de MV. El árbol muestra una conformación anidada con una topología con elevado soporte estadístico de 4 grupos

monofiléticos, uno para cada especie. En el clado de *P. megistus* se distingue un grupo formado por 3 haplotipos pertenecientes al mismo Estado (Paraná, Brasil) y al mismo ecotopo (peridoméstico).

Con el máximo soporte de 100/100 (MV/IB) se separa el taxón *P. herreri* del resto de especies y *P. geniculatus* se separa de *P. chinai* con un soporte elevado de 93/99 (MV/IB). Los haplotipos de *P. geniculatus* se agrupan según su país de procedencia. En el taxón *P. chinai* las relaciones entre los haplotipos se representan como una parafilia excepto los haplotipos sin minisatélites que se localizan separados del resto con el máximo soporte estadístico 100/100 (MV/IB) (Figura 52). Los resultados del análisis bayesiano se pueden consultar en el Anexo XVII.



#### 4.7.2 Árbol filogenético nuclear y mitocondrial

Se ha construido un árbol filogenético de haplotipos de especies del género *Panstrongylus* cuya matriz ha sido la combinación de los marcadores nucleares del ADNr ITS-1 e ITS-2 junto con los genes del ADNmt 16S, ND1, COI y *Cyt b*. Todos los ejemplares de *P. megistus* proceden de Brasil, los haplotipos concatenados se han formado teniendo en cuenta los estados de los que proceden los individuos. Para los marcadores nucleares de *P. megistus* se utilizaron los haplotipos de Cavassin y colaboradores (2014) y para los mitocondriales los de Justi y colaboradores (2014). Los haplotipos de *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. herreri* proceden de Perú y han sido hallados en el presente estudio.

Las filogenias obtenidas de MV (-lnL= 12127,5073) y de IB (-lnL= 12308,24) generaron árboles con topología similar, donde el mayor soporte estadístico se localiza en la separación entre especies. Los valores del árbol ML son menores a los de IB. Se observan 4 grupos monofiléticos con alto soporte estadístico para cada especie que a su vez, se dividen en 2 conjuntos por un lado, *P. megistus* más cercano a la raíz y por otro, el conjunto formado por *P. herreri*, *P. geniculatus* y *P. chinai*.

Las diferencias entre haplotipos en la especie *P. herreri* se localizan en el gen *Cyt b*, y en uno de los casos, en el ND1. Todos los ejemplares con los que se ha realizado el árbol han sido hallados en la Provincia de Cutervo, que se sitúa en el centro del departamento de Cajamarca, excepto uno, que es de la Provincia de Jaén. La topología del taxón de la especie *P. herreri* está relacionada con la altitud: por un lado, se observa un taxón con un soporte estadístico elevado (95/98) (MV/IB) que reúne haplotipos localizados entre unas altitudes muy concretas los 1.790 y 1.990 metros; y por otro, el de los haplotipos con una amplia distribución altitudinal desde los 700 a los 2.271 metros sobre el nivel del mar.

*P. geniculatus* y *P. chinai* se dividen en dos grupos monofiléticos con un soporte de 95/99 (MV/IB). El taxón *P. geniculatus* se agrupan en función de las diferencias detectadas en el ADNr. Dentro del taxón *P. chinai* las relaciones entre los haplotipos se representan como una parafilia debido al escaso soporte estadístico que presentaban sus ramas, excepto en los haplotipos sin minisatélites que se agrupan separados del resto con el máximo soporte estadístico (Figura 53). Los resultados del análisis bayesiano se pueden consultar en el Anexo XV.



**Figura 53:** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (-Ln=12127,5073) cuya matriz son los marcadores del ADNr ITS-1 e ITS-2 y los genes del ADNmt 16S, ND1, COI, Cyt *b* de especies de *Panstrongylus*. El modelo evolutivo utilizado ha sido GTR. Los valores de soporte de los nodos (a/b), han sido obtenidos utilizando métodos probabilísticos basados en caracteres: a: Máxima Verosimilitud mediante el método Bootstrap con el software RAxML v.8.1.7; y b: Inferencia Bayesiana mediante probabilidad posterior con el software MrBayes v.3.2.6. Como grupo externo se ha utilizado *Triatoma infestans* de Perú. La barra de la escala indica el número de sustituciones por posición de la secuencia. Se marcan de color violeta las ramas de *Panstrongylus megistus*, de rojo las de *Panstrongylus herreri*, de azul las de *Panstrongylus geniculatus* y de verde las de *Panstrongylus chinai*. Para obtener más información sobre los haplotipos revisar los anexos VII - XVI.

#### 4.7.3 Árbol filogenético del ITS-2 y de Cyt *b*

Se ha construido un árbol filogenético de haplotipos de especies del género *Panstrongylus* cuya matriz ha sido la combinación del marcador nuclear ITS-2 del ADNr y del gen Cyt *b* del ADNmt. Se han elegido estos dos marcadores porque son de los que más secuencias se han publicado en el género *Panstrongylus*. Todos los ejemplares de *P. megistus* proceden de Brasil, los haplotipos concatenados se han formado teniendo en cuenta los estados de los que proceden los individuos. Los haplotipos del ITS-2 de *P. megistus* se obtuvieron de los publicados por Cavassin y colaboradores (2014) y los del gen Cyt *b* de Justi y colaboradores (2014). Los haplotipos de *P. chinai*, *P. howardi* y *P. rufotuberculatus* proceden de Ecuador y fueron publicados por Semperteguisosa y colaboradores (2012). Para la especie *P. chinai* también se han utilizado haplotipos de Perú que han sido hallados en el presente estudio al igual que en el caso de *P. geniculatus* y *P. herreri*.

Las filogenias obtenidas de MV (-lnL= 5021,96294) y de IB (-lnL= 5022,04) generaron árboles con topología similar. Los valores más elevados en los soportes estadísticos fueron los de IB.

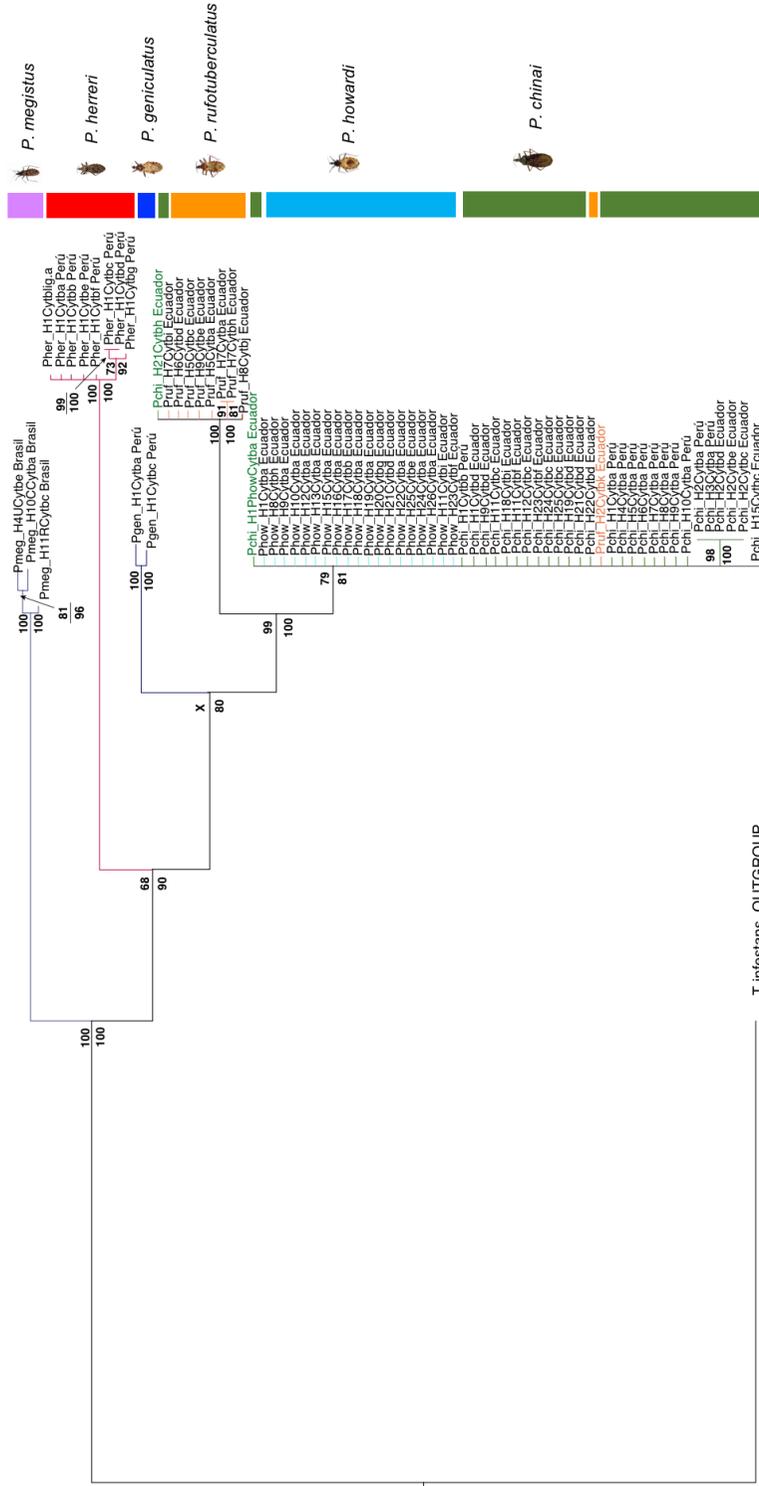
La topología del árbol es anidada y diferente a la de los anteriores, ya que algunos grupos de especies no son homogéneos. El grupo más cercano a la raíz es *P. megistus*. En el siguiente nivel, *P. herreri* se separa del resto de especies con un soporte estadístico bajo 68/90 (MV/IB). Los haplotipos dentro de esta

especie se agrupan, al igual que en el caso anterior, en función de las diferencias halladas en el gen *Cyt b*. Dentro del clado hay dos grupos geográficos: los de Cajamarca y Amazonas separados del resto con un soporte de 73/92 (MV/IB); y los de Cajamarca y San Martín, representados como una parafilia, por lo que se deduce que hay dos corrientes de flujo genético desde Cajamarca para el gen *Cyt b*, una va hacia el sur y la otra, hacia el este. Se ha incluido un haplotipo publicado como *P. lignarius* (Pher-H1Cytblig.a) que se agrupa con los haplotipos de *P. herreri*.

El siguiente taxón es el de *P. geniculatus*, según el árbol de MV esta separación no tiene un soporte significativo puesto que es menor a 70 y sin embargo, según el árbol de IB sí que es significativo (99). Hasta este nivel cada taxón era monofilético y solo contenía haplotipos de una especie.

*P. rufotuberculatus*, *P. howardi* y *P. chinai*; forman taxones en los que las relaciones entre haplotipos no se pueden establecer para cada especie ya que los soportes estadísticos obtenidos son muy bajos y además, aparecen mezclados unos con otros, por ello quedan representados como una parafilia. La única agrupación que se puede destacar dentro de este grupo por su elevado soporte estadístico (100/100) (MV/IB) es la de los haplotipos de *P. chinai* sin minisatélites que se han encontrado tanto en Ecuador como en Perú (Figura 54). Las matrices utilizadas de estas tres especies en el árbol filogenético muestran importantes incongruencias puesto que no se observan agrupaciones coherentes ni entre las especies, ni entre sus haplotipos. Este hecho pone de manifiesto o bien, errores en la clasificación taxonómica o bien, posibles hibridaciones. Para resolver esta cuestión se ha estudiado la filogenia de cada marcador por separado y como resultado las 3 especies y sus haplotipos siguen apareciendo agrupados unos con otros lo que refuerza la teoría de posibles errores en la identificación de los ejemplares. Los resultados del análisis bayesiano se pueden consultar en los Anexos XI y XVI.

Capítulo 4: Análisis de las especies del género *Panstrongylus* de Perú



T.infestans\_OUTGROUP

0.07

**Figura 54:** Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud (-Ln= 5021,96294) cuya matriz es el conjunto formado por la unión del marcador del ADNr ITS-2 del ADNr y del gen del ADNmt Cyt *b* de especies de *Panstrongylus*. El modelo evolutivo utilizado ha sido GTR. Los valores de soporte de los nodos (a/b), han sido obtenidos utilizando métodos probabilísticos basados en caracteres: a: Máxima Verosimilitud mediante el método Bootstrap con el software RAxML v.8.1.7; y b: Inferencia Bayesiana mediante probabilidad posterior con el software MrBayes v.3.2.6. Como grupo externo se ha utilizado *Triatoma infestans* de Perú. La barra de la escala indica el número de sustituciones por posición de la secuencia. Se marcan de color violeta las ramas de *Panstrongylus megistus*, de rojo las de *Panstrongylus herreri*, de azul oscuro las de *Panstrongylus geniculatus*, de verde las de *Panstrongylus chinai*, de color naranja *Panstrongylus rufotuberculatus* y de color azul claro las de *Panstrongylus howardi*. Los 3 haplotipos que se localizan en ramas distintas a las de su especie aparecen en color. Para obtener más información sobre los haplotipos revisar los Anexos XI y XVI.

## 4.8 Discusión

La distribución de *Panstrongylus* en Perú se limita al norte y centro del país. Muchas de las especies halladas también se encuentran en países vecinos como Colombia y Ecuador.

### 4.8.1 Marcadores del ADNr de *Panstrongylus*

#### *ITS-1 del género Panstrongylus*

El marcador ITS-1 en el género *Panstrongylus* presenta una longitud de 572 a 766 pb (longitud media 727 pb) y una composición media en AT de 69,4%. La longitud del ITS-1 varía entre especies e incluso entre poblaciones dentro de la misma especie, como en *P. megistus* que puede variar de 758 a 766 pb. El marcador ITS-1 es el menos variable del ADNr de *Panstrongylus*.

Al igual que ocurre en otros triatomíneos, dentro de este marcador se observan minisatélites en las especies estudiadas *P. chinai*, *P. herreri*, *P.*

*geniculatus* y *P. megistus* que a diferencia de los encontrados en las poblaciones de *T. infestans* no permiten distinguir los ecotopos de los que proceden las muestras (Bargues *et al.*, 2006; Cavassin *et al.*, 2014).

#### *ITS-2 del género Panstrongylus*

El marcador ITS-2 en *Panstrongylus* presenta una longitud de 348 a 601 pb (longitud media 478 pb) por lo que es más corta que la del ITS-1 y un alto porcentaje en AT (77,1%), como ocurre en otras especies de Triatominae (Bargues *et al.*, 2006; Mas-Coma & Bargues, 2009; Cavassin *et al.*, 2014). La longitud en el ITS-2 varía entre especies e incluso dentro de la misma especie. Este hecho también ocurre, aunque de forma menos acusada, en *Triatoma* y *Rhodnius* (Cavassin *et al.*, 2014). Las distintas longitudes y las diferencias en la composición nucleotídica del ITS-2 en *Panstrongylus* pueden ser un reflejo del origen relativamente antiguo de este género (Marcilla *et al.*, 2002).

Al igual que ocurría con el ITS-1, dentro del ITS-2 se observan minisatélites en todas las especies estudiadas: *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. herreri*, *P. howardi*, *P. megistus* y *P. rufotuberculatus*. Los minisatélites detectados se localizan en todos los ejemplares en el inicio de la secuencia entre las bases 37 y 84, por lo que podrían ser polimorfismos que se conservan de un ancestro común. En las muestras en las que no se ha detectado el minisatélite sí se observan las 4 bases iniciales (ATTT) en la misma posición que el resto, lo que sugiere que estas secuencias también conservan una parte de estos polimorfismos ancestrales. La detección de minisatélites no se puede utilizar de forma exclusiva en *Panstrongylus* para identificar individuos de una determinada comunidad o hábitad (Sempertegui-Sosa, 2012; Cavassin *et al.*, 2014). La presencia o ausencia de minisatélites son la causa principal de las grandes diferencias en longitud detectadas en el género. Para la especie *P. chinai* se han detectado dos tipos de secuencias, en función de si poseen o no minisatélites, con una desigualdad de 146 pb en su longitud, lo que supone una divergencia del 30%. Inicialmente, esta disparidad tan acusada hizo pensar que las secuencias más cortas pudieran ser pseudogenes, como ocurre en otras especies de Triatominae sin embargo, la ausencia de diferencias en el gen 5.8S descartaron esa posibilidad, a pesar de que el marcador ITS-2 de *P. chinai* sí que cumple parte de los criterios de Mas-Coma y Bargues (2009) y Bargues y

colaboradores (2014) para ser una secuencia pseudogénica como: una diferencia importante en longitud y un elevado número de variaciones entre la secuencia funcional y la pseudogénica, siendo la mayoría de ellas indels. La especie *P. chinai* actualmente, se considera un vector secundario en la transmisión de Chagas pero con un elevado potencial para convertirse en un importante vector domiciliado debido a su capacidad de colonización (Grijalva *et al.*, 2015; Mosquera *et al.*, 2016). La adaptación al domicilio podría ser una de las responsables de las variaciones longitudinales en el ITS-2 como ocurre en *T. infestans* por lo que se necesitan más estudios en esta especie para poder relacionar la presencia/ausencia de minisatélites con la capacidad de domiciliación.

De todos los marcadores estudiados, solo en el ITS-2 se ha detectado un mismo haplotipo en dos especies, *P. chinai* y *P. howardi*, las cuales comparten el haplotipo P.chi-H1. Estas especies conviven en Ecuador en la misma área y en los mismos ecotopos (Sempertegui-Sosa, 2012) por lo que este resultado puede ser consecuencia de hibridaciones o de errores en la identificación.

#### *Región intergénica del ADNr del género Panstrongylus*

La región intergénica completa del ADNr comprende el ITS-1, 5.8S e ITS-2, para el género *Panstrongylus* tiene una longitud de 1.142 a 1.520 pb (longitud media 1.419 pb) y un contenido medio en AT de (69,14%). Al comparar las secuencias de la región intergénica del ADNr de *Panstrongylus* se observan numerosos indels en los ITSs, este hecho ocurre en todas las especies de Triatominae e incluso el número de estos varía entre poblaciones de la misma especie. A pesar de que los indels se consideran caracteres no informativos y aportan menos información que las transiciones y transversiones varios aspectos han de ser tenidos en cuenta. Existen 3 tipos de indels: (i) indels relacionados con uno o unos pocos nucleótidos consecutivos, pero no relacionados con la presencia de microsatélite; (ii) indels relacionados con microsatélites, con regiones más o menos largas de inserciones en función del número de secuencias incluidas en el alineamiento; y (iii) regiones relativamente largas relacionadas con el número de repeticiones de los minisatélites. Aunque las tres situaciones pueden influir en la longitud del

marcador, la segunda y la tercera situación relacionadas con micro y minisatélites tienen un mayor impacto y en algunas circunstancias puede incluso aportar valiosa información a nivel poblacional (Bargues *et al.*, 2006, Cavassin *et al.*, 2014). En triatominos, la frecuencia de los micro y minisatélites puede llevar a errores en la identificación de especies si se utilizan técnicas moleculares basadas en la longitud del marcador, como RAPD- PCR-RFLP y microsátélites. En algunos casos, las diferentes longitudes permiten identificar especies e incluso determinar los ecotopos de los que proceden como en *T. infestans* (Bargues *et al.*, 2009). En el género *Panstrongylus* estas secuencias pueden resultar útiles en la identificación de haplotipos largos o cortos en la especie *P. chinai*. En el resto de especies hasta el momento no se les puede atribuir ningún valor como identificadores. La distribución e incluso la composición de los minisatélites dentro de los marcadores es similar en *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. herreri* y es algo distinto en *P. megistus* esto puede ser uno de los motivos por los que esta especie en los árboles filogenéticos aparece separada del resto.

#### 4.8.2 Marcadores del ADNmt de *Panstrongylus*

##### *Gen 16S del ADNmt del género Panstrongylus*

Es el segundo gen del ADNmt del que más secuencias se disponen (32 secuencias). Diversos estudios llevados a cabo utilizando únicamente el gen 16S o combinándolo con el ITS-2 llegan a la conclusión de que el género *Panstrongylus* está estrechamente relacionado con *Triatoma* y los agrupa en el mismo clado (Stothard *et al.*, 1998; Hyspa *et al.*, 2002; Sainz *et al.*, 2004; Hwang & Weirauch, 2012)

En la presente tesis se han encontrado 5 haplotipos distintos de *P. geniculatus*, a pesar de ser la especie de la que menos ejemplares se han estudiado, por lo que en este gen presenta una alta variabilidad. De la especie *P. chinai* se han encontrado 2 haplotipos y 1 para *P. herreri*.

#### *Gen ND1 del ADNmt del género Panstrongylus*

El gen ND1 no ha sido muy estudiado en el género *Panstrongylus* de hecho, solo se había publicado 3 secuencias y en el presente trabajo se han obtenido por primera vez las secuencias en *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. herreri*. Al igual que ocurría con el gen 16S la especie que más variabilidad ha mostrado ha sido *P. geniculatus*, la distribución de haplotipos podría estar relacionada con diferencias altitudinales. Parece que este gen en *Panstrongylus*, al igual que ocurre en *Triatoma*, está saturado (Mas-Coma & Bargues, 2009) o presenta una baja variabilidad, por lo que no es tan útil como el resto de genes y marcadores para establecer relaciones filogenéticas. La longitud del gen en *Panstrongylus* es de 924 pb en todas las especies mientras que en *Triatoma* puede ser de 912 o de 924 pb y *Rhodnius* presenta una longitud media de 934 pb.

#### *Gen COI del ADNmt del género Panstrongylus*

Es el gen del que menos secuencias se han publicado. En Perú, *P. chinai* ha sido la especie que más variabilidad ha mostrado seguida de *P. geniculatus* y *P. herreri*. A pesar de la gran variabilidad nucleotídica encontrada en la comparativa entre especies, la traducción en aminoácidos genera muy pocas diferencias de hecho, como solo se compara un fragmento de 625 pb del gen se genera una sola secuencia de aminoácidos para *P. chinai*, dos para *P. geniculatus* y la misma secuencia para *P. herreri* y *P. megistus*. Las comparaciones entre especies del género *Panstrongylus* en las que se utiliza tanto nucleótidos como aminoácidos del gen COI indican que está saturado. El uso de este gen con fines filogenéticos en niveles taxonómicos elevados debe limitarse (Mas-Coma & Bargues, 2010).

#### *Gen Cyt b del ADNmt del género Panstrongylus*

Es el gen del ADNmt del que más información se tiene ya que es el que más ampliamente ha sido estudiado y del que más secuencias se han recopilado en el género *Panstrongylus*. En el presente estudio, se ha obtenido

por primera vez, el gen *Cyt b* completo en *P. geniculatus* cuya longitud es de 1.142 pb. Actualmente, solo se disponen de las secuencias completas de este gen en *T. infestans* (1.143 pb) que ha sido obtenido en el presente estudio y en *T. dimidiata* (1.132 pb) (Dotson & Beard, 2001).

#### 4.8.3 Análisis filogenéticos del género *Panstrongylus*

Los árboles filogenéticos que mejor soporte presentan son aquellos que combinan el ADNr y el ADNmt. Por un lado, al utilizar marcadores del ADNr se le otorga una mayor resolución a nivel específico a la filogenia y por otro, los marcadores mitocondriales mejoran la resolución a nivel poblacional. Además, el ADNmt al ser transmitido por herencia materna (haplotide) permite observar si las actuales especies del género retienen polimorfismos de sus ancestros (Mas-Coma & Bargues, 2009). Se ha sugerido que el género *Panstrongylus* se represente como un ensamblaje polifilético de especies convergentes, ya que cuando se representan especies de *Triatoma* y *Panstrongylus* muchas de ellas muestran estrechas relaciones (Patterson *et al.*, 2009).

Todas las especies de *Panstrongylus* halladas en Perú pertenecen al clado del norte debido a su distribución geográfica. Existen estudios moleculares y citogenéticos que apoyan la división entre clado norte y sur en este género. *P. megistus* es la única especie que se encuentra en ambos clados y presenta resultados citogenéticos diferentes al resto (Lent & Wygodzinsky, 1979; Crossa *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2009). En las filogenias en las que se incluye la especie *P. megistus* siempre se localiza separada de otros *Panstrongylus* y se considera que tiene una estrecha relación con especies del género *Triatoma* como *T. tibiamaculata* (Justi *et al.*, 2014).

A continuación, se discute acerca de los resultados filogenéticos más relevantes obtenidos en las especies procedentes de Perú.

##### *Panstrongylus chinai*

Se localiza en Venezuela, Perú y Ecuador. Actualmente, se considera que es un vector secundario pero su elevada capacidad de domiciliación y re-

colonización de domicilios, tras rociamientos con insecticida hace que se incluya como un objetivo importante en todas las guías de control vectorial (Mosquera *et al.*, 2016).

Se ha puesto de manifiesto en *P. chinai* la relación entre la posesión de minisatélites y grandes diferencias en longitud. Los árboles filogenéticos realizados, tanto los del ADNr exclusivamente, como los combinados separan con un elevado soporte estadístico dentro del taxón de *P. chinai* por un lado, los haplotipos cortos (sin minisatélites) y por otro, los largos. A su vez, estos haplotipos cortos presentan diferencias que se pueden observar a nivel del ADNr donde se separan con un significativo soporte estadístico los haplotipos peruanos P.chi-H2 (detectado en ejemplares domiciliados y peridomiciliados) y P.chi-H3 (detectado en domicilios, exclusivamente) poniendo de manifiesto que las diferencias entre estos pueden ser consecuencia de la adaptación al domicilio (Pollack *et al.*, 2001; Cuba *et al.*, 2002; Cabrera, 2006; Chavez, 2006; Patterson *et al.*, 2009). Realmente, para poder detectar los cambios que se produzcan en el ADN como consecuencia de la domiciliación son necesarios más estudios con ejemplares de todos los ecotopos.

El haplotipaje molecular muestra que *P. chinai* comparte un haplotipo de ITS-2 con *P. howardi*. La mayoría de los haplotipos utilizados en el estudio filogenético proceden de ejemplares capturados en las mismas zonas geográficas en Ecuador. En el árbol filogenético consenso de MB y de IB realizado con las secuencias del ITS-2 y de Cyt *b* no se detectan diferencias con un buen soporte estadístico entre ambas especies y se cruzan dentro de los taxones. *P. chinai* ha sido capturada en domicilios y es una forma melánica, de *P. howardi* (Patterson *et al.*, 2009). El ciclo biológico de *P. howardi* puede adaptarse parcialmente a ambientes silvestres y domiciliados es decir, puede vivir en nidos y troncos de palmeras y para alimentarse entrar en los domicilios o peridomicilios. Una vez allí, pueden alimentarse exclusivamente o incluso poner huevos (Sempertegui-Sosa, 2012). La diferencia morfológica unida a la diferenciación ecológica: presentan diferentes hábitats, climas y áreas geográficas (Sempertegui-Sosa, 2012); sugieren que ambas especies podrían haber sufrido especiación alopátrica. Los factores ecológicos acompañados de aislamiento geográfico pueden ser importantes mecanismos de especiación en triatomíneos (Mas-Coma & Bargues, 2009) de hecho, la diferenciación ecológica puede ocasionar cambios morfológicos que pueden tener lugar antes de la diferenciación genética (Dujardin *et al.*, 1999). En este caso, los resultados filogenéticos hacen pensar que pueden haber cruzamientos entre ambas especies o que lo que esté ocurriendo realmente sea que ha habido un error

en la identificación morfológica de las especies puesto que son similares. Son necesarios más estudios taxonómicos y moleculares de ambas especies para establecer las diferencias entre ellas.

En el árbol de ITS-2 y Cyt *b* uno de los haplotipos de *P. chinai* de Ecuador se introduce en el taxón de *P. rufotuberculatus*. Es muy probable que este haplotipo no esté correctamente identificado.

#### *Panstrongylus geniculatus*

Se han estudiado pocos ejemplares de esta especie, aún así es la especie de la que más haplotipos se han obtenido en el ADNmt.

En todos los árboles, siempre aparece el grupo *P. chinai* y *P. geniculatus* separado de *P. herreri*. Los haplotipos usados como matriz del árbol proceden de Perú pero de áreas geográficas distintas, por lo que es probable que la divergencia de estas especies tuviera lugar al mismo tiempo y de ahí que los dos taxones surjan a la vez.

En el árbol del ADNr es el único en el que se detectan dos grupos en *P. geniculatus* debido a las diferencias en el ITS-2 que aparentemente están relacionadas con la procedencia geográfica (Perú o Ecuador) de los insectos.

#### *Panstrongylus herreri*

*P. herreri* y *P. lignarius* son dos especies sinonimizadas morfológica y genéticamente (Cuba *et al.*, 2000; Crossa *et al.*, 2002; Marcilla *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003; Patterson *et al.*, 2009; dos Santos *et al.*, 2013; Alroy *et al.*, 2015) de hecho la nomenclatura correcta es *P. lignarius/herreri* puesto que fue descrito originalmente como *P. lignarius*. Se han comparado las secuencias publicadas en *GenBank* como *P. lignarius* con las de *P. herreri* y no se han detectado diferencias. Ambas especies han sido utilizadas en el árbol filogenético obtenido del ITS-2 y Cyt *b* y como resultado quedan agrupadas junto con haplotipos procedentes del departamento de Amazonas y

Cajamarca. La diferencia entre *P. herreri* y *P. lignarius* radica en aspectos geográficos y ecológicos (Patterson *et al.*, 2009) .

*P. lignarius/herreri* se considera el principal vector domiciliado de la enfermedad de Chagas en el norte de Perú aunque también se puede encontrar en nichos silvestres (Cuba *et al.*, 2000; Marcilla *et al.*, 2002; Alroy *et al.*, 2015). De los vectores estudiados, esta especie es la que menos variabilidad presenta, lo que puede resultar muy útil en la aplicación de campañas de control. Las agrupaciones detectadas dentro de esta especie en los árboles filogenéticos son debidas a diferencias altitudinales.

#### 4.8.4 Epidemiología de la enfermedad de Chagas relacionada con *Panstrongylus* y medidas de control

Según el Ministerio de Salud de Perú, el departamento donde más casos nuevos de Chagas se declaran al año es Arequipa. En los dos últimos años, además de Arequipa, los departamentos de San Martín, Cajamarca y Lambayeque han registrado también un elevado número de casos (RENACE, 2017). *P. herreri* es el vector domiciliado más importante en San Martín y Cajamarca (Cuba *et al.*, 2000; Marcilla *et al.*, 2002; Alroy *et al.*, 2015) por lo que es muy probable que esté relacionado con esta casuística y su eliminación debería ser uno de los objetivos de las campañas de control de la macro región Norte. La homogeneidad genética hallada en esta especie es un punto a favor para su completa eliminación.

Se han descrito genéticamente distintas especies de *Panstrongylus* que se pueden encontrar domiciliadas y que son capaces de actuar como vectores de *T. cruzi*. La información genética obtenida puede ser utilizada por los programas de control vectorial para caracterizar a las especies invasoras. El siguiente paso puede ser además, caracterizar qué cepa de *T. cruzi* se asocia a cada especie como ya se ha hecho en Loja, Ecuador tanto en triatominos como en pequeños mamíferos (Grijalva *et al.*, 2015). La información resultante de la caracterización de vectores y de *T. cruzi* puede llevar a establecer prioridades y medidas concretas en el control vectorial, para frenar definitivamente tanto la domiciliación de vectores, como la transmisión de la enfermedad.

La enfermedad de Chagas se está urbanizando tanto en Perú, donde se han colectado *T. infestans* en la ciudad de Arequipa como en otras ciudades de América Latina como son: Salvador en Brasil donde se ha detectado *T. tibiamaculata* (Santana *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015); Caracas en Venezuela donde han sido citados *P. geniculatus*, *T. nigromaculata*, *T. maculata* y *R. prolixus* (Carrasco *et al.*, 2014); o Cochabamba en Bolivia donde se han colectado *P. geniculatus* y *R. robustus* (Rojas-Cortez *et al.*, 2016). Ante este cambio en la epidemiología de la enfermedad, las herramientas moleculares permiten una rápida identificación de las poblaciones que están reproduciendo la invasión, lo que facilitará la evaluación del riesgo epidemiológico y el establecimiento de unas pautas de control adecuadas.

Muchas especies que se encuentran en Perú (sobre todo en el norte) también se encuentran en Ecuador y Colombia por lo que las campañas de control deberían estandarizarse para que puedan ser aplicadas en todo el territorio independientemente de las fronteras políticas.

Se han descrito fenómenos de hibridación entre especies del género *Panstrongylus* tanto en la naturaleza como en el laboratorio (Martínez *et al.*, 2006; Martínez- Ibarra *et al.*, 2009; Sempertegui-Sosa, 2012). Para corroborar estos fenómenos en la naturaleza se necesita establecer la presencia de zonas de contacto entre especies. La hibridación tiene importancia epidemiológica porque puede hacer que los híbridos generen nuevas especies con diferente variabilidad genética y resistencia a los insecticidas incluso mejoras en la adaptabilidad al medio o en la capacidad vectorial (Mas- Coma & Bargues, 2009; Sempertegui-Sosa, 2012)

Deberían de rediseñarse estrategias de control diferentes aplicadas a cada especie en las que se incrementen las frecuencias de rociamiento o el uso de insecticidas más tóxicos o con mayor durabilidad. El riesgo de re-infestación de los hogares es alto puesto que no se puede controlar a las colonias silvestres ni a muchas peridomésticas. El uso de barreras físicas en los hogares y la mejora en las condiciones de vida, así como la construcción de mejores infraestructuras puede impedir la entrada de vectores en las casas y puede que mejore el control sobre la incidencia de la enfermedad de Chagas. La mayoría de las especies del género *Panstrongylus* entran activamente en las casas volando o caminando muchas veces atraídos por su fuerte fototropismo, por lo que las barreras físicas pueden frenarlos. Además, la construcción de nuevas comunidades debería tener en cuenta la prevención de la destrucción de los hábitats silvestres, los cuales mantienen el ciclo natural de los triatomíneos.



## Capítulo 5. Conclusiones



- Se ha encontrado una gran uniformidad genética en todos los marcadores estudiados en *T. infestans* de Perú, excepto en el gen COI, donde se han encontrado 3 haplotipos. Se ha obtenido un único haplotipo en el resto de marcadores para los 113 especímenes analizados procedentes de 6 departamentos de Perú y de distintas altitudes, desde los 432 a los 2.979 metros. La gran homología obtenida puede ser consecuencia de una rápida y reciente propagación de la especie.
- La variabilidad detectada en el gen COI de *T. infestans* en Perú puede estar relacionada con resistencias a insecticidas.
- La variabilidad de haplotipos obtenidos en el ADNr de los especímenes de *T. infestans* de Perú, Bolivia, Argentina y Chile permite distinguir entre poblaciones domésticas y silvestres, observándose que el haplotipo T.inf-H1A es el más extendido, ya que está presente en zonas Andinas y no-Andinas mientras que, el haplotipo T.inf-H2A es exclusivo de regiones no-Andinas.
- Se ha detectado la presencia de minisatélites en la región intergénica del ADNr de *T. infestans* mostrando utilidad en la identificación del ecotopo de procedencia de los especímenes.
- En el estudio del ADNmt de *T. infestans* de Perú, Bolivia, Argentina y Chile el marcador que más haplotipos ha proporcionado ha sido el gen COI, seguido de Cyt *b* y ND1 y por último el gen 16S.
- Se ha obtenido por primera vez el gen Cyt *b* completo del ADNmt en *T. infestans* de Perú, Bolivia, Chile y Argentina.
- Se ha secuenciado la región intergénica que separa los genes Cyt *b* y ND1 en *T. infestans*. Actualmente, no se conoce la función de esta región pero se observan diferencias en cuanto a longitud y composición entre haplotipos, relacionadas con las diferencias halladas en el gen Cyt *b*.
- Los test de varianza molecular AMOVA muestran que la especie *T. infestans* evidencia una estructura poblacional que separa a las poblaciones en función de su distribución geográfica en dos grupos: el Andino y el no-Andino.
- Los test de neutralidad muestran que *T. infestans* ha sufrido una fuerte reducción poblacional, debido a las campañas de control pero que actualmente está en expansión.
- El análisis de las secuencias de los marcadores del ADNr y del ADNmt de 168 ejemplares de las especies *P. chinai*, *P. lignarius/herrerii* y *P. geniculatus* de Perú, colectadas en altitudes que van desde los 12 a los

3.644 metros en 12 departamentos de Perú, no ha proporcionado diferencias genéticas entre poblaciones domésticas y peridomésticas, indicando que existe flujo genético entre ambos ecotopos.

- Se han descrito por primera vez, las secuencias de la región intergénica completa (ITS-1, 5.8S, ITS-2) del ADNr en *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. lignarius/herrerri* en Perú. *P. chinai* ha sido la especie con mayor variabilidad genética. El marcador ITS-1 en esta especie ha sido secuenciado por primera vez.
- Los minisatélites detectados en los marcadores ITS-1 e ITS-2 del ADNr se asocian a grandes diferencias en longitud, de hasta un 30% en el género *Panstrongylus*. Estas diferencias pueden relacionarse con retenciones de polimorfismos de un ancestro común en algunas de las especies.
- Se han obtenido por primera vez los marcadores 16S, ND1, COI y Cyt *b* completo en las especies *P. chinai*, *P. geniculatus* y *P. lignarius/herrerri* de Perú. El marcador que más haplotipos ha proporcionado ha sido en gen Cyt *b* seguido de ND1, 16S y COI. La especie con mayor número de haplotipos en el ADNmt ha sido *P. geniculatus*.
- En la especie *P. chinai* los genes 16S, ND1 y COI han sido descritos por vez primera.
- Se ha analizado la región intergénica que separa los genes Cyt *b* y ND1 en el género *Panstrongylus*. Actualmente, no se conoce la función de esta región pero se observan grandes diferencias en cuanto a longitud y composición entre especies.
- En el estudio filogenético de especies de *Panstrongylus* los árboles obtenidos con marcadores ribosomales evidencian su utilidad en la separación de especies con elevado soporte estadístico. Los marcadores mitocondriales no alcanzan esta resolución a nivel específico pero sí, a nivel poblacional.
- Las matrices combinadas empleadas en los análisis filogenéticos en las que se han utilizado secuencias publicadas en *GenBank* muestran claras incongruencias que evidencian confusiones de clasificación taxonómica o bien, posibles hibridaciones.

## Capítulo 6. Bibliografía



- Abad-Franch F., & Monteiro F.A., 2005 - Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 77(3): 437-454.
- Alroy K.A., Huang C., Gilman R.H., Quispe-Machaca V.R., Marks M.A., Ancca-Juarez J., Hillyard M., Verastegui M., Sanchez G., & Cabrera L., 2015 - Prevalence and transmission of *Trypanosoma cruzi* in people of rural communities of the high jungle of northern Peru. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(5): e0003779.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., & Lipman D.J., 1990 - Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., & Lipman D.J., 1997 - Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17): 3389-3402.
- Apt W., Heitmann I., Jercic L., Isabel M., Jofré L., Noemí I., San Martín V., Sapunar J., Torres M., & Zulantay I., 2008 - Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. *Revista Chilena de Infectología*, 25(3): 194-199.
- Assumpção T.C., Francischetti I.M., Andersen J.F., Schwarz A., Santana J.M., & Ribeiro J.M., 2008 - An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(2): 213-232.
- Aufderheide A.C., Salo W., Madden M., Streitz J., Buikstra J., Guhl F., Arriaza B., Renier C., Wittmers L.E., Jr., Fornaciari G., & Allison M., 2004 - A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7): 2034-2039.
- Avise, J.C., 2000 - *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press (Eds), (Cambridge, England), 453 pp.
- Ayulo V.M., & Herrer A., 1944 - Estudios sobre Trypanosomiasis Americana en el Perú: I. observaciones en el departamento de Arequipa. *Revista Peruana De Medicina Experimental y Salud Publica*, 3(2): 96-117.
- Bacigalupo A., Segura J.A., García A., Hidalgo J., Galuppo S., & Cattán P.E., 2006 - Primer hallazgo de vectores de la enfermedad de Chagas asociados a matorrales silvestres en la región metropolitana, Chile. *Revista Médica de Chile*, 134(10): 1230-1236.
- Ballard J.W.O., 2000 a - Comparative genomics of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*. *Journal of Molecular Evolution*, 51(1): 64-75.

- Ballard J.W.O., 2000 b - Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Journal of Molecular Evolution*, 51(1): 48-63.
- Ballard J.W.O., & Whitlock M.C., 2004 - The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4): 729-744.
- Ballard J.W.O., & Rand D.M., 2005 - The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36: 621-642.
- Bandelt H.J., Forster P., & Rohl A., 1999 - Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1): 37-48.
- Barbu C.M., Hong A., Manne J.M., Small D.S., Calderón J.E.Q., Sethuraman K., Quispe-Machaca V., Ancca-Juárez J., del Carpio, Juan G Cornejo, & Chavez F.S.M., 2013 - The effects of city streets on an urban disease vector. *PLoS Computational Biology*, 9(1): e1002801.
- Barbu C.M., Bittenheim A.M., Pumahuanca M.L., Calderon J.E., Salazar R., Carrion M., Rospigliosi A.C., Chavez F.S., Alvarez K.O., Cornejo del Carpio J., Náquira C., & Levy M.Z., 2014 - Residual infestation and recolonization during urban *Triatoma infestans* bug control campaign, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, 20(12): 2055-2063.
- Bargues M.D., & Mas-Coma S., 1997 - Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14(5): 569-577.
- Bargues M.D, Marcilla A., Ramsey J., Dujardin J.P., Schofield C.J., & Mas-Coma S., 2000 - Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4): 567-573.
- Bargues M.D., Marcilla A., Dujardin J.P., & Mas-Coma S., 2002 - Triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi*: A molecular perspective based on nuclear ribosomal DNA markers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1): 159-164.
- Bargues M.D., Klisiowicz D.R., Panzera F., Noireau F., Marcilla A., Perez R., Rojas M.G., O'Connor J.E., Gonzalez-Candelas F., Galvão C., Jurberg J., Carcavallo R.U., Dujardin J.P. & Mas-Coma S., 2006 - Origin and phylogeography of the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* based on nuclear rDNA sequences and genome size. *Infection, Genetics and Evolution*, 6(1): 46-62.

- Bargues, M.D., Klisiowicz, D.R., & Mas-Coma, S., 2007 - The ITS-1 of the ribosomal DNA as a new molecular marker in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). In: *Actualización de la Trypanosomiasis Americana*. Universidad Nacional de Asunción (Eds.), (Paraguay), pp. 111-119.
- Bargues M.D., Klisiowicz D.R., Gonzalez-Candelas F., Ramsey J.M., Monroy C., Ponce C., Salazar-Schettino P.M., Panzera F., Abad-Franch F., Sousa O.E., Schofield C.J., Dujardin J.P., Guhl F., & Mas-Coma S., 2008 - Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(5): e233.
- Bargues, M.D., Zuriaga, M.A., & Mas-Coma, S., 2009 - Epidemiología molecular y rutas de dispersión de *Triatoma dimidiata*. In: *Tendencias y futuro de la investigación en parasitología y en productos naturales*. Memorias del seminario internacional ACOFACIEN-ACCEFYN, C. Corredor, F. Guhl, C. Duque (Eds.), (Bogotá, Colombia), pp. 77-91.
- Bargues M.D., Zuriaga M. A., & Mas-Coma S., 2014 - Nuclear rDNA pseudogenes in Chagas disease vectors: Evolutionary implications of a new 5.8 S ITS-2 paralogous sequence marker in triatomines of north, central and northern South America. *Infection, Genetics and Evolution*, 21: 134-156.
- Bargues, M.D., Schofield, C.J., & Dujardin, J.P., 2017 - Classification and phylogeny of the Triatominae in *American Trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research 2nd Edition*. Elsevier, J. Telleria, M. Tibayrenc (Eds.), (Cambridge, MA, USA), pp. 113-144.
- Barrett T.V., 1988 - Current research on Amazonian Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83: 441-447.
- Bayer A.M., Hunter G.C., Gilman R.H., Cornejo del Carpio J.G., Náquira C., Bern C., & Levy M.Z., 2009 - Chagas disease, migration and community settlement patterns in Arequipa, Peru. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(12): e567.
- Belisário C.J., Pessoa G.C.D., Silva E.M., Rosa A.C.L., Ferreira R.E., Bedin C., Wilhelms T., De Mello F., Coutinho H.S., & Fonseca E.L.O., 2017 - Genetic characterization of residual *Triatoma infestans* populations from Brazil by microsatellite. *Genetica*, 145(1): 105-114.
- Bérenger J.M., & Blanchet D., 2007 - A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(6): 733-736.

- Berenguer, J.G., 2007 - *Manual de parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Edicions Universitat Barcelona (Eds), (Barcelona, España), 517 pp.
- Blair D., Agatsuma T., Watanobe T., Okamoto M., & Ito A., 1997 - Geographical genetic structure within the human lung fluke, *Paragonimus westermani*, detected from DNA sequences. *Parasitology*, 115(4): 411-417.
- Blandón-Naranjo M., Zuriaga M.A., Azofeifa G., Zeledón R., & Bargues M.D., 2010 - Molecular evidence of intraspecific variability in different habitat-related populations of *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) from Costa Rica. *Parasitology Research*, 106(4): 895-905.
- Borges É.C., Dujardin J.P., Schofield C.J., Romanha A.J., & Diotaiuti L., 2005 - Dynamics between sylvatic, peridomestic and domestic populations of *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) in Ceará State, Northeastern Brazil. *Acta Tropica*, 93(1): 119-126.
- Bowman N.M., Kawai V., Levy M.Z., Cornejo del Carpio J.G., Cabrera L., Delgado F., Malaga F., Cordova Benzaquen E., Pinedo V.V., Steurer F., Seitz A.E., Gilman R.H., & Bern C., 2008 - Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 46(12): 1822-1828.
- Briceño-León R., 2009 - La enfermedad de Chagas en las Américas: Una perspectiva de ecosalud. *Cadernos de Saúde Pública*, 25(1): S71-S82.
- Cabrera, R., 2005 - Protocolos de vigilancia epidemiológica: Parte I. In: *Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana*. Oficina General de Epidemiología, Ministerio de Salud, (Lima, Perú), pp. 3-25.
- Cabrera C., 2006 - Protocolos de Vigilancia Epidemiológica. Parte I. In: *Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana CIE-10: B57 2ª Edición*. Oficina General De Epidemiología, Ministerio De Salud (Eds.), (Lima, Perú), pp. 87-114.
- Cáceres A.G., Troyes L., Gonzáles-Pérez A., Llontop E., Bonilla C., Heredia N., Velásquez C., & Yáñez C., 2002 - Enfermedad de Chagas en la región nororiental del Perú. I. Triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) presentes en Cajamarca y Amazonas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19(1): 17-23.
- Calleros L., Panzera F., Bargues M.D., Monteiro F., Klisiowicz D.R., Zuriaga M.A., Mas-Coma S., & Pérez R., 2010 - Systematics of *Mepraia* (Hemiptera: Reduviidae): Cytogenetic and molecular variation. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2): 221-228.

- Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., & Madden T.L., 2008 - BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10: 421.
- Carcavallo R.U., Jurberg J., Lent H., Noireau F., & Galvão C., 2000 - Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) proposals for taxonomic arrangements. *Entomologia y Vectores*, 7(1): 1-99.
- Carrasco H.J., Segovia M., Londoño J.C., Ortegoza J., Rodríguez M., & Martínez C.E., 2014 - *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: High risk factors for Chagas' disease transmission in the metropolitan district of Caracas, Venezuela. *Parasites & Vectors*, 7(1): 602.
- Catalá S., Gorla D., Juárez P., Picollo M., Panzera F., Noireau F., Rojas Cortes M., Dujardin J.P., Zerba C., Vassena C., Pérez R., Calderón G., Abraham L., Hernández M.L., Cardozo R., López E., Porcasi X., Moreno M., Schater-Broide J., Gurtler R., Lucer C., Ferrandis I., Calleros L., Ferreiro M.J., Cardozo L., Girotti J., Mijailovski S., Richer W., Kengne P., Perrineau M.M., Cohuet A., Fontenille D., Herrera B., Gentile A., Gemio A., Alderete P., Diosque P., Acosta N., Alcaraz P., Llanos A. & Uncos A., 2007 - Causas biológicas y ambientales de la estructuración espacial en *Triatoma infestans* y sus implicancias en el control vectorial. In: Taller del Cono Sur *Actualización de la Tripanosomiasis Americana*. 25 – 27 de abril de 2007. Universidad Nacional de Asunción (Eds.), (Paraguay), pp. 13-18.
- Cavassin F.B., Klisiowicz D.R., Rodrigues-Oliveira L.G., Collins-Kuehn C., Kopp R.L., Thomaz-Soccol V., Da Rosa J.A., Luz E., Mas-Coma & Bargues M.D., 2014 - Genetic variability and geographical diversity of the main Chagas' disease vector *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Triatominae) in Brazil based on ribosomal DNA intergenic sequences. *Journal of Medical Entomology*, 51(3): 616-628.
- Ceballos L.A., Piccinali R.V., Berkunsky I., Kitron U., & Gurtler R.E., 2009 - First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. *Journal of Medical Entomology*, 46(5): 1195-1202.
- Ceballos L.A., Piccinali R.V., Marcet P.L., Vazquez-Prokopec G.M., Cardinal M.V., Schachter-Broide J., Dujardin J.P., Dotson E.M., Kitron U., & Gurtler R.E., 2011 - Hidden sylvatic foci of the main vector of Chagas disease *Triatoma infestans*: Threats to the vector elimination campaign? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(10): e1365.
- Cecere M.C., Gürtler R., Canale D., Chuit R., & Cohen J., 1997 - The role of the peridomiciliary area in the elimination of *Triatoma infestans* from rural Argentine communities. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 4: 273-279.

- Cecere M.C., Vazquez-Prokopec G.M., Gurtler R.E., & Kitron U., 2004 - Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in Northwestern Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(6): 803-810.
- Ceretti Jr.W., Vendrami D.P., Gil J.M., Barata J.M.S., & Marrelli M.T., 2008 - Taxonomic and systematic analysis among Triatomine bug species (Hemiptera, Reduviidae) from colonies of the special health service of Araraquara (SESA), inferred from 16S rDNA mitochondrial sequences. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3): 455-462.
- Chagas C., 1909 - Nova tripanozomíaze humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2): 159-218.
- Chagas C., 1913 - Revisão do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Brazil Medico*, 11: 225.
- Chappuis F., Mauris A., Holst M., Albajar-Vinas P., Jannin J., Luquetti A.O., & Jackson Y., 2010 - Validation of a rapid immunochromatographic assay for diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection among Latin-American migrants in Geneva, Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(8): 2948-2952.
- Chávez, J., 2006 - Contribución al estudio de los triatomíneos del Perú: Distribución geográfica, nomenclatura y notas taxonómicas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 67 (1) 65-76.
- Cortez M.R., Emperaire L., Piccinali R.V., Gurtler R.E., Torrico F., Jansen A.M., & Noireau F., 2007 - Sylvatic *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Andean valleys of Bolivia. *Acta Tropica*, 102(1): 47-54.
- Costa J., 1999 - The synanthropic process of Chagas disease vectors in Brazil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population, genetical, ecological, and epidemiological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 239-241.
- Costa J., Barges M.D., Neiva V.L., Lawrence G.G., Gumiel M., Oliveira G., Cabello P., Lima M.M., Dotson E., Provance D.W., Almeida C.E., Mateo L., Mas-Coma S., & Dujardin J.P., 2016 - Phenotypic variability confirmed by nuclear ribosomal DNA suggests a possible natural hybrid zone of *Triatoma brasiliensis* species complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 37: 77-87.

- Coura J. R., & Viñas P. A., 2010 - Chagas disease: A new worldwide challenge. *Nature*, 465: 56-57.
- Crossa R.P., Hernández M., Caraccio M.N., Rose V., Valente S.A.S., Valente V.D.C., Mejía J.M., Angulo V.M., Ramírez C.M. S., Roldán J., Vargas F., Wolff M., & Panzera F., 2002 - Chromosomal evolution trends of the genus *Panstrongylus* (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 2(1): 47-56.
- Cuba C. A., Abad-Franch F., Roldan Rodriguez J., Vargas Vasquez F., Pollack Velasquez L., & Miles M.A., 2002 - The triatomines of northern Peru, with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(2): 175-183.
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., & Posada D., 2012 - jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772-772.
- De Noya B., Díaz-Bello Z., Colmenares C., Ruiz-Guevara R., Mauriello L., Muñoz-Calderón A., & Noya O., 2015 - Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: Epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3): 377-386.
- De Rosas A.R.P., Segura E.L., Fichera L., & García B.A., 2008 - Macrogeographic and microgeographic genetic structure of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Catamarca, Argentina. *Genetica*, 133(3): 247.
- De Rosas A.R.P., Segura E.L., Fusco O., Guiñazú A.L.B., & García B.A., 2013 - Fine-scale genetic structure in populations of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera, reduviidae). *Genetica*, 141(1-3): 107-117.
- De Salle R., Freedman T., Prager E.M., & Wilson A.C., 1987 - Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *Journal of Molecular Evolution*, 26(1-2): 157-164.
- De Souza W., 2002 – Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4): 269-285.
- Dias E., & Torrico R.A., 1943 - Preliminary studies on Chagas' disease in Bolivia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 38(2): 165-173.
- Dias J.C.P., & Schofield C.J., 1999 - The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 103-121.

- Dias J.C.P., Silveira A. C., & Schofield C.J., 2002 - The impact of Chagas disease control in Latin America: A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(5): 603-612.
- Dias J.C.P., 2007 - Southern Cone initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas disease: Historical aspects, present situation, and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 11-18.
- Dias J.C.P., Ramos A.N.Jr., Gontijo E.D., Luquetti A., Shikanai-Yasuda M.A., Coura J.R., Torres R.M., Melo J.R., Almeida E.A., Oliveira W.Jr., Silveira A.C., Rezende J.M., Pinto F.S., Ferreira A.W., Rassi A., Fragata A.A.F., Sousa A.S., Correia D., Jansen A.M., Andrade G.M., Britto C.F., Pinto A.Y., Rassi A.Jr., Campos D.E., Abad-Franch F., Santos S.E., Chiari E., Hasslocher-Moreno A.M., Moreira E.F., Marques D.S., Silva E.L., Marin-Neto J.A., Galvão L.M., Xavier S.S., Valente S.A., Carvalho N.B., Cardoso A.V., Silva R.A., Costa V.M., Vivaldini S.M., Oliveira S.M., Valente V.D., Lima M.M., & Alves R.V., 2016 - 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49 (1): 3-60.
- Díaz S., Triana-Chávez O., & Gómez-Palacio A., 2016 - The nuclear elongation factor-1 $\alpha$  gene: A promising marker for phylogenetic studies of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 43: 274-280.
- Donayre, A.C., 1958 - Enfermedad de Chagas. Estado actual en el Perú. *Anales de la Facultad de Medicina*, 41(3): 428-453.
- Dórea R.C., Póvoa M.M., Miles M.A., Souza A.A., & Barata J.M.S., 1982 - Eletroforese de enzimas para estudos de triatomíneos com referência especial a subpopulações de *Panstrongylus megistus*. *Revista Brasileira de Biologia*, 42(3): 521-526.
- Dorn P.L., Calderon C., Melgar S., Moguel B., Solorzano E., Dumonteil E., Rodas A., De la Rúa N., Garnica R., & Monroy C., 2009 - Two distinct *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811) taxa are found in sympatry in Guatemala and Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(3): e393.
- Dorn P.L., De la Rúa N.M., Axen H., Smith N., Richards B.R., Charabati J., Suarez J., Woods A., Pessoa R., Monroy C., Kilpatrick C.W., & Stevens L., 2016 – Hypothesis testing clarifies the systematics of the main Central American Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811), across its geographic range. *Infection, Genetics and Evolution*, 44: 431-433.

- Dos Santos C.M., Jurberg J., Galvão C., Rocha D.S., & Fernandez J.I., 2003 - Morphometric study of the genus *Panstrongylus* Berg, 1879 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7): 939-944.
- Dotson E., & Beard C., 2001 - Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Molecular Biology*, 10(3): 205-215.
- Dujardin J.P., Schofield C.J., & Tibayrenc M., 1998 - Population structure of Andean *Triatoma infestans*: Allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Medical and Veterinary Entomology*, 12(1): 20-29.
- Dujardin J.P., Panzera F., & Schofield C.J., 1999 - Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 223-228.
- Dujardin J.P., Schofield C.J., & Panzera F., 2000 - *Les vecteurs de la maladie de Chagas. Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques*. Academie Royale Des Sciences d'Outre-Mer (Eds.), (Bruxelles, Belgium), 162 pp.
- Dujardin, J.P., Schofield,C.J., Panzera, F., Matias, A., & De La Riva, J., 2002. *Los vectores de la enfermedad de Chagas*. Academie Royale Des Sciences d'Outre-Mer (Eds.), (Bruxelles, Belgium), 189 pp.
- Dujardin J.P., Schofield C.J., 2004 - Triatominae: Systematics, morphology and population biology. *The Trypanosomiases*. London School of Hygiene & Tropical Medicine, I. Maudlin, P. Holmes, M.A. Miles (Eds.), (London, UK), pp. 181-201.
- Dujardin J.P., Costa J., Bustamante D., Jaramillo N., & Catalá S., 2009 - Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. *Acta Tropica*, 110(2): 101-111.
- Escomel E., 1917 - Insectos hemípteros heterópteros, hematófagos en nuestros valles del sur del Perú. *La Reforma Médica*, 38: 121-122.
- Escomel E., 1919 - La tripanosomiose humaine existe dans les forets orientales du Perú. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 12: 723-730.
- Excoffier L., Smouse P.E., & Quattro J.M., 1992 - Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-491.
- Excoffier L., Laval G., & Schneider S., 2005 - Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1(1): 47-50.

- Excoffier L., & Lischer H.E., 2010 - Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564-567.
- Fabbro D., Velazquez E., Bizai M.L., Denner S., Olivera V., Arias E., Pravia C., & Ruiz A.M., 2013 - Evaluation of the ELISA-F29 test as an early marker of therapeutic efficacy in adults with chronic Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 55(3): 167-172.
- Felsenstein J., 1981 - Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6): 368-376.
- Fernández-Villegas A., Pinazo M.J., Marañón C., Thomas M.C., Posada E., Carrilero B., Segovia M., Gascon J., & López M.C., 2011 - Short-term follow-up of Chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BioMed Central Infectious Diseases*, 11: 206.
- Foley E.A., Khatchikian C.E., Hwang J., Ancca-Juárez J., Borrini-Mayori K., Quispe-Machaca V.R., Levy M.Z., & Brisson D., 2013 - Population structure of the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, at the urban-rural interface. *Molecular Ecology*, 22(20): 5162-5171.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., & Vrijenhoek R., 1994 - DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Fornaciari G., Castagna M., Viacava P., Tognetti A., Bevilacqua G., & Segura E., 1992 - Chagas' disease in Peruvian Inca mummy. *The Lancet*, 339(8785): 128-129.
- Francisco A.F., Lewis M.D., Jayawardhana S., Taylor M.C., Chatelain E., & Kelly J.M., 2015 - Limited ability of posaconazole to cure both acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infections revealed by highly sensitive *in vivo* imaging. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8): 4653-4661.
- Franzini E.J., Mendes M.T., Anhe A.C., Pelli A., Silva M.V., Rodrigues V.J., Sales-Campos H., & Oliveira C.J., 2017 - The development of *Panstrongylus herreri* under fluctuating environmental conditions. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(1): 121-125.
- Frati F., Simon C., Sullivan J., & Swofford D.L., 1997 - Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *Journal of Molecular Evolution*, 44(2): 145-158.

- Fu Y.X., 1997 - Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915-925.
- Galvão C., Carcavallo R., Rocha D.S., & Jurberg J., 2003 - A check list of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202 (1): 1-36.
- Garcia B.A., & Powell J.R., 1998 - Phylogeny of species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Medical Entomology*, 35(3): 232-238.
- Garcia B.A., Moriyama E.N., & Powell J.R., 2001 - Mitochondrial DNA sequences of triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic relationships. *Journal of Medical Entomology*, 38(5): 675-683.
- Garcia B.A., Manfredi C., Fichera L., & Segura E.L., 2003 - Short report: Variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(6): 692-694.
- Garcia B.A., Zheng L., Rosas A.R., & Segura E.L., 2004 - Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Molecular Ecology Resources*, 4(4): 568-571.
- Garcia B.A., De Rosas A.R.P, Blariza M.J., Grosso C.G., Fernandez C.J., & Stroppa M.M., 2013 - Molecular population genetics and evolution of the Chagas' disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Current Genomics*, 14(5): 316-323.
- Gaunt M.W., & Miles M.A., 2002 - An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Molecular Biology and Evolution*, 19(5): 748-761.
- Gerbi S., 1985 - Evolution of ribosomal DNA. *Molecular Evolutionary Genetics*, 35: 419-517.
- Giordano R., Cortez J.C.P., Paulk S., & Stevens L., 2005 - Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial Cytochrome b gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7): 753-760.
- Gomes Y.M., Lorena V., & Luquetti A.O., 2009 - Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 115-121.

- Grijalva M.J., Villacis A.G., Ocana-Mayorga S., Yumiseva C.A., Moncayo A.L., & Baus E.G., 2015 - Comprehensive survey of domiciliary triatomine species capable of transmitting Chagas disease in Southern Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10): e0004142.
- Guerra A.L., Alevi K.C., Banho C.A., De Oliveira J., Da Rosa J.A., & Vilela de Azeredo-Oliveira M.T., 2016 - D2 region of the 28S RNA gene: A too-conserved fragment for inferences on phylogeny of South American triatomines. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(3): 610-613.
- Guevara Y., Bracamonte O., & Guevara M., 2011 - Cromosomas heterocromáticos en *Triatoma infestans* (Klug, 1834) del sur de Perú. *The Biologist*, 9(1): 98-104.
- Guhl F., 2007 - Chagas disease in Andean countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 29-38.
- Guhl F., Jaramillo C., Vallejo G.A., Cardenas A., Arroyo F., & Aufderheide A., 2000 - Chagas disease and human migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4): 553-555.
- Guindon S., & Gascuel O., 2003 - A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- Gumiel M., Catala S., Noireau F., Rojas de Arias A., Garcia A., & Dujardin J.P., 2003 - Wing geometry in *Triatoma infestans* (Klug) and *T. melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo (Hemiptera: Reduviidae). *Systematic Entomology*, 28(2): 173-180.
- Harpending H.C., 1994 - Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66 (4): 591-600.
- Harpending H.C., Sherry S.T., Rogers A.R., & Stoneking M., 1993 - The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology*, 34(4): 483-496.
- Harry M., Dupont L., Romana C., Demanche C., Mercier A., Livet A., Diotaiuti L., Noireau F., & Empeaire L., 2008 - Microsatellite markers in *Triatoma pseudomaculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), Chagas' disease vector in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5): 672-675.
- Harry M., Dupont L., Quartier M., Diotaiuti L., Walter A., & Romana C., 2009 - New perspectives for population genetics of Chagas' disease vectors in the northeastern Brazil: Isolation of polymorphic microsatellite markers in *Triatoma brasiliensis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4): 633-637.

- Hastings W.K., 1970 - Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika*, 57(1): 97-109.
- Herrer A., 1955 - Trypanosomiasis Americana en el Perú: IV. Ingreso del *Triatoma infestans* al territorio Peruano, su dispersión en este y posibilidades de ser erradicado. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 9(1-2): 57-67.
- Herrer A., 1960 - Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas y de sus vectores en el Perú. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 49: 572-581.
- Higgins D.G., Thompson J.D., & Gibson T.J., 1996 - Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology*, 266: 383-402.
- Higuera S.L., Guhl F., & Ramírez J.D., 2013 - Identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) through the implementation of a high-resolution melting (HRM) genotyping assay. *Parasites & Vectors*, 6(1): 1.
- Hillis D.M., & Dixon M.T., 1991 - Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66(4): 411-453.
- Ho S.Y., & Shapiro B., 2011 - Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11(3): 423-434.
- Hoare C.A., 1972 - *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph*. Blackwell Scientific Publications, (Oxford, United Kingdom), 749 pp.
- Holder M., & Lewis P.O., 2003 - Phylogeny estimation: Traditional and bayesian approaches. *Nature Reviews. Genetics*, 4(4): 275.
- Holsinger K.E., 2006 - *Lecture notes in population genetics*. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, (Connecticut, MA, USA), 325 pp.
- Holsinger K.E., & Weir B.S., 2009 - Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting F(ST). *Nature Reviews. Genetics*, 10(9): 639-650.
- Hotez P.J., Molyneux D.H., Fenwick A., Kumaresan J., Sachs S.E., Sachs J.D., & Savioli L., 2007 - Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine*, 357(10): 1018-1027.
- Hotez P.J., Bottazzi M.E., Franco-Paredes C., Ault S.K., & Periago M.R., 2008 - The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9): e300.

- Hotez P.J., Dumonteil E., Cravioto M.B., Bottazzi M.E., Tapia-Conyer R., Meymandi S., Karunakara U., Ribeiro I., Cohen R.M., & Pecoul B., 2013 - An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10): e2300.
- Huelsenbeck J.P., & Crandall K.A., 1997 - Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 28(1): 437-466.
- Hurvich C.M., & Tsai C., 1993 - A corrected akaike information criterion for vector autoregressive model selection. *Journal of Time Series Analysis*, 14(3): 271-279.
- Hwang W.S., & Weirauch C., 2012 - Evolutionary history of assassin bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Insights from divergence dating and ancestral state reconstruction. *PLoS One*, 7(9): e45523.
- Hypsa V., Tietz D.F., Zrzavy J., Rego R.O., Galvão C., & Jurberg J., 2002 - Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae): Molecular evidence of a new world origin of the Asiatic clade. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(3): 447-457.
- Jannin, J., & Salvatella, R., 2006 - *Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas*. Organización Panamericana de la Salud (Eds.), (Montevideo, Uruguay), 28 pp.
- Jorgensen R.A., & Cluster P.D., 1988 - Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: New characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75(4): 1238-1247.
- Joyce P., Krone S.M., & Kurtz T.G., 2003 - When can one detect overdominant selection in the infinite-alleles model? *The Annals of Applied Probability*, 13(1): 181-212.
- Junior W.C., Vendrami D.P., Gil J.M., Barata J.M.S., & Marrelli M.T., 2008 - Análise das relações taxonômicas e sistemáticas entre espécies de triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae) de colônias mantidas pelo serviço especial de saúde de Araraquara, inferida de seqüências do 16S rDNA mitocondrial. *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(3): 455-462.
- Jurberg J., Carcavallo R.U., & Lent H., 2001 - *Panstrongylus sherlocki* sp. n. do estado da Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, 8: 261-274.

- Jurberg, J., & Galvão, C., 2006. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. *Denisia*, 19: 1095- 1116
- Justi S.A., Russo C.A., Mallet J.R., Obara M.T., & Galvão C., 2014 - Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & Vectors*, 7: 149-3305-7-149.
- Khatchikian C.E., Foley E.A., Barbu C.M., Hwang J., Ancca-Juárez J., Borrini-Mayori K., Quispe-Machaca V. R., Naquira C., Brisson D., & Levy M.Z., 2015 - Population structure of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in an urban environment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2): e0003425.
- Kimura M., 1968 - Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217(5129): 624-626.
- Kimura, M., 1983 - *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press (Eds.), (New York, USA), 369 pp.
- Kjos S., Snowden K., Craig T., Lewis B., Ronald N., & Olson J., 2008 - Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. *Veterinary Parasitology*, 152(3): 249-256.
- Kreitman M., 2000 - Methods to detect selection in populations with applications to the human. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1(1): 539-559.
- Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M., Senfeld T., & Calcott B., 2016 - PartitionFinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3): 772-773.
- Lent H., & Wygodzinsky P., 1979 - Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 163(3): 123-520.
- Lent H., Jurberg J., Galvão C., & Carcavallo R., 1994 - *Triatoma melanosoma*, novo status para *Triatoma infestans melanosoma* Martinez, Olmedo & Carcavallo, 1987 (Hemiptera: Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89(3): 353-358.
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., LOM III. J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page .F.C., Poljansky G., Spague V., Vavra J., & Wallace F.G., 1980 - A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27(1): 37-58.

- Levy M.Z., Bowman N.M., Kawai V., Waller L.A., Cornejo del Carpio J.G., Cordova Benzaquen E., Gilman R. H., & Bern C., 2006 - Periurban *Trypanosoma cruzi*-infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, 12(9): 1345-1352.
- Li H., Gao J., Liu H., Liang A., Zhou X., & Cai W., 2011 - The architecture and complete sequence of mitochondrial genome of an assassin bug *Agriosphodrus dohrni* (Hemiptera: Reduviidae). *International Journal of Biological Sciences*, 7(6): 792-804.
- Librado P., & Rozas J., 2009 - DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.
- Lin C., & Danforth B.N., 2004 - How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(3): 686-702.
- Liu H., & Beckenbach A.T., 1992 - Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(1): 41-52.
- Lumbreras Cruz H., 1952 - Epidemiology of Chagas disease during the urbanization of Miraflores de Arequipa. *Archivos Patologia*, 6: 191-200.
- Lyman D.F., Monteiro F.A., Escalante A.A., Cordon-Rosales C., Wesson D.M., Dujardin J.P., & Beard C.B., 1999 - Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(3): 377-386.
- Madden T.L., Tatusov R.L., & Zhang J., 1996 - Applications of network BLAST server. *Methods in Enzymology*, 266: 131-141.
- Maia Da Silva F., Junqueira A.C.V., Campaner M., Rodrigues A.C., Crisante G., Ramirez L.E., Caballero Z.C.E., Monteiro F.A., Coura J.R., & Añez N., 2007 - Comparative phylogeography of *Trypanosoma rangeli* and *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae) supports a long coexistence of parasite lineages and their sympatric vectors. *Molecular Ecology*, 16(16): 3361-3373.
- Marcet P., Lehmann T., Groner G., Gürtler R., Kitron U., & Dotson E., 2006 - Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 6(1): 32-37.
- Marcet P., Mora M., Cutrera A., Jones L., Gürtler R., Kitron U., & Dotson E., 2008 - Genetic structure of *Triatoma infestans* populations in rural communities of

- Santiago del Estero, northern Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(6): 835-846.
- Marcilla A., Canese A., Acosta N., Lopez E., Rojas de Arias A., Bargues M.D., & Mas-Coma S., 2000 - Populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Paraguay: A molecular analysis based on the second internal transcribed spacer of the rDNA. *Research and Reviews in Parasitology*, 60(3/4): 99-105.
- Marcilla A., Bargues M.D., Ramsey J.M., Magallon-Gastelum E., Salazar-Schettino P.M., Abad-Franch F., Dujardin J.P., Schofield C.J., & Mas-Coma S., 2001 - The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(1): 136-142.
- Marcilla A., Bargues M.D., Abad-Franch F., Panzera F., Carcavallo R., Noireau F., Galvão C., Jurberg J., Miles M., & Dujardin J.P., 2002 - Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infection, Genetics and Evolution*, 1(3): 225-235.
- Marin-Neto J.A., Rassi Jr.A., Avezum Jr.A., Mattos A.C., & Rassi A., 2009 - The BENEFIT trial: Testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 319-324.
- Martínez F., Alejandre-Aguilar R., Moncada Y.H., & Espinoza B., 2005 - Molecular taxonomic study of Chagas disease vectors from the *Phyllosoma*, *Lecticularia*, and *Rubrofasciata* complexes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(2): 321-325.
- Martínez F.H., Villalobos G.C., Cevallos A.M., De la Torre P., Lacleste J. P., Alejandre-Aguilar R., & Espinoza B., 2006 - Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: Using ITS-2 and mtCytB sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(2): 279-287.
- Martínez-Ibarra J.A., Salazar-Schettino P.M., Noguera-Torres B., Vences M.O., Tapia-González J.M., & Espinoza-Gutiérrez B., 2009 - Occurrence of hybrids and laboratory evidence of fertility among three species of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera: Reduviidae) in Mexico. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(8): 1125-1131.

- Mas-Coma S., & Bargues M.D., 2009 - Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica*, 110(2): 112-136.
- Mesquita R.D., Vionette-Amaral R.J., Lowenberger C., Rivera-Pomar R., Monteiro F.A., Minx P., Spieth J., Carvalho A.B., Panzera F., Lawson D., Torres A.Q., Ribeiro J.M., Sorgine M.H., Waterhouse R.M., Montague M.J., Abad-Franch F., Alves-Bezerra M., Amaral L.R., Araujo H.M., Araujo R.N., Aravind L., Atella G.C., Azambuja P., Berni M., Bittencourt-Cunha P.R., Braz G.R., Calderon-Fernandez G., Carareto C.M., Christensen M.B., Costa I.R., Costa S.G., Dansa M., Dumas-Filho C.R., De-Paula I.F., Dias F.A., Dimopoulos G., Emrich S.J., Esponda-Behrens N., Fampa P., Fernandez-Medina R.D., da Fonseca R.N., Fontenele M., Fronick C., Fulton L.A., Gandara A.C., Garcia E.S., Genta F.A., Giraldo-Calderon G.I., Gomes B., Gondim K.C., Granzotto A., Guarneri A.A., Guigo R., Harry M., Hughes D.S., Jablonka W., Jacquin-Joly E., Juarez M.P., Koerich L.B., Lange A.B., Latorre-Estivalis J.M., Lavore A., Lawrence G.G., Lazoski C., Lazzari C.R., Lopes R.R., Lorenzo M.G., Lugon M.D., Majerowicz D., Marcet P.L., Mariotti M., Masuda H., Megy K., Melo A.C., Missirlis F., Mota T., Noriega F.G., Nouzova M., Nunes R.D., Oliveira R.L., Oliveira-Silveira G., Ons S., Orchard I., Pagola L., Paiva-Silva G.O., Pascual A., Pavan M.G., Pedrini N., Peixoto A.A., Pereira M.H., Pike A., Polycarpo C., Prosdocimi F., Ribeiro-Rodrigues R., Robertson H. M., Salerno A.P., Salmon D., Santessmasses D., Schama R., Seabra-Junior E.S., Silva-Cardoso L., Silva-Neto M.A., Souza-Gomes M., Sterkel M., Taracena M.L., Tojo M., Tu Z.J., Tubio J.M., Ursic-Bedoya R., Venancio T.M., Walter-Nuno A.B., Wilson D., Warren W.C., Wilson R.K., Huebner E., Dotson E.M., & Oliveira P.L., 2015 - Genome of *Rhodnius prolixus*, an insect vector of Chagas disease, reveals unique adaptations to hematophagy and parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(48): 14936-14941.
- Miles M.A., Feliciangeli M.D., & de Arias A.R., 2003 - American Trypanosomiasis (Chaga's disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Medical Journal*, 326(7404): 1444.
- Molina I., Salvador F., & Sanchez-Montalva A., 2015 - The use of posaconazole against Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(5): 397-407.
- Monteiro F.A., Pérez R., Panzera F., Dujardin J.P., Galvão C., Rocha D., Noireau F., Schofield C.J., & Beard C.B., 1999 - Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 229-238.

- Monteiro F.A., 2000 - Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(4): 460-465.
- Monteiro F.A., Escalante A.A., & Beard C.B., 2001 - Molecular tools and triatomine systematics: A public health perspective. *Trends in Parasitology*, 17(7): 344-347.
- Monteiro F.A., & Pierce N.E., 2001 - Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1 $\alpha$  gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2): 264-281.
- Monteiro F.A., Barrett T.V., Fitzpatrick S., Cordon-Rosales C., Feliciangeli D., & Beard C.B., 2003 - Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology*, 12(4): 997-1006.
- Monteiro F.A., Donnelly M.J., Beard C.B., & Costa J., 2004 - Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in northeast Brazil. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(1): 46-56.
- Morgan J., & Blair D., 1995 - Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: An aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group. *Parasitology*, 111(05): 609-615.
- Morgan J., & Blair D., 1998 - Mitochondrial ND1 gene sequences used to identify echinostome isolates from Australia and New Zealand. *International Journal for Parasitology*, 28(3): 493-502.
- Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agarwala R., & Schaffer A.A., 2008 - Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24(16): 1757-1764.
- Moriyama E.N., & Powell J.R., 1997 - Synonymous substitution rates in *Drosophila*: Mitochondrial versus nuclear genes. *Journal of Molecular Evolution*, 45(4): 378-391.
- Mosquera K.D., Villacis A.G., & Grijalva M.J., 2016 - Life cycle, feeding, and defecation patterns of *Panstrongylus chinai* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 53(4): 776-781.
- Murcia L., Carrilero B., Muñoz M.J., Iborra M.A., & Segovia M., 2010 - Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: A prospective study in a non-disease-endemic country. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8): 1759-1764.

- Musters W., Boon K., Van der Sande C.A., van Heerikhuizen H., & Planta R.J., 1990 - Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *The EMBO Journal*, 9(12): 3989-3996.
- Nagarkatti R., Bist V., Sun S., de Araujo F. F., Nakhasi H.L., & Debrabant A., 2012 - Development of an aptamer-based concentration method for the detection of *Trypanosoma cruzi* in blood. *PLoS One*, 7(8): e43533.
- Náquira C., 2014 - Urbanization of Chagas disease in Peru: Experiences in prevention and control. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(2): 343-347.
- Navajas M., Gutierrez J., Lagnel J., & Boursot P., 1996 - Mitochondrial cytochrome oxidase I in tetranychid mites: A comparison between molecular phylogeny and changes of morphological and life history traits. *Bulletin of Entomological Research*, 86(4): 407-418.
- Nei, M., 1987 - *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press (Eds.), (New York, USA), 290 pp.
- Nei, M., & Kumar, S., 2000 - *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press (Eds.), (New York, USA), 333 pp.
- Noireau F., Flores R., Gutierrez T., Bermudez H., García L., & Dujardin J.P., 1999 - La realidad de los focos selváticos de *Triatoma infestans* en Bolivia. In: *La enfermedad de Chagas en Bolivia: Conocimientos científicos al inicio del programa de control (1998-2002)*. Organización Panamericana de la Salud, J.A. Cassab, F. Noireau & G. Guillén (Eds.), (La Paz, Bolivia), pp. 151-155.
- Noireau F., Cortez M.G.R., Monteiro F.A., Jansen A.M., & Torrico F., 2005 - Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends in Parasitology*, 21(1): 7-10.
- Oliveira J., Marcet P.L., Takiya D.M., Mendonca V.J., Belintan T., BARGUES M.D., Mateo L., Chagas V., Folly-Ramos E., Cordeiro-Estrela P., Gurgel-Goncalves R., Costa J., Rosa J.A., & Almeida C.E., 2017 - Combined phylogenetic and morphometric information to delimit and unify the *Triatoma brasiliensis* species complex and the Brasiliensis subcomplex. *Acta Tropica*, 170: 140-178.
- OMS, 2017 – La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>. (Marzo, 2017).
- OPS, 2006 - *Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas*. Organización Panamericana de la Salud (Eds.), (Montevideo, Uruguay), 28 pp.

- OPS, 2012 – Uruguay es el 1º país de América Latina libre del insecto que transmite el mal de Chagas. En:  
[http://www.paho.org/uru/index.php?option=com\\_content&view=article&id=525:uruguay-1o-pais-america-latina-libre-insecto-que-transmite-mal-chagas-&Itemid=340](http://www.paho.org/uru/index.php?option=com_content&view=article&id=525:uruguay-1o-pais-america-latina-libre-insecto-que-transmite-mal-chagas-&Itemid=340). (Mayo, 2012).
- OPS, 2017 – *Enfermedad de Chagas en las Américas para los trabajadores de Salud Pública. Hojas informativas, 2017* – Organización Panamericana de la salud, Organización Mundial de la Salud (Eds.), 1 pp.
- OPS & F.M.S, 2007 - *La enfermedad de Chagas. A la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral*. Organización Panamericana de la Salud, Fundación Mundo Sano (Eds.), (Buenos Aires, Argentina), 267 pp.
- Pacheco R.S., Almeida C.E., Costa J., Klisiowicz D.R., Mas-Coma S., & Bargues M.D., 2003 - RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 97(7): 757-768.
- Pacheco R., Almeida C., Klisiowicz D., Costa J., Pires M., Panzera F., Bar M., Mas-Coma S., & Bargues M.D., 2007 - Genetic variability of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae) from Brazil, Argentina and Uruguay as revealed by two different molecular markers. *Parasite*, 14(3): 231-237.
- Panzera F., Dujardin J.P., Nicolini P., Caraccio M.N., Rose V., Tellez T., Bermúdez H., Bargues M.D., Mas-Coma S., & O'Connor J.E., 2004 - Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerging Infectious Diseases*, 10(3): 438-446.
- Panzera F., Pérez R., Lucero C., Ferrandis I., Ferreiro M., Calleros L., & Romero V., 2007 - Cambios genómicos en la subfamilia Triatominae, con énfasis en *Triatoma infestans*. In: *Triatominos de Bolivia y la Enfermedad De Chagas*. Ministerio De Salud y Deportes de Bolivia - Programa Nacional de Chagas, M. Rojas (Eds.), (La Paz, Bolivia), pp. 149-172.
- Patterson J.S., Barbosa S.E., & Feliciangeli M.D., 2009 - On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta Tropica*, 110(2–3): 187-199.
- Patterson J.S., & Gaunt M.W., 2010 - Phylogenetic multi-locus codon models and molecular clocks reveal the monophyly of haematophagous reduviid bugs and their evolution at the formation of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(2): 608-621.

- Pavan M., & Monteiro F., 2007 - A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Tropical Medicine & International Health*, 12(6): 751-758.
- Pease G., 1992 - *Perú: Hombre e historia: Entre el siglo XVI y el XVIII*. Edubanco (Eds.) (Lima, Perú), 347 pp.
- Pfeiler E., Bitler B., Ramsey J., Palacios-Cardiel C., & Markow T., 2006 - Genetic variation, population structure, and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *T. recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran desert, insect vectors of the Chagas' disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41(1): 209-221.
- Piccinali R.V., Marcet P.L., Noireau F., Kitron U., Gurtler R.E., & Dotson E.M., 2009 - Molecular population genetics and phylogeography of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in South America. *Journal of Medical Entomology*, 46(4): 796-809.
- Piccinali R.V., Canale D.M., Sandoval A.E., Cardinal M.V., Jensen O., Kitron U., & Gurtler R.E., 2010 - *Triatoma infestans* bugs in southern Patagonia, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 16(5): 887-889.
- Piccinali R.V., Marcet P.L., Ceballos L.A., Kitron U., Gurtler R.E., & Dotson E.M., 2011 - Genetic variability, phylogenetic relationships and gene flow in *Triatoma infestans* dark morphs from the Argentinean Chaco. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5): 895-903.
- Piccinali R.V., & Gurtler R.E., 2015 - Fine-scale genetic structure of *Triatoma infestans* in the Argentine Chaco. *Infection, Genetics and Evolution*, 34: 143-152.
- Pinazo M.J., Thomas M.C., Bustamante J., De Almeida I.C., Lopez M.C., & Gascon J., 2015 - Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: State of the art and future perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3): 422-432.
- Pollack V., Ampuero C., Roldan J., Vargas V., & Cuba Cuba C., 2001 - Morphometric and artificial ecotopes of *Panstrongylus chinai* (Hemiptera, Reduviidae) in northern Peru. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 37: 188.
- Ponce C., 2007 - Current situation of Chagas disease in Central America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 41-44.
- Posada D., & Crandall K.A., 2001 - Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology*, 50(4): 580-601.

- Posada D., 2003 - Selecting models of evolution. In: *The Phylogenetic Handbook. A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press, M. Salemi, A.M. Vandamme (Eds.), (Cambridge, United Kingdom), pp. 256-282.
- Posada D., & Buckley T., 2004 - Advantages of AIC and bayesian approaches over likelihood ratio tests for model selection in phylogenetics. *Systematic Biology*, 53: 793-808.
- Quisberth S., Waleckx E., Monje M., Chang B., Noireau F., & Brenière S.F., 2011 – “Andean” and “non-Andean” ITS-2 and mtCytB haplotypes of *Triatoma infestans* are observed in the Gran Chaco (Bolivia): Population genetics and the origin of reinfestation. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5): 1006-1014.
- Rabinovich J.E., & Feliciangeli M.D., 2015 - Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions: IV. *Panstrongylus geniculatus*. *Journal of Medical Entomology*, 52(5): 797-805.
- Ramos-Onsins S.E., & Rozas J., 2002 - Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12): 2092-2100.
- Ramsey J.M., & Schofield C.J., 2003 - Control de vectores de la enfermedad de Chagas. *Salud Pública de México*, 45(2): 123-128.
- Rassi A., & Marin-Neto J.A., 2010 - Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723): 1388-1402.
- Reithinger R., Tarleton R.L., Urbina J.A., Kitron U., & Gurtler R.E., 2009 - Eliminating Chagas disease: Challenges and a roadmap. *British Medical Journal*, 338: b1283.
- RENACE, 2017 - *Boletín epidemiológico del Perú*. Red Nacional de Epidemiología Prevención y Control de Enfermedades, Ministerio de Salud de Perú, Centro Nacional de Epidemiología Prevención y Control de Enfermedades (Eds.), (Lima, Perú), 533 – 568 pp.
- Ribeiro Jr.G., Gurgel-Gonçalves R., Barbosa R., Silva C.G., Amorim A., Gumes S., & Reis M.G., 2015 - Frequent house invasion of *Trypanosoma cruzi* - Infected triatomines in a suburban area of Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(4): e0003678.
- Riera C., Verges M., Iniesta L., Fisa R., Gallego M., Tebar S., & Portus M., 2012 - Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3): 412-416.

- Rogers A.R., & Harpending H., 1992 - Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3): 552-569.
- Rojas-Cortez M., Pinazo M., Garcia L., Arteaga M., Uriona L., Gamboa S., Mejía C., Lozano D., Gascon J., & Torrico F., 2016 - *Trypanosoma cruzi* - infected *Panstrongylus geniculatus* and *Rhodnius robustus* adults invade households in the tropics of Cochabamba region of Bolivia. *Parasites & Vectors*, 9(1): 158.
- Rolon M., Vega M.C., Roman F., Gomez A., & Rojas de Arias A., 2011 - First report of colonies of sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, using a trained dog. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(5): e1026.
- Ronquist F., Van der Mark P., & Huelsenbeck J.P., 2009 - Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. *The Phylogenetic Handbook*. Lemey P., Salemi M., Vandamme A.M., (Eds.), (New York, USA), pp. 210-266.
- Ruiz Guzmán J., 2007 - Historia de la enfermedad de Chagas. *Gaceta Médica Boliviana*, 30(2): 70-73.
- Sainz A.C., Mauro L.V., Moriyama E.N., & García B.A., 2004 - Phylogeny of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* suggested by mitochondrial DNA sequences. *Genetica*, 121(3): 229-240.
- Salvatella R., 2007 - Andean subregional Chagas disease area and the Andean initiative of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 39-40.
- Schachter-broide J., Dujardin J.P., Kitron U., & Gürtler R.E., 2004 - Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *Journal of Medical Entomology*, 41(4): 643-649.
- Schmunis G.A., 2007 - Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: The role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 75-86.
- Schofield C.J., & Dias J., 1999 - The southern cone initiative against Chagas disease. *Advances in Parasitology*, 42: 1-27.
- Schofield C.J., Diotaiuti L., & Dujardin J.P., 1999 - The process of domestication in Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 375-378.
- Schofield C. J., & Galvão C., 2009 - Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110(2-3): 88-100.

- Segura E., Torres A., Fusco O., & García B., 2009 - Mitochondrial 16S DNA variation in populations of *Triatoma infestans* from Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(1): 34-40.
- Sempertegui-Sosa C., 2012 - *Phylogenetic and Phylogeographic Studies of Panstrongylus Sp., Vectors of Chagas Disease in Loja and Manabí Provinces*. Tesis doctoral, Dirs. M. Grijalva & H. Dewald, Ohio University, (Athens, OH, USA), 172 pp.
- Silveira, A.C., 2002 - *El control de la enfermedad de Chagas en los países del cono sur de américa: Historia de una iniciativa internacional 1991/2001*. Facultad de Medicina do Triangulo Mineiro (Eds.), (Uberaba, Brasil), 316 pp.
- Simon C., Buckley T.R., Frati F., Stewart J.B., & Beckenbach A.T., 2006 - Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37: 545-579.
- Solis H.M., Ferreira C.S., & De Carvalho M.E., 1997 - Human infection with *Trypanosoma cruzi* in Nasca, Peru: A seroepidemiological survey. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39: 107-112.
- Sosa-Estani S., & Segura E.L., 2015 - Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3): 289-298.
- Souza W., 2002 - Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4): 269-285.
- Stamatakis A., 2014 - RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9): 1312-1313.
- States D.J., & Gish W., 1994 - Combined use of sequence similarity and codon bias for coding region identification. *Journal of Computational Biology*, 1(1): 39-50.
- Stevens J.R., Brisse S., Maudlin I., Holmes P., & Miles M., 2004 - Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance. In: *The Trypanosomiases*. Maudlin I., Holmes P.H., Miles M.A., (Eds.), (Wallingford, United Kingdom), pp. 1-23.
- Stothard J.R., Yamamoto Y., Cherchi A., Garcia A.L., Valente S.S.A., Schofield C.J., & Miles M.A., 1998 - A preliminary survey of mitochondrial sequence variation within Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae) using single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bulletin of Entomological Research*, 88 (5): 553-560.

- Swofford D.L., Olsen G.J., Waddell P.J., & Hillis D.M., 1996 - Phylogenetic inference. *Molecular systematics* (2<sup>nd</sup> ed.). Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K., (Eds.), (Sunderland, MA, USA), pp. 407-514.
- Tajima F., 1983 - Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2): 437-460.
- Tajima F., 1989 - Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585-595.
- Tajima F., 1996 - The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, 143(3): 1457-1465.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., & Kumar S., 2013 - MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.
- Tavaré S., 1986 - Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17(2): 57-86.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., & Higgins, D.G., 2002 - Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. In: *Current protocols in bioinformatics*. J. Wiley & Sons (Eds.), (New York, USA), Chapter 2: Unit 2.3.
- Torrealva F., & Torrealva F., 1945 - Algunas observaciones sobre el *Triatoma infestans* en la ciudad de Ica. *Revista San. Policía de Lima*, 29: 227-234.
- Torres V., Beatriz D., & Cabrera R., 2010 - Geographical distribution and intradomestic capture of sylvatic triatomines in La Convención province, Cusco, Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(3): 157-160.
- Torres-Perez F., Acuna-Retamar M., Cook J.A., Bacigalupo A., García A., & Cattán P.E., 2011 - Statistical phylogeography of Chagas disease vector *Triatoma infestans*: Testing biogeographic hypotheses of dispersal. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(1): 167-174.
- Torrío R.A., 1946 - Hallazgo de *Eratyrus mucronatus*, infestación natural de "vinchucas" de Cerro y *Eutriatoma sordida* en Cochabamba. *Anales del Laboratorio Central de Cochabamba*, 1: 19-23.
- Torrío R.A., 1950 - Conocimientos actuales sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Bolivia. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 29: 827-840
- Usinger R.L., Wygodzinsky P., & Ryckman R.E., 1966 - The biosystematics of Triatominae. *Annual Review of Entomology*, 11(1): 309-330.

- Van der Sande C.A.F.M., Kwa M., Van Nues R.W., Van Heerikhuizen H., Raué H.A., & Planta R.J., 1992 - Functional analysis of internal transcribed spacer 2 of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal DNA. *Journal of Molecular Biology*, 223(4): 899-910.
- Vázquez-Domínguez E., Castañeda-Rico S., Garrido-Garduño T., & Gutiérrez-García T.A., 2009 - Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82(2): 277-297.
- Vendrami D.P., Junior W.C., & Marrelli M.T., 2014 - Analysis of mitochondrial cytochrome B oxidase gene suggests passive dispersal of the *Panstrongylus megistus* population in Brazil. *Journal of Vector Ecology*, 39(2): 441-444.
- Walecx E., Salas R., Huaman N., Buitrago R., Bosseno M.F., Aliaga C., Barnabe C., Rodriguez R., Zoveda F., Monje M., Baune M., Quisberth S., Villena E., Kengne P., Noireau F., & Breniere S.F., 2011 - New insights on the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) brought by the genetic analysis of bolivian sylvatic populations. *Infection, Genetics and Evolution* 11(5): 1045-1057.
- Walecx E., Gourbière S., & Dumonteil E., 2015 - Intrusive versus domiciliated triatomines and the challenge of adapting vector control practices against Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110: 324-338.
- Watterson G., 1975 - On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7(2): 256-276.
- Weir B.S., & Cockerham C.C., 1984 - Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Weir B.S. & Cockerham C.C., 1996 - *Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data*. Sinauer associated Inc. (Eds.), (Sunderland, MA, USA), 1990 pp.
- Weirauch C., & Munro J.B., 2009 - Molecular phylogeny of the assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), based on mitochondrial and nuclear ribosomal genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(1): 287-299.
- Wheeler W.C., & Honeycutt R.L., 1988 - Paired sequence difference in ribosomal RNAs: Evolutionary and phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*, 5(1): 90-96.
- Wolff M., & Castillo D., 2002 - Domiciliation trend of *Panstrongylus rufotuberculatus* in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(3): 297-300.

- Wolff M., Cuartas E., Velasquez C., & Jaramillo N., 2004 - Development cycle of *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 41(6): 1010-1014.
- Zeledón R., Ugalde J.A., & Paniagua L.A., 2001 - Entomological and ecological aspects of six sylvatic species of triatomines (Hemiptera, Reduviidae) from the collection of the National Biodiversity Institute of Costa Rica, Central America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(6): 757-764.
- Zhang J., & Madden T.L., 1997 - PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Research*, 7(6): 649-656.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., & Miller W., 2000 - A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2): 203-214.
- Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R.S., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles M.A., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M., & Schijman A.G., 2009 - A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7): 1051-1054.
- Zingales B., Miles M.A., Campbell D.A., Tibayrenc M., Macedo A.M., Teixeira M.M., Schijman A.G., Llewellyn M.S., Lages-Silva E., & Machado C.R., 2012 - The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2): 240-253.
- Zuriaga M.Á., Blandón-Naranjo M., Valerio-Campos I., Salas R., Zeledón R., & Bargues M.D., 2012 - Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* and infection rate of the vector *Triatoma dimidiata* in Costa Rica. *Parasitology Research*, 111(4): 1615-1620.
- Zuriaga M.Á., Mas-Coma S. & Bargues M.D., 2015. A nuclear ribosomal DNA pseudogene in triatomines opens a new research field of fundamental and applied implications in Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110 (3): 353-262.



