



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS



**Estructura poblacional de
Triatoma infestans (Hemiptera:
Reduviidae) en comunidades bajo
control vectorial de la región del
Chaco Boreal, Bolivia**



Instituto Nacional de
Laboratorios de Salud
Laboratorio Entomología
Médica

Elaborado por:

Sergio Rodrigo Quisberth Barrera

Asesores:

Etienne Waleckx PhD.

Simone Frédérique Brenière PhD.



**La Paz – Bolivia
2010**



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS



**Estructura poblacional de
Triatoma infestans (Hemiptera:
Reduviidae) en comunidades bajo
control vectorial de la región del
Chaco Boreal, Bolivia**



Instituto Nacional de
Laboratorios de Salud
Laboratorio Entomología
Médica

Elaborado por:

Sergio Rodrigo Quisberth Barrera



**Tesis para optar al grado de Magister Scientiarum
en Ciencias Biológicas y Biomédicas**

**La Paz – Bolivia
2010**

Dedicado a:

A mi madre María Elena Barrera, sin su apoyo esto no hubiese sido posible.

A mis asesores, ya que sin sus exigencias constantes y llamadas de atención oportunas, posiblemente esta tesis no hubiese sido concluida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida y salud y guiar todos los pasos que doy en este mundo y por todos darme todos los amigos que tengo.

A mi madre, sin su sacrificio y gran apoyo no habría culminado esta nueva etapa de estudio en mi vida.

A mis hermanos y mi padre por su constante apoyo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Al Instituto Nacional de laboratorios en Salud INLASA, y al personal del Laboratorio de Entomología Médica, encabezado por la Dra. Tamara Chávez, por la gran acogida que tuvieron hacia mi persona.

Al Institut de Recherche pour le Développement IRD, por apoyar a el desarrollo de este tipo de investigaciones en nuestro medio a través de becas.

Al Equipo del Dr. François Noireau por proporcionarme los triatominos empleados en esta investigación, y al Dr. Noireau por todo su apoyo a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A mis asesores la Dra. Simone Frédérique Brenière PhD. y el Dr. Etienne Waleckx PhD. por toda la paciencia y el apoyo desinteresado que tuvieron a lo largo de mi formación durante la Maestría, mi gratitud y deuda eterna, siempre los llevare en mi corazón.

A la Lic. Renata Salas Bacci por guiarme y apoyarme junto con Etienne durante todo el desarrollo de la parte experimental de la Tesis.

A mis compañeros de trabajo Marie France Bosseno, Rocío Buitrago y Claudia Aliaga con quienes compartí muchas experiencias que las atesorare por siempre.

Al Dr. Dagoberto Cáceres, quien siempre estuvo a mi lado para apoyarme y guiarme desde el inicio de la carrera hasta hoy, muchas gracias querido amigo.

A mis revisores internacionales: Dr. Francisco Panzera, Dr. David Gorla y Dr. Pierre Kengne por su valiosa colaboración en el análisis del Texto de la Tesis.

A mis docentes del Máster Dra. Volga Iñiguez y Dra. Ximena Aguilar por brindarme su amistad y apoyo durante la Maestría.

A mis compañeros del Máster Bladimir Colquillo, Rafael, Oscar, Magda, Vladimir Ajllahuanca, Álvaro, Neida, Irma y Boris, con quienes compartimos el estrés y las dificultades a lo largo del desarrollo de la Maestría.

A mis grandes amigas Magui, Eva, Sonia, Yuly, Patricia, Janet, María Esther; a la Flia. Vega Alarcón, Dr. Lavayen, Dr. Varela y a todas aquellas personas que siempre me dieron el aliento para continuar durante el curso de selección del Máster y me dieron apoyo moral durante el desarrollo de la Tesis.

Agradecimiento Especial al Equipo del IRD La Paz-Bolivia



De izquierda a derecha en la fila del fondo: Cristian Barnabé, Marie France Bosseno, Frédérique Brenière y Etienne Waleckx.

De izquierda a derecha en la fila de adelante: Claudia Aliaga, Rocío Buitrago, Sergio Quisberth y Renata Salas.

Agradecido con el equipo del IRD La Paz, por transmitirme sus conocimientos y apoyarme durante el desarrollo de la tesis y durante la defensa de la misma.

Gracias los llevare siempre en mi corazón...

Sergio Rodrigo Quisberth Barrera

TABLA DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN-----	14
II.	OBJETIVOS -----	17
1.	OBJETIVO GENERAL-----	17
2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS-----	17
III.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA-----	18
1.	LA ENFERMEDAD DE CHAGAS-----	18
1.1.	Generalidades-----	18
1.2.	Modos de transmisión de la enfermedad-----	18
1.3.	Manifestaciones clínicas-----	19
1.4.	Tratamiento-----	19
2.	EL AGENTE PATOGENO-----	20
2.1.	Características-----	20
2.2.	Ciclo de vida-----	20
2.3.	Inmunopatología-----	21
3.	EL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS-----	22
3.1.	Generalidades y distribución geográfica-----	22
3.2.	Ciclo de vida-----	23
3.3.	Lucha antivectorial-----	24
4.	MÉTODOS DE ANÁLISIS GENÉTICO DE LAS POBLACIONES DE TRIATOMINOS-----	24
4.1.	Análisis de la estructura de poblaciones a través de secuencias de ADN-----	24
4.1.1.	Los análisis por F-estadísticos (F-stats)-----	25
4.1.2.	Distancias Genéticas-----	25
4.1.3.	Métodos de Reconstrucción-----	26
4.1.4.	Análisis de Remuestreos (Bootstrap)-----	26
4.2.	Marcadores genéticos empleados en el estudio-----	27
4.2.1.	Secuencia interna ribosomal (ITS-2)-----	27
4.2.2.	Gen mitocondrial codificando para el Citocromo B (mtCytB)-----	28
5.	LO QUE SE CONOCE ACERCA DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE <i>Triatoma infestans</i> -----	29
5.1.	La morfometría-----	29
5.2.	La citogenética-----	30
5.3.	Los marcadores moleculares: secuencias de genes y polimorfismo de microsatélites-----	31
5.4.	Origen y dispersión de las poblaciones de <i>T. infestans</i> -----	33
5.5.	Origen de las poblaciones re-infestantes de <i>T. infestans</i> -----	34
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS-----	36
1.	ÁREA DE ESTUDIO-----	36
2.	PROCEDENCIA DE LAS POBLACIONES DE <i>T. infestans</i> -----	36
3.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN DE LOS TRIATOMINOS-----	39
4.	AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA SECUENCIA ESPACIADORA INTERNA ITS-2 Y DEL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO B mtCytB-----	40
5.	SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR-----	41
6.	ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS E IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS-----	41
7.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO-----	42
8.	ANÁLISIS DE GENÉTICA DE POBLACIONES-----	42
8.1.	Índices de variabilidad genética-----	42
8.2.	Pruebas de neutralidad-----	44
8.3.	Pruebas de diferenciación genética entre poblaciones-----	45
8.3.1.	Prueba de Fst-----	45
8.3.2.	Test exacto-----	46
8.3.3.	Análisis molecular de varianza (AMOVA)-----	46
V.	RESULTADOS-----	47
1.	IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS-----	47

1.1. Secuencias ITS-2	47
1.2. Secuencias mtCytB	49
2. VARIABILIDAD Y ESTRUCTURA GENETICA DE LAS DIFERENTES POBLACIONES	52
2.1. Poblaciones colectadas antes del primer rociado con insecticidas (Línea de Base, LB)	52
2.1.1. ITS-2	52
2.1.2. mtCytB	55
2.2. Poblaciones re-infestantes	59
2.2.1. ITS-2	59
2.2.2. mtCytB	60
2.3. Análisis AMOVA de la estructuración entre las poblaciones	62
VI. DISCUSIÓN	65
1. VARIABILIDAD DE ITS-2 EN <i>Triatoma infestans</i>	65
2. VARIABILIDAD DE mtCytB EN <i>Triatoma infestans</i>	68
3. ORIGENES DE REINFESTACION POR <i>Triatoma infestans</i>	69
VII. CONCLUSIONES	72
VIII. BIBLIOGRAFIA	73

TABLA DE CONTENIDO DE FIGURAS

		Pag.
Figura 1.	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> donde se observan los estadios de desarrollo en los 2 tipos de hospederos (Tomado de http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html).	21
Figura 2.	Mapa de la distribución geográfica de las principales especies de triatominos vectores de la enfermedad de Chagas (Tomado de http://www.miniatlas.com.ar/MA/?p=51).	23
Figura 3.	Esquema de las secuencias codificantes para las subunidades ribosomales, las cuales se encuentran separadas por los ITS-1 e ITS-2.	28
Figura 4.	Esquema de los puntos tomados para el análisis de morfometría en triatominos. Izq. Los 14 puntos tomados para la cabeza. Der. Los 9 puntos tomados para las alas.	29
Figura 5.	Mapa de la región de Izozog (Santa Cruz - Bolivia) indicando en rojo las comunidades incluidas en el estudio.	37
Figura 6.	Lugar de unión de los iniciadores empleados para la amplificación del ITS-2 de <i>T. infestans</i> mostrando un fragmento de 950 pb que incluye partes de los genes de las subunidades ribosomales 5,8S y 28S próximos al fragmento de interés.	47
Figura 7.	Alineamiento de las secuencias de los 3 haplotipos identificados para el ITS-2 de <i>T. infestans</i> capturados en la región de Izozog: se observan 2 sitios variables en los sitios nucleotídicos 54 y 350, además se observa una zona de inserción/delección (indel) de 1-2 repeticiones (AT) en una región microsatélite del ITS-2 (40-78 pb).	48
Figura 8.	Frecuencias de los 3 haplotipos ITS-2 de <i>T. infestans</i> identificados en la población total de la región de Izozog (102 secuencias).	48
Figura 9.	Alineamiento de las secuencias de los 8 haplotipos identificados para el gen mtCytB de <i>T. infestans</i> capturados en la región de Izozog: se observan las mutaciones en 15 sitios variables (cuadros).	50
Figura 10.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de ADN de los 8 haplotipos identificados para el marcador mtCytB en la región de Izozog, donde se observa el sitio de sustitución Thr → Met, el cual está marcado.	51
Figura 11.	Frecuencias de los 8 haplotipos mtCytB de <i>T. infestans</i> identificados en la población total de la región de Izozog (106 secuencias).	51
Figura 12.	Distribución de los 3 haplotipos encontrados en las poblaciones de línea de base, para el marcador ITS-2, en las 4 comunidades estudiadas en la región de Izozog.	53
Figura 13.	Distribución de los 8 haplotipos encontrados en las poblaciones de Línea de Base, para el mtCytB, en las 4 comunidades estudiadas en la región de Izozog.	56
Figura 14.	Comparación de la distribución de los 3 haplotipos encontrados, para el marcador ITS-2, en las poblaciones estudiadas de LB con sus re-infestantes correspondientes.	60
Figura 15.	Comparación de la distribución de los haplotipos encontrados, para el marcador mtCytB, en las poblaciones estudiadas de LB y de re-infestantes correspondientes.	61

TABLA DE CONTENIDO DE TABLAS

		Pag.
Tabla 1.	Triatominos capturados antes del rociado con insecticida (LB) en las 4 comunidades estudiadas (región de Izozog, Santa Cruz - Bolivia).	38
Tabla 2.	Triatominos capturados 4 meses después del primer rociado con insecticida (EPV1) en las 4 comunidades estudiadas (región de Izozog, Santa Cruz - Bolivia).	38
Tabla 3.	Triatominos capturados 8 meses después del primer rociado con insecticida (EPV2) en las 4 comunidades estudiadas (región de Izozog, Santa Cruz - Bolivia).	38
Tabla 4.	Número de triatominos seleccionados para el estudio en las 4 comunidades estudiadas (región de Izozog, Santa Cruz - Bolivia).	39
Tabla 5.	Sitios variables observados en un fragmento de 388 pb del gen mtCytB de <i>T. infestans</i> colectados en la región de Izozog.	50
Tabla 6.	Estimaciones de la variabilidad del ITS-2 y resultados de las pruebas de neutralidad para las poblaciones de línea de base y re-infestantes en la región de Izozog.	54
Tabla 7.	Diferenciaciones genéticas inter poblaciones obtenidas con el ITS-2, basadas sobre las diferencias nucleotídicas (π) entre pares de individuos y expresadas por el valor de F_{st}	55
Tabla 8.	Resultados de los test exactos de diferenciación inter poblaciones obtenidos con el ITS-2	55
Tabla 9.	Estimaciones de la variabilidad del mtCytB y resultados de las pruebas de neutralidad para las poblaciones de línea de base y re-infestantes en la región de Izozog.	57
Tabla 10.	Diferenciaciones genéticas inter poblaciones obtenidas con el mtCytB, basadas sobre las diferencias nucleotídicas (π) entre pares de individuos y expresadas por el valor de F_{st}	58
Tabla 11.	Resultados de los test exactos de diferenciación inter poblaciones obtenidos con el mtCytB	48
Tabla 12.	Estructura genética, basada sobre el ITS-2, de las poblaciones agrupadas en norte y sur por el análisis de la variancia molecular AMOVA.	63
Tabla 13.	Estructura genética, basada sobre el mtCytB, de las poblaciones agrupadas en norte y sur por el análisis de la variancia molecular AMOVA.	63
Tabla 14.	Estructura genética, basada sobre el ITS-2, de las poblaciones agrupadas en línea de base y re-infestantes por el análisis de la variancia molecular AMOVA.	64
Tabla 15.	Estructura genética, basada sobre el mtCytB, de las poblaciones agrupadas en línea de base y re-infestantes por el análisis de la variancia molecular AMOVA.	64

RESUMEN

Dada la importancia epidemiológica de la re-infestación de viviendas por *Triatoma infestans* después del rociado con insecticidas en la región del Izozog (Gran Chaco) en Bolivia, el presente estudio pretende dilucidar el origen de los individuos re-infestantes mediante el análisis genético de poblaciones domésticas de *T. infestans* colectadas antes y después del rociado en cuatro localidades de esta región. Los marcadores genéticos utilizados fueron la segunda región intergénica transcripta (ITS-2) del cluster ribosomal 45S nuclear y parte del gen mitocondrial del citocromo B (mtCytB). Fueron secuenciados 102 especímenes para el ITS-2 y 106 ejemplares para el mtCytB. El análisis de la estructura y la diversidad genética se realizó con los programas MEGA4, DnaSP 5 y Arlequin 3.1. Las diversidades nucleotídicas y haplotípicas para el ITS-2 fueron inferiores a las obtenidas para el mtCytB. Para los dos marcadores y en todas las poblaciones, las pruebas de neutralidad (Tajima, Fu) no fueron significativas indicando la ausencia de presión selectiva. Antes del rociado, el marcador ITS-2 no mostró diferenciaciones genéticas significativas (frecuencias haplotípicas y variación nucleotídica) entre las poblaciones, excepto entre las dos poblaciones más distantes (Tamachindi y Kuarirenda). Al contrario, el análisis del marcador mtCytB reveló diferenciaciones genéticas significativas entre todas las poblaciones, excepto entre las dos más cercanas (Rancho Nuevo y Tamachindi). Los análisis realizados entre las poblaciones antes y después del rociado demuestran claramente que la re-infestación ocurre a partir de poblaciones residuales de origen local (de cada pueblo) y que la diversidad genética se mantiene después del primer rociado con insecticidas (AMOVA y análisis de pares de poblaciones). Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de un proceso de resistencia al tratamiento insecticida de los triatominos en esta región.

ABSTRACT

Given the importance of re-infestation of human dwellings by *T. infestans* after insecticide spraying in the region of Izozog (Gran Chaco) in Bolivia, we analyzed the genetic structure and diversity of *T. infestans* populations collected before and after insecticide spraying of the dwellings in 4 villages in order to elucidate the origin of re-infestation. The genetic markers employed were the second Internal Transcribed Spacer (ITS-2) of 45S ribosomal cluster and part of mitochondrial Cytochrome B gene (mtCytB). 102 specimens of ITS-2 and 106 for mtCytB were sequenced for this purpose. The analyses of the genetic structure and diversity were carried out with MEGA4, DnaSP 5 and Arlequin 3.1 software's. As expected, nucleotide and haplotype diversities were lower for the ITS-2 than for mtCytB. For the two markers and within all the populations, the neutrality tests (Tajima, Fu) were not significant, indicating the absence of selective pressure. The ITS-2 marker revealed no significant genetic differentiation (haplotype frequencies and nucleotide variation) among populations, except between the two most distant populations (Tamachindi and Kuarirenda). On the contrary, the mtCytB marker analysis showed significant genetic differentiations between populations, except between the two closest (Rancho Nuevo and Tamachindi). The analyses performed between the RE and LB populations show clearly that the re-infestation occurs from residual populations of local origin (from each village) and that the genetic diversity is maintained after spraying (AMOVA and population pair analyses). The results show that populations might trigger a process of resistance.

I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis causada por un parásito protozoario llamado *Trypanosoma cruzi*, el cual es principalmente transmitido por medio de insectos hematófagos pertenecientes al orden Hemiptera y la familia Reduviidae. Se estima que en todo el mundo existen entre 16 a 18 millones de personas infectadas por este parásito (WHO 2008). Los triatomíneos hematófagos transmisores de *T. cruzi* pertenecen a la subfamilia Triatominae, destacándose por su importancia médica distintas especies pertenecientes a los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*.

El parásito *T. cruzi* presenta un ciclo biológico complejo, con alternancia entre un insecto vector y un hospedero vertebrado (distintas especies de mamíferos incluyendo al hombre) en el cual se puede desarrollar la enfermedad. El mal de Chagas presenta manifestaciones clínicas dependiendo de la fase de infección (WHO 2002). Se conoce la fase aguda de primo infección que es generalmente inadvertida, pero que en 1 al 2 % de los casos existen complicaciones clínicas leves o graves llevando incluso en algunos casos a la muerte (WHO 2002). Luego sigue una fase llamada indeterminada, asintomática, que se diagnostica por serología, y posteriormente se desarrolla en alrededor de 30% de los pacientes la fase crónica con patologías cardíacas y/o digestivas.

El vector doméstico de mayor importancia en los países del Cono Sur es *Triatoma infestans* el cual se encuentra ampliamente distribuido en Argentina, Bolivia, Paraguay, Perú, Brasil y Chile. En la actualidad uno de los mecanismos empleados para controlar esta enfermedad es la eliminación del vector por medio del uso de insecticidas como la Deltametrina® y otros insecticidas piretroides. Sin embargo, en algunas regiones, se han puesto de manifiesto problemas de re-infestación post-tratamiento del domicilio y peri domicilio (Cecere et al. 1996, 2004; Noireau et al. 2005). Estas re-infestaciones pueden tener diferentes orígenes: poblaciones locales residuales al tratamiento efectuado o poblaciones aledañas a la comunidad tratada procedentes del

medio silvestre o poblaciones domésticas originarias de otros pueblos mediante transporte pasivo por la gente (Dujardin et al. 1996; Cecere et al. 2002, 2004; Zu Dohna et al. 2007; Zu Dohna et al. 2009).

Diversos marcadores moleculares han sido desarrollados para el análisis genético de las poblaciones de triatominos entre los cuales se pueden citar: las isoenzimas (Dujardin et al. 1998; Brenière et al. 1998), el polimorfismo ADN de secuencias aleatoria RAPD (Dorn et al. 2003; Brenière et al. 2003; Pacheco et al. 2003), el polimorfismo de microsatélites (Dorn et al. 2004; García et al. 2004; Pizarro et al. 2008; Marcet et al. 2008), la secuenciación de genes mitocondriales como ser: Citocromo B, Citocromo C oxidasa, ARN 12S y 16S ribosomal (Lyman et al. 1999; Monteiro et al. 1999; Giordano et al. 2005; Segura et al. 2009) y partes no codificantes del ADN nuclear como los espaciadores internos ribosomales (ITS-1 e ITS-2) (Marcilla et al. 2001; Bagues et al. 2006). Estos marcadores fueron utilizados ampliamente para resolver relaciones filogenéticas entre especies, en el estudio de la estructura genética de varias especies de triatominos, para medir los flujos genéticos entre poblaciones, así como para fines epidemiológicos.

Bolivia forma parte de la iniciativa de los países del Cono Sur (INCOSUR) para la interrupción de la transmisión del Mal de Chagas, la cual tiene como objetivo principal la disminución de la infestación intra domiciliar por el vector *Triatoma infestans*. El ministerio de Salud y Deportes realiza el control por medio del método tradicional de rociamiento de las viviendas, sin embargo a pesar de un éxito indudable, las autoridades quedan en alerta debido a la persistencia del vector *T. infestans* en varias comunidades del país, las cuales se encuentran bajo vigilancia (<http://www.fmbolivia.com.bo/noticia10403-mal-de-chagas-afecta-a-seis-departamentos.html>).

En la región de Izozog (zona de estudio), se ha puesto de manifiesto la existencia de problemas importantes de re-infestación post-tratamiento en las comunidades, por poblaciones de *T. infestans* con posibles problemas de resistencia de los triatominos a los insecticidas en uso por los funcionarios del

Programa Nacional de Chagas (http://www.laprensa.com.bo/noticias/29-12-08/29_12_08_socd1.php). De hecho, la detección precisa del origen de la reinfestación es indispensable para orientar las futuras medidas de vigilancia en la región. En este contexto, la genética de poblaciones, mediante el uso de técnicas que realizan el análisis del polimorfismo de nucleótido en secuencias de genes, puede dar una información valiosa sobre el origen de la reinfestación examinando poblaciones antes y después del rociado.

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Con la finalidad de determinar los orígenes de los individuos re-infestantes, establecer (o determinar) las relaciones genéticas entre poblaciones de *T. infestans* capturadas en las comunidades de Tamachindi, Rancho Nuevo, Kuarirenda y San Silvestre (región de Izozog) antes y después de los rociados con insecticidas.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ☞ Analizar las secuencias del espaciador ribosomal interno (ITS-2) y del gen mitocondrial Citocromo B (mtCytB) de las poblaciones de *T. infestans* capturadas en las comunidades de Tamachindi, Rancho Nuevo, Kuarirenda y San Silvestre, antes y después del rociado.

- ☞ Determinar la variabilidad nucleotídica y haplotípica de las diferentes poblaciones así como su distribución en el espacio.

- ☞ Comparar la estructura genética de las poblaciones antes y después del rociado e interpretarlos en términos de poder deducir el origen de los re-infestantes.

III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.1. Generalidades

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, descubierta por el Dr. Carlos Chagas hace un siglo atrás en 1909, se debe a una infección por el parásito *T. cruzi*. Se calcula que en todo el mundo hay entre 16 y 18 millones de personas infectadas por el parásito, de las cuales cada año mueren 50.000 (WHO 2008). Hoy se estima que persiste la transmisión vectorial de esta enfermedad en la mayoría de los países de Latino América, a pesar de los programas de control vectorial y el rociado de insecticidas en las viviendas (WHO 2008). Además, en Europa y los Estados Unidos de América, el número de casos detectados ha aumentado debido a las migraciones, y este aumento plantea riesgos de transmisión a través de las transfusiones de sangre (Guzmán et al. 1998; Moraes 1999; Beltrán y Ayala 2003) y los trasplantes de órganos en estos continentes (Ferraz y Figueiredo 1993; Del Barco et al. 1998).

1.2. Modos de transmisión de la enfermedad

La enfermedad de Chagas es transmitida al hombre cuando sus membranas mucosas o piel con abrasiones se exponen a las heces del insecto vector infectado con *T. cruzi* (OMS 2005). También existe transmisión a través de transfusiones sanguíneas, razón por la cual se incluyeron exámenes de control de calidad de la sangre de transfusión en los bancos de sangre de los países latinoamericanos (Segura 2003) pero también en USA y Europa, principalmente España (Dobarro et al. 2008; Gascon et al. 2009; Rodríguez et al. 2009). Otro mecanismo de transmisión es la congénita, donde el parásito puede atravesar la placenta infectando al niño durante el embarazo o el parto (Gürtler et al. 2003; Mollinedo et al. 2005). La transmisión oral ha sido documentada, ocurriendo de manera epidémica en Brasil, Colombia y México.

Se debe al consumo de alimentos contaminados por heces de triatominos como jugos de la fruta de la palma (Nobrega et al. 2009; Pinto 2009).

1.3. Manifestaciones clínicas

Después de la primo infección (~ 8 días), la enfermedad de Chagas (fase aguda) es en general indetectable (estado febril leve) excepto en 10% de los casos donde las manifestaciones pueden ser graves con un pronóstico vital más que todo en los niños. Tras la resolución espontánea de la forma aguda, la mayor parte de los infectados permanecen durante el resto de su vida en un estado indeterminado de la enfermedad que se caracteriza por una parasitemia subclínica, anticuerpos contra *T. cruzi* fácilmente detectables y ausencia de síntomas.

En 30% de los casos, se desarrolla una patología grave y crónica caracterizada por hepatoespleno-megalia, miocarditis e hipertrofia del esófago y el colon, como consecuencia de la destrucción de las células nerviosas (plexo de Auerbach) y otros tejidos encargados de controlar el tamaño de estos órganos. La cardiomegalia y las alteraciones electro cardiográficas son comunes en los pacientes aquejados de enfermedad crónica. La afectación del sistema nervioso central puede producir granulomas en el cerebro con formación de quistes y meningo-encefalitis. En la enfermedad de Chagas crónica la muerte se debe a la destrucción tisular de muchas de las áreas invadidas por los organismos, y se producen casos de muerte súbita por bloqueo cardíaco completo y lesión cerebral (Murray et al. 2005; Postan et al. 1999).

1.4. Tratamiento

Para el tratamiento del Mal de Chagas se emplean dos moléculas que son el benznidazol y el nifurtimox, las cuales si bien presentan actividad antiparasitaria, también presentan efectos colaterales y no son totalmente eficaces. Gracias a diversos estudios clínicos se llegó a recomendaciones en cuanto a la población para la cual se tiene que aplicar el tratamiento (OPS

1999). También se establecieron las medidas de seguimiento durante el tratamiento para evitar efectos adversos. Brevemente, se recomienda el tratamiento en la fase aguda y en niños menores de 12 años. En la fase crónica el tratamiento puede retener la evolución de la patología cardíaca pero este tratamiento está dejado al criterio del médico (Viotti et al. 1994; Pinto 2006).

2. EL AGENTE PATOGENO

2.1. Características

Trypanosoma cruzi es un protozoo unicelular flagelado que durante su complejo ciclo de vida, alterna entre hospederos vertebrados e invertebrados. Presenta dos ciclos de transmisión, (i) un ciclo “doméstico” o sinantrópico, donde el parásito circula entre vectores domiciliados (o del peridomicilio), animales domésticos y el hombre, es el ciclo de mayor importancia epidemiológica, (ii) un ciclo “silvestre” donde *T. cruzi* circula entre los insectos triatómicos y mamíferos salvajes que pueden interactuar con el hábitat humano en ciertas condiciones.

2.2. Ciclo de vida

Las formas sanguíneas (tripomastigotes) son ingeridas por el vector al alimentarse de los mamíferos infectados, transformándose en formas más cortas en el estómago del insecto. Estas formas migran hacia el intestino medio, continuando su desarrollo transformándose en epimastigotes y multiplicándose. Luego, estos epimastigotes llegan a la porción posterior del intestino del vector donde evolucionan a tripomastigotes metacíclicos, forma infectante para el hospedero mamífero (Bonaldo et al. 1988; Carvalho et al. 2003). Los tripomastigotes metacíclicos son eliminados por el insecto en sus heces, penetrando a las células del hospedero donde se transforman en la forma amastigote no flagelada para multiplicarse. Después de su multiplicación intracelular y antes de inducir la lisis de la célula, las formas se flagelan (forma tripomastigote), y posteriormente son liberadas en el torrente sanguíneo (López y Jesús 1996). Las formas sanguíneas tripomastigotes pueden nuevamente

infectar células y así se disemina el parásito hacia varios órganos, por lo que presenta tropismo (Figura 1).

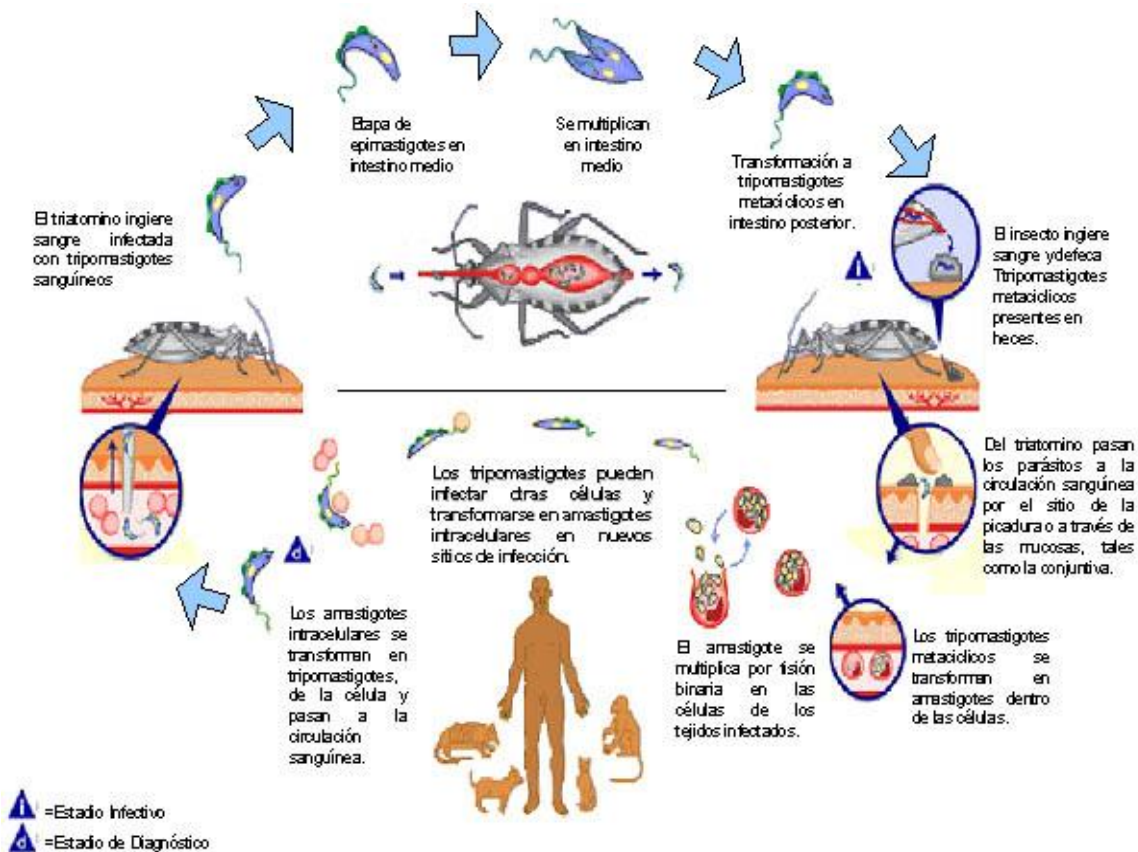


Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* donde se observan los estadios de desarrollo en los dos tipos de hospederos (Tomado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html>).

2.3. Inmunopatología

Desde el inicio de la infección el parásito interactúa con su huésped activando respuestas celulares y humorales. Dos hipótesis han sido formuladas para explicar la patogénesis de la enfermedad: una respuesta autoinmune que se establece y daña los tejidos blancos independientemente de la presencia del parásito, y una respuesta localizada en los tejidos dependiente de la presencia local del parásito (WHO 2002). Varios factores que contribuyen al control de *T. cruzi* han sido descritos, tales como los anticuerpos líticos, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y los macrófagos (Tarleton et al. 1996). Sin embargo el parásito tiene

múltiples estrategias de escape; entre ellas, se han descrito los fenómenos de activación policlonal y de inmunosupresión, y estas perturbaciones del sistema inmune del huésped son las que tienen consecuencias destructivas sobre los tejidos (Minoprio 2001, Ouaiissi et al. 2002).

3. EL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.1. Generalidades y distribución geográfica

Los triatomíneos son insectos que pertenecen al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae. En este grupo se encuentran los principales vectores de la enfermedad de Chagas en América (Dujardin et al. 2002). Presentan la habilidad de dispersarse y colonizar el hábitat humano, conducta que no está bien conocida y pueden aparecer cuando los vectores domésticos son eliminados, dejando nichos vacantes que serán colonizados por poblaciones silvestres. La distribución de las diferentes especies de triatomíneos vectores de *T. cruzi* se encuentra en la Figura 2.

Se ha sugerido que *T. infestans* (Klug, 1834) tiene sus orígenes en los Valles Andinos de Bolivia, donde se pueden encontrar focos silvestres entre las rocas (Dujardin et al. 1988). Habría colonizado el hábitat humano en esta zona a través de la domesticación del cuy, y posteriormente se habría diseminado a otros países de sur América; Argentina, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay, por transporte pasivo por el humano (Schofield 1988). Como consecuencia de los programas nacionales de control de los países del Cono Sur, la distribución de *T. infestans* disminuyó drásticamente desde los años 80 pero aún sigue persistiendo en Argentina, Perú, Paraguay y Bolivia (Schofield et al. 2006).

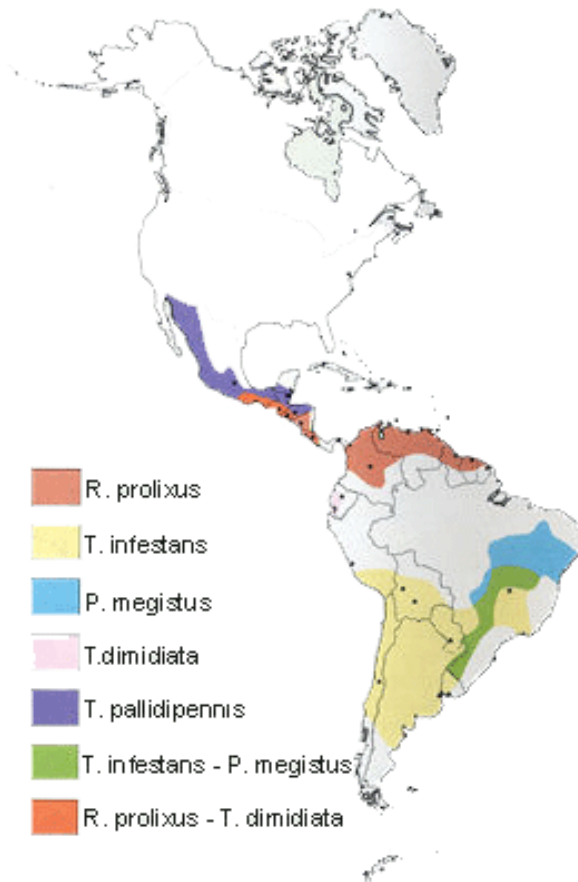


Figura 2. Mapa de la distribución geográfica de las diferentes especies de triatominos que son vectores de la enfermedad de Chagas (Tomado de <http://www.miniatlas.com.ar/MA/?p=51>).

3.2. Ciclo de vida

El ciclo biológico de *T. infestans* es de tipo hemimetábolo exopterigoto. Las hembras ponen huevos de los cuales nace una primera ninfa (1er estadio). Siguen 4 mudas dando lugar a los otros estadios ninfales (2do a 5to estadio). Una última muda permite la emergencia del adulto hembra o macho que tiene las alas completas y funcionales. Los huevos tardan un promedio de 27 a 46 días en incubarse. El desarrollo hasta el estadio adulto es generalmente de un año pero se reportan dos generaciones de *T. infestans* por año en el Chaco Boreal (Catalá et al. 2007). La forma adulta tiene un tiempo de vida que oscila entre 182-470 días (Hack 1955; Wood 1964). Todos los estadios son hematófagos y si la disponibilidad de sangre es estable la abundancia de la población se mantiene (Catalá et al. 2007).

3.3. Lucha antivectorial

Una de las alternativas para controlar la enfermedad de Chagas es a través del control del vector por uso de insecticidas. Inicialmente en los años 50 se empleó el DDT, cuya alta toxicidad al hombre ocasionó que éste fuera retirado. Se aplicaron otros compuestos como los piretroides, los cuales han mostrado buenos resultados (Zerba 1999; Rassi et al. 2003; Reithinger et al. 2006). Pese a todos los esfuerzos de controlar a *T. infestans* en los países del Cono Sur, con el paso del tiempo se ha observado la presencia de resistencia a los insecticidas en ciertas regiones (Noireau et al. 2005; Cecere et al. 2004; Rojas 2007; Marcet et al. 2008). Frente a este problema, se implementaron otros compuestos como el Fipronil, el cual produce, en laboratorio, una mortalidad del 100% de las ninfas a los 7 días y una mortalidad del 88,8% a los 30 días (Gentile et al. 2004).

4. METODOS DE ANALISIS GENETICO DE LAS POBLACIONES DE TRIATOMINOS

En la actualidad, existe un gran interés sobre el conocimiento de la variabilidad genética y la estructuración de los seres vivos. Para llegar a tener este conocimiento, se desarrollaron varias herramientas: electroforesis de isoenzimas, citogenética, PCR-RFLP, RAPD, secuenciación de ADN y análisis estadísticos para cuantificar la variabilidad genética y resumir la información a términos más fácilmente utilizables.

4.1. Análisis de la estructura de poblaciones a través de secuencias de ADN

Las poblaciones naturales tienen una compleja evolución a lo largo del tiempo y en el espacio. Estudiar cómo evolucionan es difícil, pero es posible creando, por ejemplo, bases de datos de las secuencias de ADN de los miembros de las poblaciones. El enfoque es fundamentalmente filogeográfico y se apoya en la estimación de las relaciones evolutivas resumidas en árboles filogenéticos. También se utilizan varios métodos probabilísticos que permiten

medir flujos genéticos entre poblaciones y describir la historia evolutiva entre las especies (Hey y Machado 2003).

4.1.1. Los análisis por F-estadísticos (F-stats)

Para los estudios de la estructura de las poblaciones los análisis de *F-estadísticos* han mostrado ser herramientas útiles para aclarar los patrones de la variación genética inter poblaciones de una misma especie.

Se definieron tres *F-estadísticos* F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} , para explorar el grado de subdivisión de poblaciones (Wright 1951, 1965; Nei 1977). Estos índices miden el grado de “correlaciones entre unidades gaméticas” entre los individuos de una misma población (F_{IS}), entre poblaciones (F_{ST}) y en la población total (F_{IT}), es decir juntando todas las poblaciones consideradas en el estudio. En otros términos, los F_{IS} y F_{IT} miden el grado de desviación a la panmixia en cada subpoblación y en la población total, mientras el F_{ST} expresa la correlación de dos genes tomados al azar en una de las subdivisiones (subpoblación) relacionado a dos genes tomados al azar en la población total, expresando flujos genéticos entre subpoblaciones.

Valores elevados de F_{ST} indican un bajo flujo genético entre las poblaciones. Estos parámetros se relacionan a través de la siguiente expresión:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST}) \cdot (1 - F_{IS})$$

Estos índices son aplicables a diferentes tipos de datos como frecuencias alélicas y haplotipos.

4.1.2. Distancias Genéticas

Las distancias genéticas miden las similitudes genéticas entre poblaciones o individuos, son estimadoras del tiempo de separación entre las unidades analizadas. Se basan sobre caracteres fenotípicos, frecuencias alélicas y secuencias de ADN. Además, modelos evolutivos de proceso

mutacional pueden ser incorporados en el caso de evaluación de distancias en base a secuencias de ADN. Las matrices de distancias genéticas entre poblaciones pueden ser convertidas en árboles utilizando métodos de reconstrucción tales como el UPGMA, el Neighbour Joining (Goldstein y Schlötterer 1999) o el BioNJ, distancia basada sobre un algoritmo de reconstrucción filogenética adaptado para la evaluación de distancias entre secuencias de proteínas y de ADN (Gascuel 1997).

4.1.3. Métodos de Reconstrucción

Existen diferentes métodos para transformar, traducir la matriz de distancias en un árbol, llamados métodos de reconstrucción. Los más utilizados son el método Neighbour-Joining (NJ) y el Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages (UPGMA), los cuales generalmente dan resultados similares pero el primero es superior porque asume diferentes tasas de evolución entre las ramas del árbol filogenético (Takezaki y Nei 1996; Eding y Laval 1999). El método NJ fue descrito por Saitou y Nei (1987). Se caracteriza por la construcción de árboles en base al principio del mínimo de pasos evolutivos (Saitou y Nei, 1987) entre los taxa analizados. También, la versión mejorada del NJ (BIONJ) es recomendada para estimados de distancias en base a alineamientos de secuencias.

El método UPGMA construye los árboles o dendogramas mediante sucesivos agrupamientos bajo el criterio del promedio de la distancia de cada par. Se caracteriza por asumir una tasa constante de cambios evolutivos, es decir asume la existencia de un reloj evolutivo (Weir 1996).

4.1.4. Análisis de Remuestreos (Bootstrap)

Dado que la estimación de las distancias genéticas entre poblaciones es un método estadístico, el muestreo es sumamente importante. Existen varias técnicas estadísticas para re-muestreo de los datos de loci genéticos. Entre ellas se encuentra el «Bootstrapping», la cual permite producir múltiples árboles y luego estimar la fiabilidad de los diferentes agrupamientos (nodos en

el árbol) (Weir 1990). Este método asume que los caracteres evolucionan de manera independiente y fue propuesto por Bradley y Efron (1979). En el caso de un alineamiento de secuencias este método se puede explicar en forma resumida en 3 pasos que serán reiterados por lo menos 100 veces: (i) en el alineamiento original, se sortean n columnas que remplazan columnas del alineamiento original (de este modo, todas las observaciones originales tienen la misma oportunidad de ser reemplazadas) y se realiza un nuevo alineamiento A' , (ii) se construye un nuevo árbol T' en base al nuevo alineamiento (iii) se compara el árbol T' con el árbol original T . Al final del proceso, en base a los árboles obtenidos (por lo menos 100), se calcula las frecuencias de observaciones de los diferentes agrupamientos del árbol original. El proceso genera valores en cada nudo del árbol original y a mayor valor corresponde una mayor fiabilidad del agrupamiento observado.

4.2. Marcadores genéticos empleados en el estudio

4.2.1. Secuencia interna ribosomal (ITS-2)

Los genes ribosomales en eucariotas están organizados en unidades repetidas en tándem donde cada unidad, denominada cluster 45S, contiene tres genes (18S, 5.8S y 28S) que codifican para tres ARN ribosómicos que forman parte de la estructura del ribosoma. Estos genes se encuentran separados por dos secuencias espaciadoras, denominadas espaciadores internos transcritos (Internal Transcribed Spacer) (ITS-1 e ITS-2) (Figura 3). Cada unidad de repetición o cluster se encuentran separadas por otras secuencias espaciadoras denominadas espaciadores externos transcritos (External Transcribed Spacer) (ETS-1 y ETS-2) (Fig. 3) (Eickbush y Eickbush 2007).

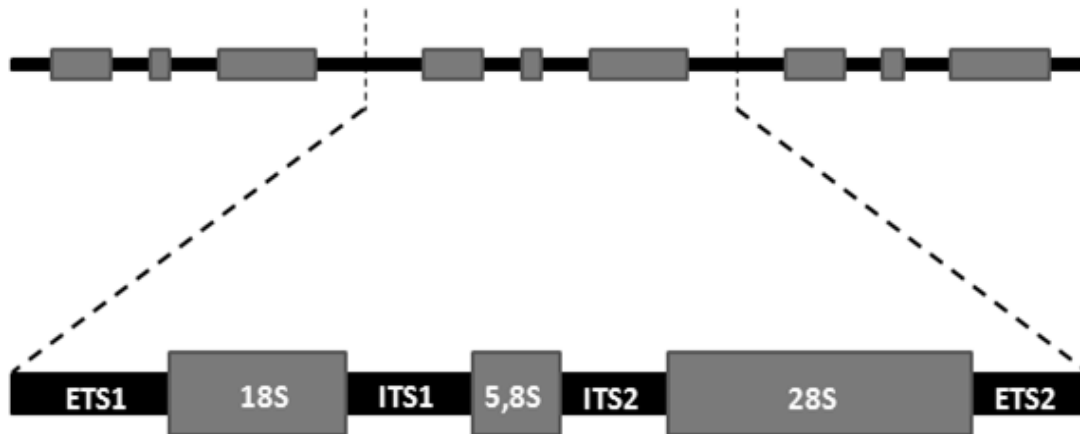


Figura 3. Esquema de las secuencias codificantes para las subunidades ribosomales, las cuales se encuentran separadas por los ITS-1 e ITS-2.

La secuencia de ITS-2 es considerada como un buen marcador molecular para estudios de poblaciones de triatominos, permitiendo diferenciar especies y analizar las relaciones filogenéticas entre estas (Ver capítulo 5.3). Al ser una secuencia no codificante, las mutaciones no tienen repercusión en la síntesis de los ARN ribosómicos (Marcilla et al. 2001).

4.2.2. Gen mitocondrial codificando para el Citocromo B (mtCytB)

El ADN en los organismos eucariotas comprende el ADN nuclear y el ADN mitocondrial y del cloroplasto en plantas. El ADN mitocondrial ha sido usado en estudios moleculares y de filogeografía por más de 25 años, aportando información importante (Ballard y Whitlock 2004). El genoma mitocondrial posee genes para los componentes de la cadena respiratoria, los cuales son proteínas conservadas a través del tiempo (proteínas homólogas entre los organismos) y que permiten realizar estudios filogenéticos (Avisé et al. 1987).

El análisis de la variación del ADN mitocondrial del Citocromo B es considerado como un marcador sensible para detectar la estructura de las poblaciones. En estudios previos ya se ha observado que las poblaciones de triatominos presentaban variabilidad para este marcador y que podía ser

empleado para realizar análisis de genética de poblaciones de triatominos (Lyman et al. 1999). A partir del trabajo de Lyman (1999), se utilizó este marcador en diferentes trabajos (ver capítulo 5.3)

5. LO QUE SE CONOCE ACERCA DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *Triatoma infestans*

La identificación taxonómica de los triatominos en un inicio estuvo basada en las características morfológicas, donde se analizaron principalmente variaciones en la morfología de alas, coloración de las patas y puntos craneales. Durante el período 1965-1975, Lent y Jurberg publicaron los primeros estudios comparativos de las estructuras genitales como un carácter taxonómico diferencial entre distintas especies de triatominos (Galvão 2003).

5.1. La morfometría

Posteriormente aparecieron estudios sobre la estructuración del *T. infestans* basados en el análisis de morfometría, donde se tomaron en cuenta coordenadas de 9 puntos de referencia en las alas y 14 puntos de la cabeza, los cuales se muestran en la Figura 4 (Dujardin et al. 1997, 2000).

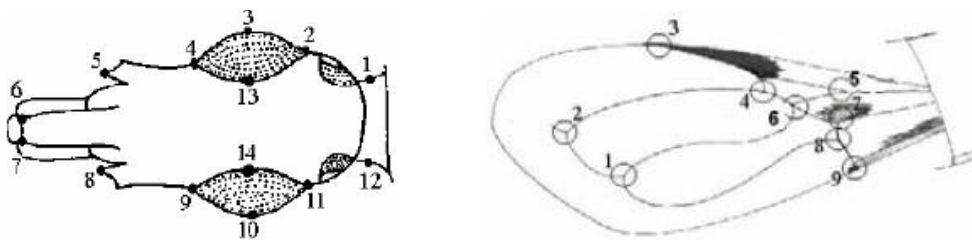


Figura 4. Esquema de los puntos tomados para el análisis de morfometría en triatominos. Izq. Los 14 puntos tomados para la cabeza. Der. Los 9 puntos tomados para las alas.

Las variaciones morfométricas parecen moduladas por factores ecológicos es decir que se observan diferenciaciones entre poblaciones colectadas en diferentes ecotopos (Schachter-Broide et al. 2004). También, se observó que existen diferenciaciones entre poblaciones geográficas dentro de

una especie así como diferenciación entre especies próximas, tal es el caso de *T. infestans* y las especies *T. platensis* y *T. delpontei* (Dujardin et al. 1999). Noireau et al. (2000) reportan una diferenciación morfométrica entre poblaciones de 2 pueblos del Izozog (zona de nuestro estudio) y también una diferenciación más pronunciada entre estas poblaciones domésticas y una población de *T. infestans* silvestre de la misma región. También, en base a diferencias morfométricas entre poblaciones domésticas y silvestres de *T. infestans* del valle de Cochabamba, se pudo proponer que la re-infestación de las casas en esta zona, 10 meses después del rociado, era debida a poblaciones residuales o a poblaciones que fueron transferidas por transporte pasivo de otras comunidades y no a una infestación por poblaciones silvestres procedentes de los alrededores (Dujardin et al. 1997).

5.2. La citogenética

Desde los años 90 se desarrollaron estudios de los cariotipos de triatomos analizando el contenido del ADN, el C-bandeo de la heterocromatina y el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis. Después de varios trabajos desarrollados por su equipo, Panzera et al. (1995) propusieron que esta herramienta no solamente es útil para clarificar la taxonomía de los triatomos, también es útil para diferenciar poblaciones al nivel intra específico. También sugieren que la distribución de la heterocromatina y sus cambios cuantitativos reflejan cambios adaptativos en *T. infestans* en particular (Panzera et al. 2004). Es así que los datos de citogenética muestran que *T. platensis* y *T. infestans* son las especies más relacionadas (Panzera et al. 1995); de manera interesante, la electroforesis de alozimas confirmó este resultado mostrando que la especie más próxima al *T. infestans* era *T. platensis* y que *T. rubrovaria* era la especie más alejada del grupo (Pereira et al. 1996).

En la especie *T. infestans* se observó una gran variación en la cantidad de ADN entre poblaciones andinas y no andinas, presentando las poblaciones andinas 30% más de ADN que las no andinas (Panzera et al. 2004). Siendo el el número cromosómico el mismo para todos los *T. infestans* ($2n = 22$), la

variación del ADN está relacionada con las diferencias en la cantidad de heterocromatina entre las poblaciones andinas y no-andinas. En la población andina la mayor parte de los cromosomas presentan heterocromatina, mientras que en las poblaciones no andinas procedentes de Bolivia, Paraguay, Brasil, Argentina y Uruguay se observan bloques de heterocromatina en solamente 4 a 7 autosomas.

5.3. Los marcadores moleculares: secuencias de genes y polimorfismo de microsatélites

Desde el trabajo elaborado por Lyman y colaboradores en 1999 con el marcador mitocondrial citocromo B (mtCytB), donde se comparan varias especies de triatominos de varios géneros, se desarrollaron otros estudios para observar la estructuración de las poblaciones al nivel intraespecífico con diferentes secuencias de genes o regiones intergénicas pero estos estudios siguen siendo pocos.

El estudio de las secuencias ITS-1 y ITS-2 del ADN ribosomal mostró ser una herramienta útil en los estudios de estructuración de las poblaciones de triatominos, ya que este marcador detecta tanto variaciones entre especies como polimorfismos intraespecíficos. Este marcador fue propuesto como un reloj molecular, ya que permite estimar el tiempo de divergencia entre las diferentes especies de triatominos (Bargues et al. 2000; 2006; Marcilla et al. 2001). Además es una herramienta muy útil para la diferenciación de los diferentes complejos en los que se encuentran agrupados los triatominos (Martínez et al. 2006).

El primer trabajo que incluye un número importante de individuos de *T. infestans* es el de Bargues et al. 2006, donde se indica que (i) la variabilidad de las secuencias ITS-2, es la mayor encontrada en especies de triatominos, (ii) señala una zona minisatélite en la secuencia ITS-1 siendo su presencia correlacionada con las poblaciones de mayor cantidad de ADN, (iii) se identifica

una diferenciación marcada entre las poblaciones del este (andinas) y las del oeste (no-andinas).

Analizando secuencias del mtCytB de 33 insectos *T. infestans*, Monteiro et al. (1999) identificaron 4 haplotipos que se pueden clasificar en dos grupos: el primero está compuesto de insectos procedentes de Argentina y Brasil, mientras que el segundo grupo está formado por insectos domésticos y silvestres del departamento de Chuquisaca, 1 individuo doméstico del departamento de Cochabamba y 4 individuos silvestres (tipo dark morph) de la región del Chaco Boreal (Izozog). Luego, en otro trabajo con un muestreo más grande de 62 individuos colectados en el norte del departamento de Chuquisaca, se encontró una gran variabilidad, identificándose 7 haplotipos de mtCytB diferentes con un haplotipo mayoritario presente en un 67,7% de la población (Giordano et al. 2005).

Piccinali et al. (2009) realizaron un trabajo basado sobre el análisis de secuencias parciales (661 pb) del gen mitocondrial del Citocromo Oxidasa I (COI) con un muestreo importante de 244 especímenes de *T. infestans* procedentes de Argentina Bolivia, Perú y Uruguay. El trabajo destaca diferentes puntos, (i) diferencias importantes en cuanto a la variación nucleotídica de esta secuencia según la población analizada, (ii) una variación mayor en poblaciones argentinas, (iii) dos grupos de haplotipos, uno Boliviano/Peruano otro Argentino/Uruguayo, (iv) una subdivisión del grupo Boliviano/Peruano que aparta el ejemplar de *T. infestans* silvestre de la región del Izozog (Dark morph) de los demás individuos que son de la región andina de Bolivia (13 individuos domésticos y silvestres) y 2 individuos del Perú (Arequipa), (v) también existe una subdivisión del grupo Argentino/Uruguayo.

Recientemente también se analizaron secuencias mitocondriales del gen 16S ribosomal en poblaciones de Argentina (130 individuos de 16 localidades) (Segura et al. 2009). El análisis sugiere bajos niveles de flujo genético entre localidades, con más variación en la parte central de Argentina comparado al noreste y oeste pero sin marcada diferenciación filogeográfica lo que sugiere una expansión reciente en estas zonas.

Recientemente, se desarrollaron estudios con microsatélites, que permitieron ver estructuraciones a escala microgeográfica (Richer et al. 2007; Pizarro et al. 2008; Marcet et al. 2008).

5.4. Origen y dispersión de las poblaciones de *T. infestans*

Tradicionalmente, los valles de Cochabamba han sido propuestos como el centro de origen de *T. infestans* (Usinger 1966). Esta hipótesis ha sido apoyada por el descubrimiento, desde 1946, de focos silvestres de *T. infestans* en estos valles (Torrico 1946). En base a esto, en la reconstrucción histórica propuesta por Schofield en 1988 para explicar la distribución actual de la especie, se propone que el insecto, originalmente silvestre y asociado con cuyes, habría colonizado en estos valles el hábitat humano a través de la domesticación de este roedor. Posteriormente, se habría diseminado a través del transporte pasivo por el hombre. Dujardin et al (1998) propusieron, en base a estudios de la variabilidad de isoenzimas, que las poblaciones de *T. infestans* se originaron un poco más al sur de los valles de Cochabamba, en un triángulo formado por Sucre-Vallegrande-Potosí. En esta región las poblaciones exhiben una mayor variabilidad genética en comparación a las poblaciones de los valles de Cochabamba (Dujardin 1998). Estos autores también sugieren un escenario de dispersión a partir de poblaciones silvestres del sur de Bolivia (Sucre-Vallegrande-Potosí) hacia Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay y zonas andinas ubicadas hacia el norte, mientras las poblaciones silvestres del valle de Cochabamba podrían originarse de poblaciones domésticas. En los dos casos mencionados (valles de Cochabamba o en el triángulo Sucre-Vallegrande-Potosí), el origen propuesto es un origen andino.

Los estudios de citogenética apoyaron la hipótesis andina, relacionando las diferencias de contenido de los genomas (ADN) entre los grupos andinos y no-andino con pérdidas en la cantidad de heterocromatina (Panzera et al. 2004). Es decir que las poblaciones originarias de la especie, andinas, sufrieron una pérdida de gran parte de la heterocromatina cuando se dispersaron hacia regiones no andinas más al sur. Por la excepcionalidad de este gran cambio

genético, los autores sugirieron que este evento de pérdida de ADN fue un evento único en la historia evolutiva de la especie. Luego, desde el norte de Argentina, las poblaciones con su genoma ya reducido se dispersaron hacia el sur con la particularidad de que a medida que nos alejamos de esta región las variaciones cromosómicas decrecen paulatinamente. Las poblaciones de Uruguay y de Brasil, de más reciente colonización, y más alejadas del centro de dispersión, presentan la menor variabilidad cromosómica.

Los otros análisis que sustentan la hipótesis en cuanto al origen geográfico de las poblaciones de *T. infestans* son los de ITS-1 y ITS-2 (Bargues et al. 2006). También en este trabajo se propone un origen de las poblaciones de *T. infestans* en la parte andina encontrando un haplotipo silvestre en el valle de Cochabamba que podría ser el descendiente directo de la población que inició la domesticación en la misma zona. Además, los autores proponen que la dispersión de las poblaciones andinas hacia las tierras bajas podría haber ocurrido antes de la llegada del hombre y así ser anterior a la domesticación de *T. infestans* que habría ocurrido de manera simultánea en las regiones andinas y en las tierras bajas.

5.5. Origen de las poblaciones re-infestantes de *T. infestans*

Los fenómenos de re-infestación de comunidades después de actividades de rociado con insecticidas constituyen un grave problema para los programas nacionales de control vectorial. En los primeros estudios de re-infestaciones por *T. infestans* se observó que la recolonización era debida a poblaciones sobrevivientes a los tratamientos con insecticidas (Dujardin et al. 1996; 1997). En Argentina se determinó que el peridomicilio jugaba un importante rol en la re-infestación de las casas. Las poblaciones residuales aparecían rápidamente en el peridomicilio formando colonias y siendo focos de origen de la re-infestación de los domicilios (Cecere et al. 1996).

Si bien en los casos antes mencionados la re-infestación se originaba de poblaciones residuales domésticas o peri-domésticas, en las zonas donde

existen focos silvestres de *T. infestans*, podría ocurrir también una infestación por la invasión de las casas por poblaciones silvestres atraídas por la luz (Schofield et al. 1992; Gürtler 1999; Noireau 2009; Guhl et al. 2009). También el transporte pasivo de los insectos de casa a casa o del medio silvestre a la casa (colecta de leña por ejemplo) pueden ser otros mecanismos de re-infestación.

Además, a lo largo del tiempo, como consecuencias de los tratamientos con insecticidas, ocurre una selección de poblaciones resistentes a los insecticidas piretroides. En el norte de Argentina se detectaron poblaciones altamente resistentes a piretroides con un rango 50,5 mg/m² (para la deltametrina), a 667,6 mg/m² (para el beta-cyfluthrin) (Picollo et al. 2005). Un estudio en poblaciones colectadas de Mataral y Sucre en Bolivia mostró la existencia de una resistencia baja a la deltametrina y λ-cihalotrina (Toloza et al. 2008).

IV. MATERIALES Y METODOS

1. ÁREA DE ESTUDIO

La región de Izozog está ubicada en el suroriente boliviano (Figura 5) en la provincia Cordillera del Departamento de Santa Cruz (latitud sur entre 18° y 19,5° y longitud oeste entre 62° y 63°). En la región, la temperatura alcanza los 40°C entre octubre y febrero, mientras que de junio a agosto la temperatura desciende a cero. La estación lluviosa se extiende de noviembre a marzo y el Izozog queda aislado durante la estación de las lluvias. En la estación seca que va de agosto a octubre, el río Parapetí pierde su caudal con la consiguiente dificultad de recolectar agua para uso doméstico. Durante los meses de septiembre y octubre aparecen los vientos del norte cuya velocidad alcanza hasta 80 km / hora, dañando los cultivos (Noss y Leny 2001). El Izozog es una región árida y la situación hidrogeológica es inestable. El ecosistema de la cuenca del río Parapetí atraviesa una grave fase de degradación ambiental y entre los factores que alteran el frágil equilibrio de la región, se encuentra la presión de los colonos y de los ganaderos.

2. PROCEDENCIA DE LAS POBLACIONES DE *T. infestans*

Las poblaciones de *T. infestans* estudiadas fueron procedentes de cuatro comunidades, Kuarirenda, Rancho Nuevo, San Silvestre y Tamachindi de la región de Izozog (Figura 5). Estas comunidades se encuentran a lo largo del río Parapetí, encontrándose tres de ellas muy próximas entre sí (Tamachindi a 7 km al sur de Rancho Nuevo y San Silvestre a 15 km al norte de Rancho Nuevo). La cuarta comunidad, Kuarirenda, se encuentra a 25 km más al norte de San Silvestre. Los insectos fueron recolectados adentro (intradomicilio) y afuera (peridomicilio) de las casas por búsqueda activa de dos técnicos del Programa Nacional de Control del vector del departamento de Santa Cruz del 22 de octubre al 9 de noviembre de 2007, antes del primer rociado (grupo Línea de Base, LB; Tabla 1), 4 meses después del primer rociado (grupo de Evaluación Post Vectorial, EPV1; Tabla 2), del 24 de marzo al 14 de abril de 2008, y 8 meses después (grupo EPV2; Tabla 3) del 2 al 21 de agosto de 2008. Todos los insectos recolectados fueron agrupados por lugar

preciso de captura (casa, peridomicilio). En el laboratorio se disecaron los insectos y los datos de cada individuo alimentaron una base de datos en Excel, donde se incluyeron los siguientes datos: código del insecto, fecha de captura, pueblo, N° de vivienda, lugar de captura, especie, estadio, infección por *T. cruzi* y las partes del insecto que se conservaron (patas, alas, tubo digestivo).

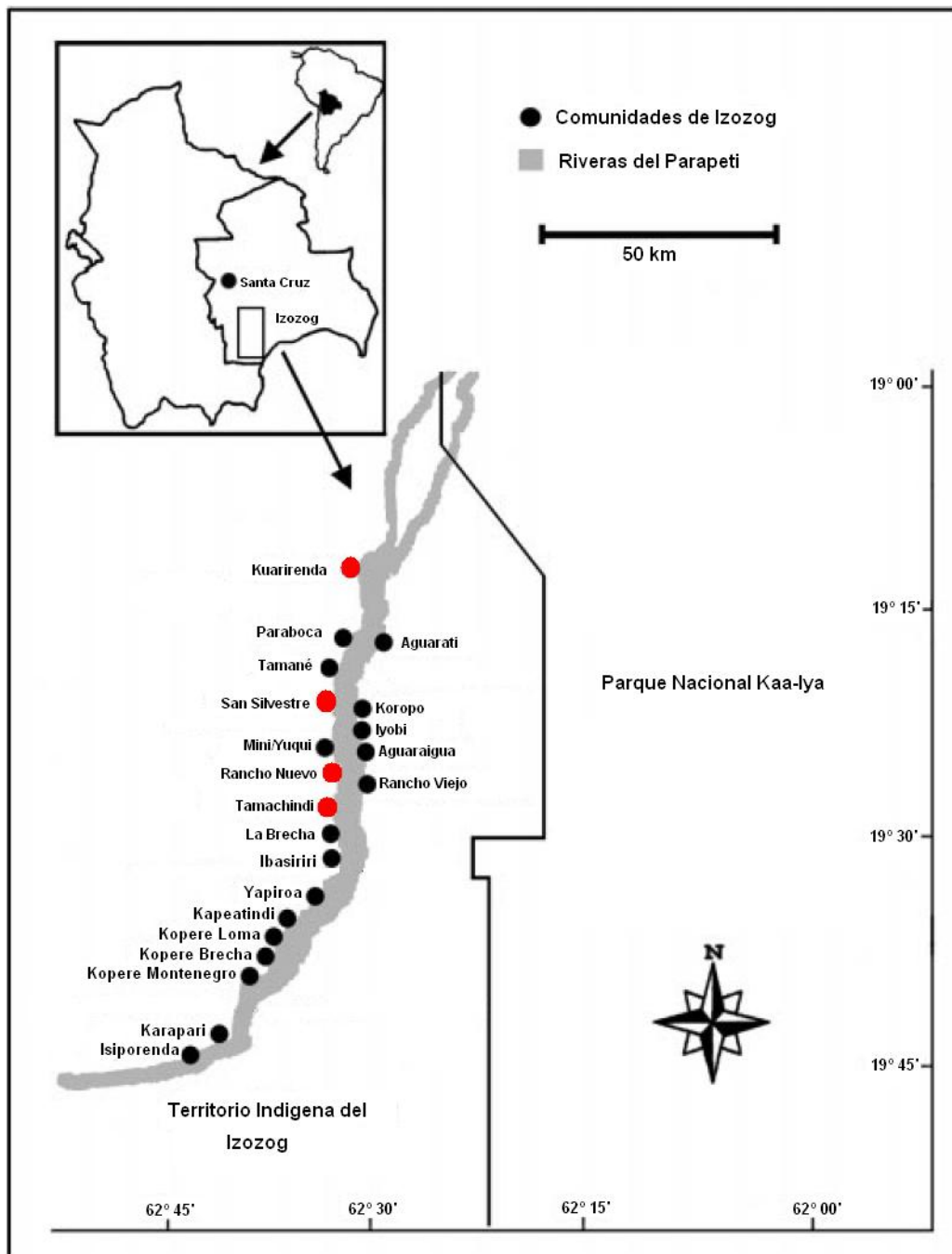


Figura 5. Mapa de la región de Izozog (Santa Cruz - Bolivia) indicando en rojo las comunidades incluidas en el estudio.

Cabe mencionar que las casas en las cuales se encontraron insectos a los 4 meses post-rociado (EPV1) fueron nuevamente rociadas.

Tabla 1. Triatominos capturados antes del rociado con insecticidas (LB) en las 4 comunidades estudiadas (región de Izozog, Santa Cruz - Bolivia).

	Comunidad				Total
	Tamachindi	Kuarirenda	San Silvestre	Rancho Nuevo	
Nº de Casas analizadas	100	117	23	128	368
Nº de Casas infestadas	81	92	14	89	276
Nº de <i>T. infestans</i> colectados	1180	1688	170	1016	4054

Tabla 2. Triatominos capturados 4 meses después del primer rociado con insecticidas (EPV1) en las 4 comunidades estudiadas (región de Izozog, Santa Cruz - Bolivia).

	Comunidad				Total
	Tamachindi	Kuarirenda	San Silvestre	Rancho Nuevo	
Nº de Casas analizadas	100	117	23	128	368
Nº de Casas infestadas	10	10	2	17	39
Nº de <i>T. infestans</i> colectados	37	26	5	36	104

Tabla 3. Triatominos capturados 8 meses después del primer rociado con insecticidas (EPV2) en las 4 comunidades estudiadas (región de Izozog, Santa Cruz - Bolivia).

	Comunidad				Total
	Tamachindi	Kuarirenda	San Silvestre	Rancho Nuevo	
Nº de Casas analizadas	100	117	23	128	368
Nº de Casas infestadas	8	4	3	8	23
Nº de <i>T. infestans</i> colectados	21	8	9	11	49

Por lo que se refiere a los insectos de Línea de Base, 15 insectos fueron analizados en cada comunidad, provenientes de casas escogidas al azar para obtener un muestreo representativo de cada pueblo. En el caso de las colectas

postrocido se emplearon todos los insectos disponibles, analizándose un total de 114 individuos (Tabla 4). La gran mayoría de los insectos seleccionados antes del primer rociado (LB) fueron adultos excepto en San Silvestre donde se analizaron algunas ninfas de tercer y cuarto estadio.

Tabla 4. Número de triatominos seleccionados para el estudio en las 4 comunidades estudiadas (región de Izozog, Santa Cruz - Bolivia).

	Comunidad				Total
	Tamachindi	Kuarirenda	San Silvestre	Rancho Nuevo	
LB	15	15	15	15	60
EPV 1	0	0	5	29	34
EPV 2	0	0	9	11	20

3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACION DEL ADN DE LOS TRIATOMINOS

El ADN total se extrajo y purificó a partir de las patas de los triatominos conservadas en alcohol 70% a 4°C. Se aplicó el método propuesto por Edwards JK 1998 con algunas modificaciones.

Se trituran 3 pares de patas después de secarlas al aire libre, con 200 µl de CTAB (Cetil Trimetil Amonio Bromuro) y se añade 30 µl de proteinaza K (20 mg / ml). Se deja incubar la mezcla durante toda la noche en un baño maría a 37°C para digerir las proteínas y liberar el ADN. Al día siguiente, se añaden 200 µl de cloroformo para extraer el ADN, se centrifuga la mezcla durante 5 min a una velocidad de 12.000 rpm y se recupera la fase superior acuosa. La precipitación del ADN se efectúa añadiendo 200 µl de alcohol isopropilico y centrifugando nuevamente la solución durante 15 min a una velocidad de 12.000 rpm. Después de un enjuague del sedimento de ADN con 200 µl de etanol al 70% seguido de una centrifugación, se seca al aire libre el sedimento de ADN el cual finalmente se re suspende en 20 µl de agua bidestilada.

La cuantificación y determinación de la pureza del ADN se realiza por espectrofotometría, en un espectrofotómetro BioMate 3 marca Thermo Electron Corporation®, con lecturas a 260 y 280 nm. Se conserva una alícuota de ADN de cada muestra a una concentración de 100 ng / μ l y la solución concentrada a una temperatura de -20°C hasta su análisis.

4. AMPLIFICACION POR PCR DE LA SECUENCIA ESPACIADORA INTERNA ITS-2 Y DEL GEN MITOCONDRIAL CITOCROMO B mtCytB

Se emplearon los siguientes iniciadores:

- Para el ITS-2: ITS2F (5'-CTA-AGC-GGT-GGA-TCA-CTC-GG-3') e ITS2R (5`GCA-CTA-TCA-AGC-AAC-ACG-ACT-C 3`) descritos por Marcilla et al (2000).

- Para el mtCytB: CytobtF (5'-GGA-CAA-ATA-TCA-TGA-GGA-GCA-ACA-G-3') y CitobtR (5'-ATT-ACT-CCT-CCT-AGC-TTA-TTA-GGA-ATT-G-3') descritos por Lyman et al (1999).

Ambos juegos de iniciadores fueron provistos por la compañía EUROGENTEC S.A.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 30 μ l: 15 μ l de PCR MasterMix 2X Marca Promega (el cual contiene la Taq polimerasa y los dNTPs en solución adecuada de concentración de sales), 1,2 μ l de cada iniciador preparados a una concentración de 10 μ M, 11,6 μ l de agua libre de DNAsa, y 1 μ l de ADN de cada muestra a 100 ng / μ l. La amplificación se realizó en un termociclador Mastercycler® *Gradient thermal cycler* de la marca Eppendorf ®.

La PCR inició con una etapa de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de tres pasos: el primero de desnaturalización del ADN 30 segundos a 94°C, el segundo de hibridación de las cadenas desnaturalizadas con los iniciadores a 48,3°C y 52,2°C durante 1 minuto para mtCytB e ITS-2 respectivamente, el tercer de síntesis de las cadenas de ADN

complementarias a 72°C durante 1 minuto, temperatura a la cual la polimerasa actúa. Al finalizar los 30 ciclos, para completar la extensión de las cadenas amplificadas, se realiza una elongación final a 72°C durante 7 minutos.

Luego, 4 µl de cada muestra de PCR diluidos en un tampón de migración EzVision (AMRESCO®), fueron sembrados en geles de agarosa al 1%. Para confirmar la presencia de amplicones y el tamaño de los productos se empleó en la corrida electroforética un marcador de peso molecular.

5. SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La purificación y secuenciación de los amplicones del ADN se realizó por la compañía MacroGen en Seoul, Corea del Sur. Se envió para cada muestra un volumen de amplicón de 20 a 25 µl en un tubo de 1,5 ml previamente etiquetado con el código de la muestra. Se acompañó el envío de datos requeridos por la empresa MacroGen donde se indicaron las reacciones a realizar. Se juntaron al envío los iniciadores necesarios para la secuenciación con un volumen mínimo de 2 µl de cada iniciador a una concentración de 5 µM por cada reacción de secuenciación a ser realizada. La compañía MacroGen purificó los amplicones por electroforesis y realizó la secuenciación por el método de Sanger en un secuenciador 3730/3730xl DNA Analyzer. Para cada amplicón, una secuenciación de cada hebra del ADN fue solicitada para luego poder establecer la secuencia consenso.

6. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS E IDENTIFICACION DE HAPLOTIPOS

Para cada muestra, se recibieron de la compañía MacroGen dos secuencias, una "Forward (F)" y una "Reverse (R)", correspondiendo a las secuencias encontradas para cada hebra del fragmento de ADN. Se organizaron las secuencias en formato "fasta" en paquetes donde se suceden para cada muestra, la secuencia F y el reverso complementario de la secuencia R. Posteriormente, estas fueron alineadas en grupo con una secuencia de referencia (*T. infestans* Marcilla La Paz [AJ286874](#) para el ITS-2 y

T. infestans Lyman AF045721 para el mtCytB), en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999). En primer lugar, con la observación de los cromatogramas correspondientes a la secuencia F y el reverso complementario de la secuencia R de cada muestra, se logró corregir cada secuencia en los sitios donde se observaron discrepancias entre la secuencia F y el reverso complementario del R. Luego se verificó con los cromatogramas los sitios de mutaciones para el paquete de secuencias. Finalmente se cortaron los fragmentos no resueltos de las secuencias en 5' y 3' de manera que se obtuvieron secuencias editadas y corregidas, alineadas para una misma región.

Según el alineamiento de las secuencias corregidas se asignó un número de haplotipo a cada secuencia diferente.

7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para verificar si las secuencias obtenidas correspondían a secuencias ya depositadas en el banco de genes se creó un fichero de texto con las secuencias ITS-2 y mtCytB depositadas en el GenBank para *T. infestans* en forma fasta (*.fas). También se estableció un fichero Excel que contenía los siguientes datos: el número de acceso de la secuencia, el origen geográfico de los insectos correspondientes, el código identificador del haplotipo dado por los autores, así como la publicación a la cual se refiere el depósito de la secuencia.

La traducción en aminoácidos de las secuencias de ADN de los diferentes haplotipos del mtCytB fue realizada con el programa MEGA versión 4 empleando la tabla de código genético correspondiente al genoma mitocondrial de invertebrados (Tamura et al. 2007).

8. ANALISIS DE GENETICA DE POBLACIONES

8.1. Índices de variabilidad genética

A partir del software DNAsp v5 (Librado & Rozas 2009) fueron encontrados los sitios segregantes o polimórficos S , el número de sitios parsimonicamente informativos, además de los diferentes índices que miden la variación de secuencias dentro y entre poblaciones:

- a) k es el promedio de diferencias nucleotídicas (Tajima 1983) calculado entre dos secuencias excluyendo o conservando los “gaps”, siendo su expresión matemática:

$$k = \sum_{ij} \sum_{ij} k_{ij} / \binom{n}{2}$$

Donde k_{ij} son las diferencias nucleotídicas de las secuencias i y j , y n es el número de secuencias en la población. La sumatoria se hace a partir de las diferencias nucleotídicas de los distintos pares i,j .

- b) π (π) es la diversidad nucleotídica estimada en una población, corresponde al promedio de diferencias nucleotídica por sitio entre dos secuencias, los “gaps” están excluidos del análisis. El índice de diversidad nucleotídica, muy utilizado en genética molecular, mide el grado de polimorfismo dentro de una población. Este estimador fue incluido en el análisis de secuencias por Nei and Li in 1979. Se define como la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición al ser tomados al azar sean diferentes, y es calculado a través de la siguiente fórmula:

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^i x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde x_i y x_j son las respectivas frecuencias de las secuencias i y j , π_{ij} es el numero de diferencias nucleotídicas por sitio nucleotídico dentro de las secuencias i y j , y n es el número de secuencias en la

población. La sumatoria es tomada sobre todos los distintos pares i, j , sin repeticiones.

- c) Theta (θ) índice de Watterson (por sitio), permite estimar la tasa de mutaciones en una población. Los “gaps” están excluidos. El estimado de θ de Watterson se escribe como θ_w , y se calcula de la siguiente manera:

$$\theta_w = \frac{K}{a_n}$$

Donde K es el número de sitios segregantes y a_n es número armónico.

$$a_n = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$$

- d) H_d es la diversidad haplotípica (Nei & Tajima 1981) que mide la exclusividad de un haplotipo dado en una población: $H_d = N(1 - \sum x_i^2) / (N-1)$ donde x_i es la frecuencias de cada haplotipos en la población y N el tamaño de la población. Se define como la probabilidad de que dos haplotipos que son tomados al azar de una población sean diferentes.

8.2. Pruebas de neutralidad

Las pruebas de neutralidad permiten probar la hipótesis según la cual las mutaciones son selectivamente neutrales es decir permiten distinguir entre una secuencia de ADN que evoluciona al azar (neutralidad) o bajo procesos no al azar, tales como la selección dirigida o balanceada, la expansión demográfica o contracción, el autostop genético. Para estos estimadores los sitios con gap son excluidos de los análisis. En nuestro estudio, utilizamos 2 pruebas de neutralidad diferentes:

- a) *D* test, propuesto por Tajima (1989). Esta prueba está basada sobre las diferencias entre el número de sitios polimórficos (“segregating sites”) y el promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias. La significancia del índice *D* está calculada bajo la hipótesis que *D* sigue una distribución de tipo beta.

$$D = \frac{\theta_{\pi} - \theta_s}{\sqrt{\text{Var}(\theta_{\pi} - \theta_s)}}$$

Donde $\sqrt{\text{Var}(\theta_{\pi} - \theta_s)}$ es la varianza de $(\theta_{\pi} - \theta_s)$, $\theta_{\pi} = \pi$ es el promedio de número de nucleótidos diferentes entre pares de secuencias y $\theta_s = S$ es el número total de sitios segregantes.

- b) *F_s* (F_s), propuesto por Fu en 1997, este está basado en la distribución de las frecuencias de los haplotipos.

$$F_s = \ln \left(\frac{S'}{1 - S'} \right)$$

Donde *S'* es la probabilidad de observar en una muestra tomada aleatoriamente un número similar de alelos.

8.3. Pruebas de diferenciación genética entre poblaciones

La diferenciación genética entre pares de poblaciones determinada por el cálculo del F-estadístico (*F_{ST}*), la prueba exacta de diferenciación entre poblaciones así como el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) fueron procesados con el programa Arlequin 3.1 (Excoffier y Heckel 2006).

8.3.1. Prueba de Fst

El *F_{ST}* es un índice de similitudes (distancia genética) entre pares de poblaciones. Los valores de *F_{ST}* calculados entre pares de poblaciones fueron probados bajo la hipótesis de ausencia de diferencias entre las poblaciones usando 1000 permutaciones de haplotipos entre las poblaciones.

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma_T^2}$$

Donde σ_a^2 son las permutaciones entre poblaciones entre grupos, σ_b^2 son las permutaciones entre las poblaciones dentro los grupos y σ_T^2 son las permutaciones totales en la población.

8.3.2. Test exacto

El test exacto es análogo a la prueba exacta de Fisher, desarrollado por Ewens (1972) y corregido por Watterson (1978), donde la hipótesis de una distribución al azar de los diferentes haplotipos entre las poblaciones está probada por el sistema de cadena de Markov de tal manera a estimar una probabilidad de similitud entre las poblaciones.

8.3.3. Análisis molecular de varianza (AMOVA)

Para analizar la estructura de las poblaciones a través del análisis molecular de varianza (AMOVA), se han definido dos estructuras genéticas de las poblaciones para ser probadas: la primera comprende el grupo de las poblaciones ubicadas más al norte (Karirenda y San Silvestre) y las poblaciones ubicadas más al sur (Rancho Nuevo y Tamachindi), la segunda las poblaciones antes del rociado y el grupo de poblaciones de re-infestantes. El análisis AMOVA procesa de manera jerarquizada examinando la distribución de las variancias entre los grupos, entre las poblaciones adentro de cada grupo y dentro las poblaciones. La significancia de los índices calculados utiliza pruebas no paramétricas descritas por Excoffier et al. (1992) que consiste en permutaciones de haplotipos, individuos o poblaciones entre las poblaciones o grupos de poblaciones.

V. RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS

1.1. Secuencias ITS-2

Los productos de amplificación presentaron un tamaño de 950 pb que incluye el ITS-2 y regiones próximas constituyentes de partes de los genes de las subunidades ribosomales (Figura 6). Se secuenciaron 114 productos de amplificación de los cuales se pudo resolver las secuencias de 102 (89,5%). La secuencia correspondiente al ITS-2 (454-458 pb) fue identificada por alineamiento con secuencias de ITS-2 depositadas en el GenBank. En base al alineamiento de todas las secuencias se identificaron 3 haplotipos (Hap1ITS2, Hap2ITS2 y Hap3ITS2), los cuales presentaron 2 sitios de variación en los sitios nucleotídicos 54 y 350, además de observarse una variación de 1 a 2 repeticiones (AT) en una región microsatélite (Figura 7). Los haplotipos Hap1ITS2 y Hap3ITS2 corresponden a haplotipos previamente descritos con los números de acceso en GenBank AJ576054.1 y AJ582025.1 respectivamente. El haplotipo Hap2ITS2 no fue anteriormente identificado. Estos tres haplotipos se identificaron cada uno en varios individuos (ver capítulo 2 de los resultados). El nuevo haplotipo Hap2ITS2 fue el menos frecuente (5%) en la población total, siendo el más frecuente el haplotipo Hap1ITS2 (74%) (Figura 8).

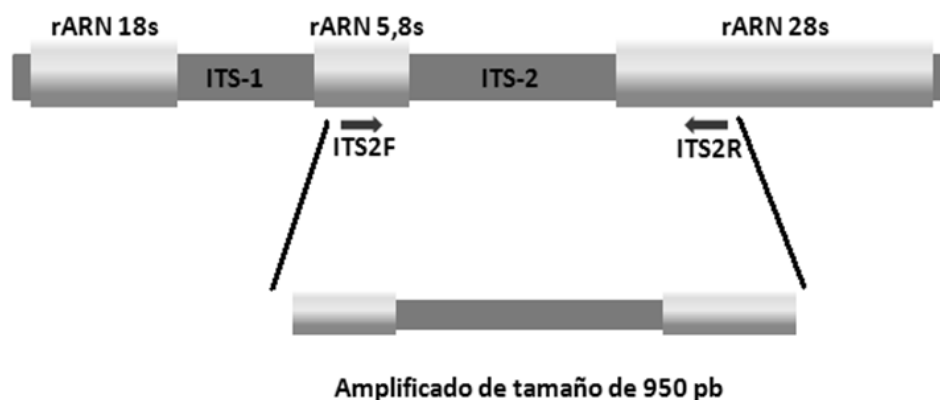


Figura 6. Lugar de unión de los iniciadores empleados para la amplificación del ITS-2 de *T. infestans* mostrando un fragmento de 950 pb que incluye partes de los genes de las subunidades ribosomales 5,8S y 28S próximos al fragmento de interés.

1.2. Secuencias mtCytB

El fragmento amplificado presentó un tamaño de 450 pb para todas las muestras. Luego de corregir las secuencias se pudo analizar un fragmento de 388 pb. De las 114 muestras procesadas se pudo resolver las secuencias de 106 (93 %). El alineamiento de todas las secuencias permitió identificar 8 haplotipos en la población total (HapCytB) presentados en la Figura 9. Se observó un total de 15 sitios de mutación (Tabla 5). De ellas, 14 mutaciones en tercera posición de codón, son silenciosas, la mutación restante en segunda posición de codón (sitio 188), no es silenciosa (Thr → Met; Figura 10) y se encuentra en Hap7CytB. Estos 8 haplotipos se identificaron cada uno en varios individuos (ver capítulo 2 de resultados). Los haplotipos Hap1CytB y Hap8CytB corresponden a haplotipos previamente descritos con los números de acceso en GenBank AY702019 y EF639038 respectivamente. Estos dos haplotipos, Hap1CytB y Hap8CytB, son mayoritarios (38% y 34% respectivamente) encontrándose los otros haplotipos con frecuencias < 10% (Figura 11). Los otros 6 haplotipos Hap2CytB, Hap3CytB, Hap4CytB, Hap5CytB, Hap6CytB y Hap7CytB no fueron anteriormente descritos, y se identificaron cada uno en varios individuos (ver capítulo 2 de los resultados).

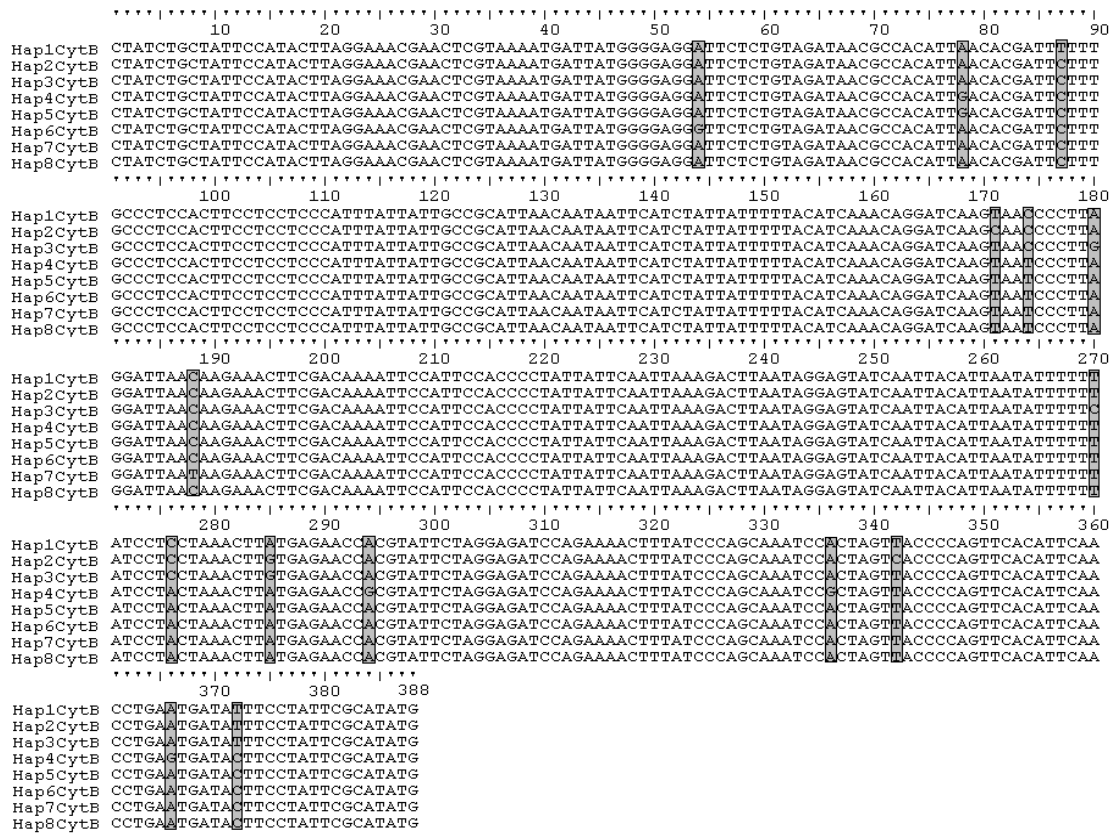


Figura 9. Alineamiento de las secuencias de los 8 haplotipos identificados para el gen mtCytB de *T. infestans* capturados en la región de Izozog; se observan las mutaciones en 15 sitios variables (cuadros).

Tabla 5. Sitios variables observados en un fragmento de 388 pb del gen mtCytB de *T. infestans* colectados en la región de Izozog.

	54	78	87	171	174	180	188	270	276	285	294	336	342	366	372
Hap1CytB	A	A	T	T	C	A	C	T	C	A	A	A	T	A	T
Hap2CytB	-	-	C	C	-	-	-	-	-	G	-	-	C	-	-
Hap3CytB	-	-	C	-	-	G	-	C	-	G	-	-	-	-	-
Hap4CytB	-	G	C	-	T	-	-	-	A	-	G	G	-	G	C
Hap5CytB	-	G	C	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	C
Hap6CytB	G	-	C	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	C
Hap7CytB	-	-	C	-	T	-	T	-	A	-	-	-	-	-	C
Hap8CytB	-	-	C	-	T	-	-	-	A	-	-	-	-	-	C

Hap1CytB	LSAIPYLGNELVKWLWGGFSVDNATLTRFFALHFLLPFIIAALTMIHLLFLHQTGSSNPLGLTSN
Hap2CytB	LSAIPYLGNELVKWLWGGFSVDNATLTRFFALHFLLPFIIAALTMIHLLFLHQTGSSNPLGLTSN
Hap3CytB	LSAIPYLGNELVKWLWGGFSVDNATLTRFFALHFLLPFIIAALTMIHLLFLHQTGSSNPLGLTSN
Hap4CytB	LSAIPYLGNELVKWLWGGFSVDNATLTRFFALHFLLPFIIAALTMIHLLFLHQTGSSNPLGLTSN
Hap5CytB	LSAIPYLGNELVKWLWGGFSVDNATLTRFFALHFLLPFIIAALTMIHLLFLHQTGSSNPLGLTSN
Hap6CytB	LSAIPYLGNELVKWLWGGFSVDNATLTRFFALHFLLPFIIAALTMIHLLFLHQTGSSNPLGLTSN
Hap7CytB	LSAIPYLGNELVKWLWGGFSVDNATLTRFFALHFLLPFIIAALTMIHLLFLHQTGSSNPLGLM
Hap8CytB	LSAIPYLGNELVKWLWGGFSVDNATLTRFFALHFLLPFIIAALTMIHLLFLHQTGSSNPLGLTSN

Hap1CytB	FDKIPFHPYYSIKDLMGVSITLMFFILLNLWEPRILGDPENFIPANPLVTPVHIQPEWYFLFAY
Hap2CytB	FDKIPFHPYYSIKDLMGVSITLMFFILLNLWEPRILGDPENFIPANPLVTPVHIQPEWYFLFAY
Hap3CytB	FDKIPFHPYYSIKDLMGVSITLMFFILLNLWEPRILGDPENFIPANPLVTPVHIQPEWYFLFAY
Hap4CytB	FDKIPFHPYYSIKDLMGVSITLMFFILLNLWEPRILGDPENFIPANPLVTPVHIQPEWYFLFAY
Hap5CytB	FDKIPFHPYYSIKDLMGVSITLMFFILLNLWEPRILGDPENFIPANPLVTPVHIQPEWYFLFAY
Hap6CytB	FDKIPFHPYYSIKDLMGVSITLMFFILLNLWEPRILGDPENFIPANPLVTPVHIQPEWYFLFAY
Hap7CytB	FDKIPFHPYYSIKDLMGVSITLMFFILLNLWEPRILGDPENFIPANPLVTPVHIQPEWYFLFAY
Hap8CytB	FDKIPFHPYYSIKDLMGVSITLMFFILLNLWEPRILGDPENFIPANPLVTPVHIQPEWYFLFAY

Figura 10. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de ADN de los 8 haplotipos identificados para el marcador mtCytB en la región de Izozog, donde se observa el sitio de sustitución Thr → Met, el cual está marcado.

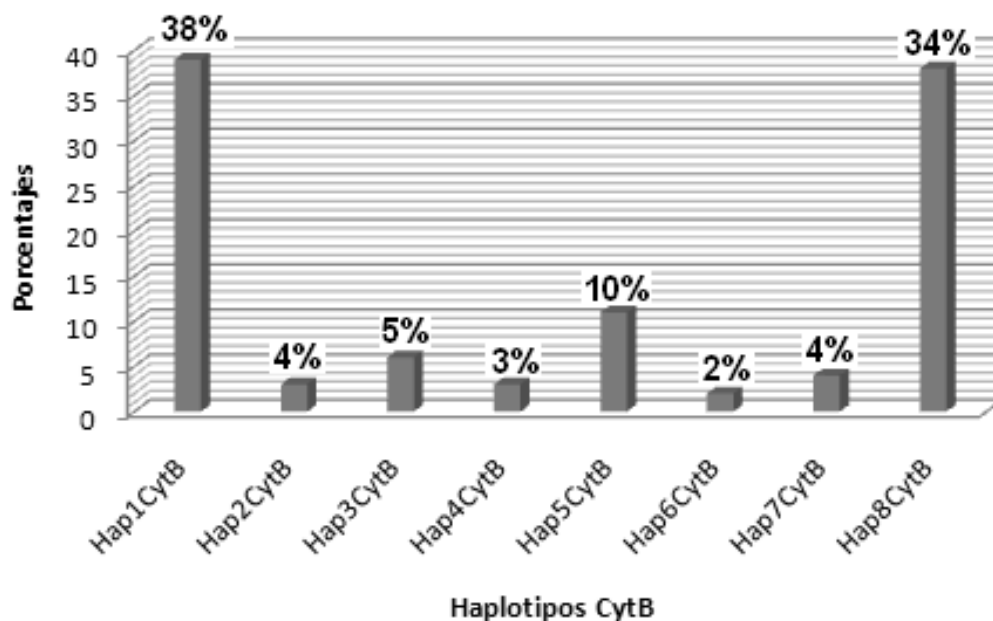


Figura 11. Frecuencias de los 8 haplotipos mtCytB de *T. infestans* identificados en la población total de la región de Izozog (106 secuencias).

2. VARIABILIDAD Y ESTRUCTURA GENETICA DE LAS DIFERENTES POBLACIONES

2.1. Poblaciones colectadas antes del primer rociado con insecticidas (Línea de Base, LB)

2.1.1. ITS-2

En cada comunidad, se pudieron analizar 12 a 15 individuos colectados antes del rociado. La Figura 12 y la Tabla 6 indican cómo se distribuyen los 3 haplotipos encontrados (ver capítulo 1.1 de los resultados) en las comunidades. Los 3 haplotipos son identificados en las 4 comunidades excepto Hap2ITS2 (haplotipo menos frecuente) no detectado en Tamachindi. El haplotipo Hap1ITS2 es mayoritario en cada comunidad. La Tabla 6 resume también los índices de variabilidad en cada población. Las diversidades haplotípicas y nucleotídicas son más elevadas en Kuarirenda en comparación a las otras comunidades. El índice de Watterson muestra que la tasa de mutación es más baja en la población total que en cada población. El promedio de las diferencias nucleotídicas entre individuos muestra que existe una baja variabilidad en cada población, sin embargo este valor se triplica cuando se toman en cuenta los indel. Los valores calculados para las pruebas de neutralidad (Tajima, Fu) muestran que las mutaciones son selectivamente neutras ($p > 0,05$) en todas las poblaciones y en la población total (Tabla 6).

Se analizó la diferenciación genética entre las poblaciones de las 4 comunidades por el índice F_{st} que se basa en diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias pero no se observaron diferencias significativas entre las poblaciones (Tabla 7). Otro test de diferenciación, basado sobre las frecuencias de los haplotipos (Test exacto), permitió observar solamente que las poblaciones de las comunidades más alejadas geográficamente, Tamachindi y Kuarirenda, presentaban diferencias significativas. Las diferencias entre pares de poblaciones resultaron ser no significativas (Tabla 8).

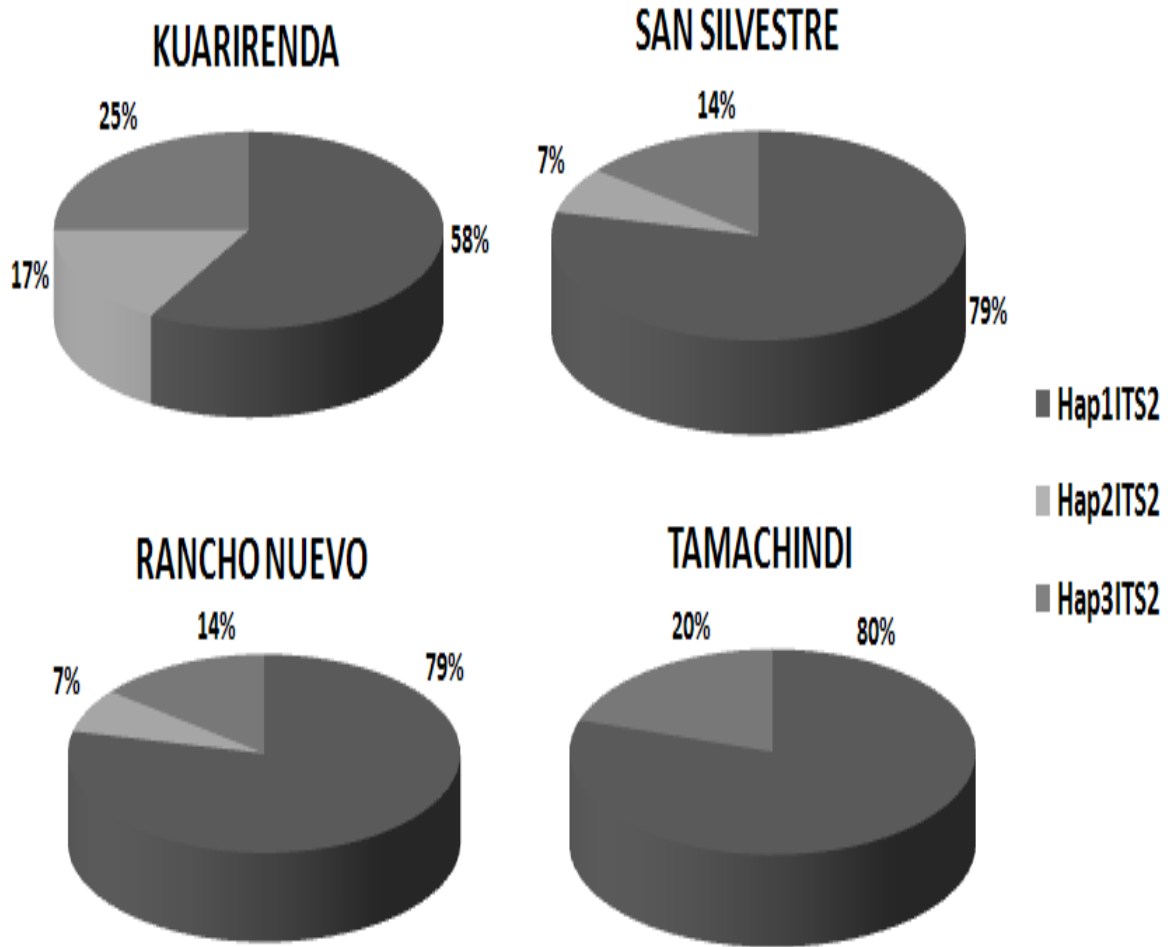


Figura 12. Distribución de los 3 haplotipos encontrados en las poblaciones de línea de base, para el marcador ITS-2, en las 4 comunidades estudiadas en la región de Izozog.

Tabla 6. Estimaciones de la variabilidad del ITS-2 y resultados de las pruebas de neutralidad para las poblaciones de línea de base y re-infestantes en la región de Izozog.

ITS-2	Población total	KUALB	RNLB	SSLB	TAMLB	RNRE	SSRE
Número de secuencias	102	12	14	14	15	34	13
Número de sitios	458	458	458	458	458	458	458
Número de inserciones	4	4	4	4	4	4	4
Número de sitios variables	2	2	2	2	2	2	2
Singleton	0	0	0	1	0	0	0
Número de sitios parsimonicamente informativos	2	2	2	1	2	2	2
Sitios segregantes	54 y 350	54 y 350	54 y 350	54 y 350	54 y 350	54 y 350	54 y 350
Número promedio de diferencias nucleotídicas: k	0,702 ^a	0,939 ^a	0,626 ^a	0,505 ^a	0,686 ^a	0,742 ^a	0,846 ^a
	2,106 ^b	2,818 ^b	1,879 ^b	1,516 ^b	2,057 ^b	2,225 ^b	2,538 ^b
Diversidad nucleotídica: π	0,00155	0,00207	0,00138	0,00111	0,00151	0,00163	0,00186
Índice de Watterson: θ	0,00085	0,00146	0,00139	0,00139	0,00135	0,00108	0,00142
Número de haplotipos	3	3	3	3	2	2	3
Hap1ITS2	76	7	11	11	12	26	9
Hap2ITS2	6	2	1	2	0	0	1
Hap3ITS2	20	3	2	1	3	8	3
Diversidad haplotípica : Hd	0,407	0,621	0,385	0,385	0,343	0,371	0,500
Prueba D de Tajima	1,26242 ¹	1,2227 ¹	-0,01092 ¹	1,01886 ¹	-0,53247 ¹	0,87897 ¹	0,30213 ¹
Prueba Fs de Fu	1,625 ¹	0,560 ¹	-0,072 ¹	-0,446 ¹	1,795 ¹	2,629 ¹	0,436 ¹

LB = población de línea de base antes del rociado; RE = población re-infestante; KUA= Kuarirenda, RN = Rancho Nuevo, SS = San Silvestre, TAM = Tamachindi

^a Valor de k sin considerar los indel

^b Valor de k considerando los indel

θ Estimado de la tasa de mutaciones en la población

¹ $p > 0,05$.

Tabla 7. Diferenciaciones genéticas inter poblaciones obtenidas con el ITS-2, basadas sobre las diferencias nucleotídicas (π) entre pares de individuos y expresadas por el valor de F_{st}

	KUALB	RNLB	SSLB	TAMLB	RNRE	SSRE
KUALB		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
RNLB	-0.00935		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
SSLB	0.02538	-0.06657		> 0,05	> 0,05	> 0,05
TAMLB	-0.00212	-0.04777	-0.02392		> 0,05	> 0,05
RNRE	-0.07110	-0.05451	-0.02373	-0.04198		> 0,05
SSRE	-0.01472	-0.03923	-0.01008	-0.02795	-0.04858	

LB = población de línea de base antes del rociado; RE = población re-infestante; KUA = Kuarirenda, RN = Rancho Nuevo, SS = San Silvestre, TAM = Tamachindi. Valores de F_{st} bajo la diagonal, valores de p encima la diagonal: cada valor de F_{st} esta estadísticamente probado bajo la hipótesis nula de ausencia de diferencia entre poblaciones por permutaciones aleatorias de haplotipos.

Tabla 8. Resultados de los test exactos de diferenciación inter poblaciones obtenidos con el ITS-2

	KUALB	RNLB	SSLB	TAMLB	RNRE
KUALB					
RNLB	0,57761 \pm 0,0039				
SSLB	0,59238 \pm 0,0024	1,00000 \pm 0,0000			
TAMLB	0,01682 \pm 0,0009*	0,10924 \pm 0,0025	0,10546 \pm 0,0022		
RNRE	0,08085 \pm 0,0031	0,37095 \pm 0,0041	0,07166 \pm 0,0024	0,00325 \pm 0,0003**	
SSRE	0,85173 \pm 0,0025	0,81900 \pm 0,0022	0,57809 \pm 0,0049	0,10546 \pm 0,0022	0,46075 \pm 0,0034

LB = población de línea de base antes del rociado; RE = población re-infestante; KUA = Kuarirenda, RN = Rancho Nuevo, SS = San Silvestre, TAM = Tamachindi

* $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.

2.1.2. mtCytB

De la misma manera que para el marcador ITS-2, se pudieron analizar 13 a 15 individuos antes del rociado en cada comunidad. La Figura 13 y la Tabla 9 indican cómo se distribuyen los 8 haplotipos encontrados (ver capítulo 1.2 de los resultados) en las comunidades: solamente los haplotipos Hap1CytB y Hap8CytB (los más frecuentes) se observan compartidos entre las 4 comunidades. Algunos de los otros haplotipos que son de baja frecuencia se

observan solamente en una población (Hap2CytB y Hap6CytB en Tamachindi, Hap4CytB y Hap7CytB en Rancho Nuevo). Los índices de variabilidad genética (diversidades haplotípica y nucleotídica, el promedio de las diferencias nucleotídicas k y el índice de Watterson) son en general superiores a los índices estimados para el ITS-2 (Tabla 6), mostrándose una mayor variabilidad para este marcador. También, las pruebas de neutralidad no detectan alguna presión selectiva de las mutaciones en ninguna de las poblaciones (Tabla 9).

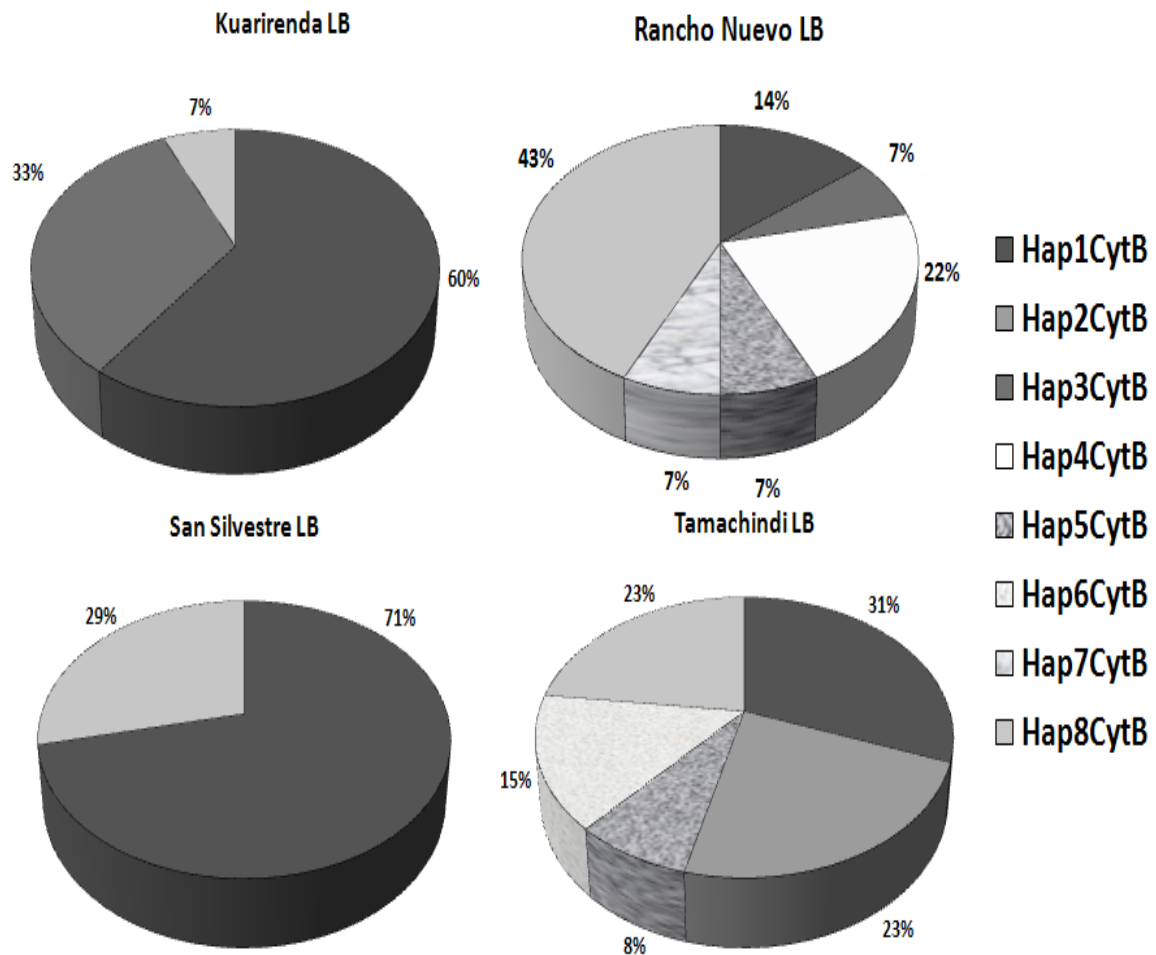


Figura 13. Distribución de los 8 haplotipos encontrados en las poblaciones de Línea de Base, para el mtCytB, en las 4 comunidades estudiadas en la región de Izozog.

Tabla 9. Estimaciones de la variabilidad del mtCytB y resultados de las pruebas de neutralidad para las poblaciones de línea de base y re-infestantes en la región de Izozog.

mtCytB	Población total	KUALB	RNLB	SSLB	TAMLB	RNRE	SSRE
Número de secuencias	106	15	14	14	13	36	14
Número de sitios	388	388	388	388	388	388	388
Número de inserciones	0	0	0	0	0	0	0
Número de sitios variables	15	7	12	4	9	6	4
Singleton	0	3	4	0	1	0	0
Número de sitios parsimoniosamente informativos	15	4	8	4	8	6	4
Sitios Singleton	-	174 276 372	180 188 270 285	-	78	-	-
Sitios parsimoniosamente informativos	54 78 87 171 174 180 188 270 276 285 294 336 342	87 180 270 285	78 87 174 276 294 336 366 372	87 174 276 372	54 87 171 174 276 285 342 372	78 87 174 188 276 294 336 366 372	87 174 276 372
Número promedio de diferencias nucleotídicas: k	2,972	2,343	3,451	1,758	3,667	1,356	1,451
Diversidad nucleotídica: π	0,00766	0,00604	0,00889	0,00453	0,00945	0,00349	0,00374
Índice de Watterson: θ	0,00738	0,00555	0,00973	0,00324	0,00747	0,00373	0,00324
Hap1CytB	40	9	2	10	4	4	11
Hap2CytB	3	0	0	0	3	0	0
Hap3CytB	6	5	1	0	0	0	0
Hap4CytB	3	0	3	0	0	0	0
Hap5CytB	11	0	1	0	1	9	0
Hap6CytB	2	0	0	0	2	0	0
Hap7CytB	4	0	1	0	0	3	0
Hap8CytB	37	1	6	4	3	20	3
Número de haplotipos	8	3	6	2	5	4	2

Tabla 9. Continuación.

	Población total	KUALB	RNLB	SSLB	TAMLB	RNRE	SSRE
Diversidad haplotípica : Hd	0,725	0,562	0,791	0,440	0,833	0,627	0,363
Prueba D de Tajima	0,10307 ¹	0,31791 ¹	-0,34077 ¹	1,31061 ¹	1,04107 ¹	-0,17251 ¹	0,50478 ¹
Prueba Fs de Fu	2,384 ¹	3,221 ¹	0,469 ¹	4,189 ¹	1,508 ¹	1,417 ¹	3,573 ¹

LB = población de línea de base antes del rociado; RE = población re-infestante; KUA= Kuarirenda, RN = Rancho Nuevo, SS = San Silvestre, TAM = Tamachindi

¹ θ Estimado de la tasa de mutaciones en la población

¹ p > 0,05.

La Tabla 10 muestra que existe una diferenciación genética significativa entre varias pares de poblaciones. Las comunidades del sur (Rancho Nuevo y Tamachindi) y las del norte (San Silvestre y Kuarirenda) no se diferencian entre ellas. Las otras comparaciones 2 X 2 muestran diferenciaciones significativas excepto entre Tamachindi y San Silvestre ($p = 0,058$).

Tabla 10. Diferenciaciones genéticas inter poblaciones obtenidas con el mtCytB, basadas sobre las diferencias nucleotídicas (π) entre pares de individuos y expresadas por el valor de F_{st}

	KUALB	RNLB	SSLB	TAMLB	RNRE	SSRE
KUALB		0,00218*	0,10910	0,01871*	0,00000*	0,09761
RNLB	0,21663		0,01168*	0,12741	0,20117	0,00485*
SSLB	0,09263	0,20648		0,05772	0,00020*	0,99990
TAMLB	0,13126	0,04642	0,11160		0,01327*	0,02445*
RNRE	0,33067	0,02439	0,28033	0,12081		0,00000*
SSRE	0,09956	0,27515	-0,06237	0,16005	0,34532	

LB = población de línea de base antes del rociado; RE = población re-infestante; KUA = Kuarirenda, RN = Rancho Nuevo, SS = San Silvestre, TAM = Tamachindi

Valores de F_{st} bajo la diagonal, valores de p encima la diagonal: cada valor de F_{st} esta estadísticamente probado bajo la hipótesis nula de ausencia de diferencia entre poblaciones por permutaciones aleatorias de haplotipos.

* valor de p significativo.

Usando el test exacto se observan diferencias significativas entre las 4 poblaciones de línea de base excepto entre Rancho Nuevo y Tamachindi, las poblaciones más próximas (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de los test exactos de diferenciación inter poblaciones obtenidos con el mtCytB.

	KUALB	RNLB	SSLB	TAMLB	RNRE
KUALB					
RNLB	0,00595 ± 0,0027**				
SSLB	0,03740 ± 0,0028*	0,01145 ± 0,0027*			
TAMLB	0,00450 ± 0,0021**	0,06060 ± 0,0083	0,04055 ± 0,0065*		
RNRE	0,0000 ± 0,0000***	0,02420 ± 0,0020*	0,00030 ± 0,0002***	0,00040 ± 0,0003***	
SSRE	0,04565 ± 0,0026*	0,00395 ± 0,0017**	1,00000 ± 0,0000	0,02320 ± 0,0030*	0,00005 ± 0,0001***

LB = población de línea de base antes del rociado; RE = población re-infestante; KUA = Kuarirenda, RN = Rancho Nuevo, SS = San Silvestre, TAM = Tamachindi

* $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

2.2. Poblaciones re-infestantes

En los pueblos de Rancho Nuevo y San Silvestre se colectaron poblaciones re-infestantes a los 4 y 8 meses (Evaluación Post Vectorial, EPV1 y EPV2, ver Material y Métodos) después del primer rociado con insecticidas. Para el estudio se agruparon estas dos colectas bajo el nombre de re-infestantes.

2.2.1. ITS-2

Se analizaron 13 individuos re-infestantes en la comunidad de San Silvestre y 34 individuos en la comunidad de Rancho Nuevo. La Tabla 6 y la Figura 14 indican la distribución de los 3 haplotipos de ITS-2 encontrados (ver capítulo 1.1 de los resultados) en las poblaciones. Los 3 haplotipos son identificados en la población de re-infestantes de San Silvestre, sin embargo el haplotipo Hap2ITS2 (haplotipo menos frecuente) no es detectado en la población de re-infestantes de Rancho Nuevo. El haplotipo Hap1ITS2 es mayoritario en las poblaciones de re-infestantes de las dos comunidades, como se lo observó en las poblaciones de LB. Las diversidades haplotípica y nucleotídica son ligeramente superiores en la población de re-infestantes de

San Silvestre en comparación a la población de Rancho Nuevo (Tabla 6). En cuanto a las pruebas de neutralidad tampoco son significativas.

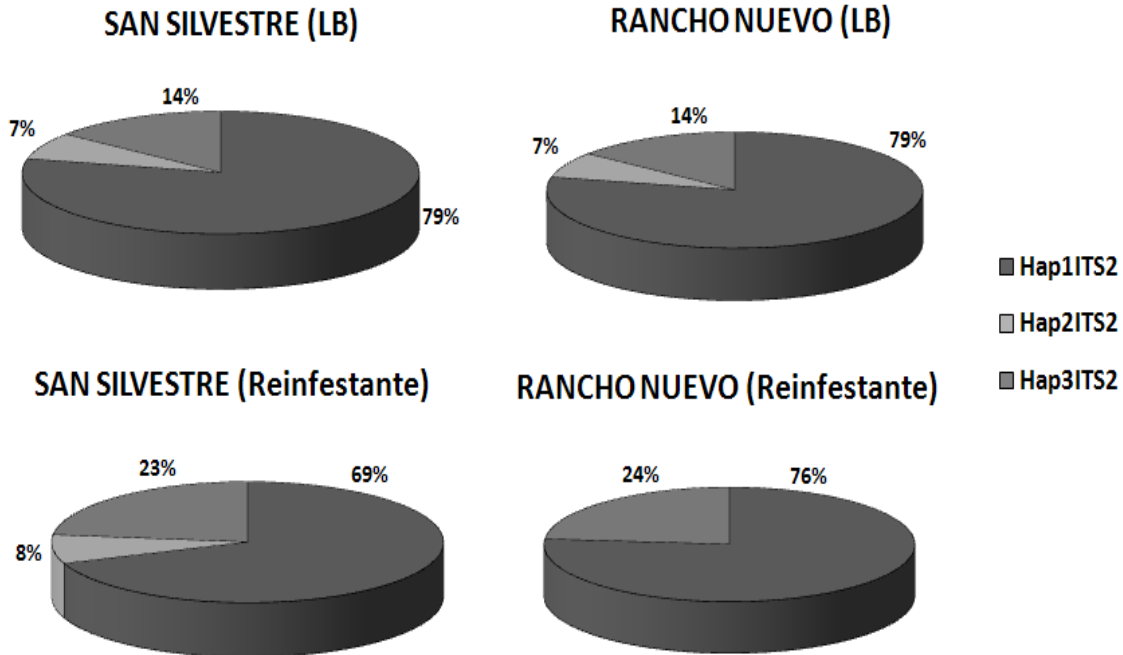


Figura 14. Comparación de la distribución de los 3 haplotipos encontrados, para el marcador ITS-2, en las poblaciones estudiadas de LB con sus re-infestantes correspondientes.

La diferenciación genética estimada por el índice F_{st} entre las poblaciones re-infestantes y las de LB no muestra diferencias significativas entre ninguna de las poblaciones (Tabla 7). El test exacto muestra que la población de re-infestantes de Rancho Nuevo presenta una distribución de haplotipos significativamente diferente a la población de Tamachindi LB (Tabla 8), además muestra que no existe una diferenciación entre las poblaciones re-infestantes con sus respectivas poblaciones línea de base, ni entre ellas (Tabla 8).

2.2.2. mtCytB

De la misma manera que para el marcador ITS-2, se analizaron 14 y 36 individuos re-infestantes en las comunidades de San Silvestre y Rancho Nuevo respectivamente. La Tabla 9 y la Figura 15 indican cómo se distribuyen los 8

haplotipos encontrados (ver capítulo 1.2 de los resultados) en las poblaciones de re-infestantes, donde solamente los haplotipos Hap1CytB y Hap8CytB se observan compartidos entre las poblaciones de re-infestantes de los dos pueblos. Se observa entre las poblaciones re-infestantes y las de LB una disminución de la diversidad haplotípica y nucleotídica (Tabla 9).

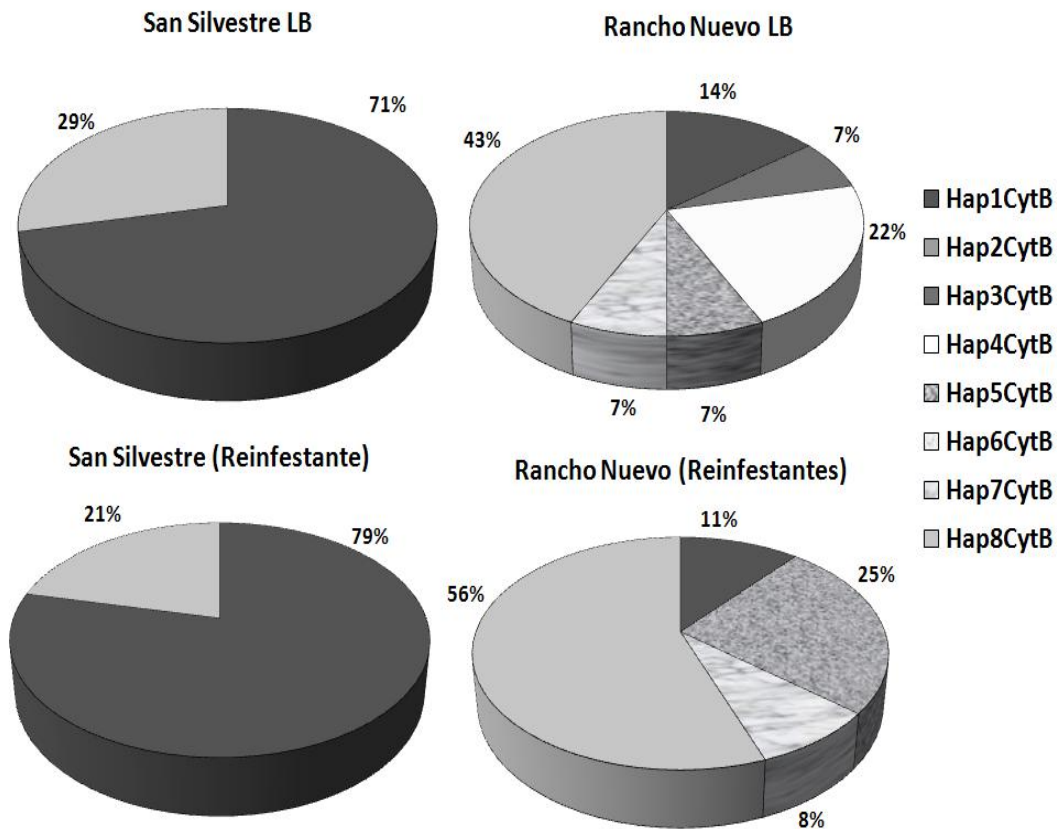


Figura 15. Comparación de la distribución de los haplotipos encontrados, para el marcador mtCytB, en las poblaciones estudiadas de LB y de re-infestantes correspondientes.

Las 2 poblaciones de re-infestantes se diferencian significativamente (Tabla 10 y 11). La población re-infestante de Rancho Nuevo no se diferencia de la población de Rancho Nuevo LB pero si de las otras tres poblaciones LB en cuanto a la diferenciación genética estimada por el índice F_{st} (Tabla 10). La población re-infestante de San Silvestre se diferencia significativamente frente a las poblaciones de Rancho Nuevo LB y re-infestantes y Tamachindi (poblaciones localizadas más al sur), pero no de Kuarirenda y San Silvestre LB. El test exacto de diferenciación de poblaciones (Tabla 11) muestra que la

población de re-infestantes de Rancho Nuevo se diferencia de todas las poblaciones incluyendo la de Rancho Nuevo LB. La población re-infestante de San Silvestre muestra un comportamiento similar a la población re-infestante de Rancho Nuevo, con la diferencia de que esta no presenta diferenciación con la población de San Silvestre LB.

2.3. Análisis AMOVA de la estructuración entre las poblaciones

El análisis AMOVA permite examinar la estructuración inter poblaciones y también, después de una jerarquización de las poblaciones en diferentes grupos, la estructuración entre grupos de poblaciones, entre poblaciones dentro de los grupos y dentro de poblaciones. Para estos análisis se aplicó la distancia de Tamura & Nei (ver material y métodos). El análisis entre poblaciones basado sobre el ITS-2 no detecta diferencias entre ellas, confirmando los resultados generales obtenidos con las comparaciones entre pares de poblaciones ($V_a = -0,01230$, % variación = $-3,48$ $F_{st} = -0,03483$ $p > 0,05$ $gl=5$). Al contrario, con el mtCytB se detecta una estructuración entre las poblaciones ($V_a = 0,54543$, % variación = $33,77$ $F_{st} = 0,33767$ $p < 0,05$ $gl=5$).

Luego se examinó por la prueba AMOVA la estructuración de las poblaciones ubicadas más al norte (Kuarirenda y San Silvestre) y las poblaciones ubicadas más al sur (Rancho Nuevo y Tamachindi). Como se esperaba, con el marcador ITS-2 no se evidenció ninguna estructuración entre los grupos norte y sur ni dentro de cada grupo, el total de la variabilidad fue explicado por la variabilidad dentro de las poblaciones (Tabla 12). Al contrario para el mtCytB, un 34,57% de la variabilidad se explica por diferencias entre los grupos norte y sur pero no existe diferenciación significativa. Se observó una estructuración entre las poblaciones dentro de los grupos pero esta estructuración no explica más que el 8,24% de la variación. La mayor parte de la variación se explica por variabilidad dentro de las poblaciones (57,18%), siendo significativa la diferenciación inter poblaciones (Tabla 13).

Tabla 12: Estructura genética, basada sobre el ITS-2, de las poblaciones agrupadas en norte y sur por el análisis de la variancia molecular AMOVA

Origen de la variación	gl	Suma de los cuadrados σ^2	Componente de variación	% de variación	p	Índices de fijación
Entre grupos ¹	1	0,249	0,00351 Va	1,72	0,11	0,01722
Entre poblaciones intra grupos	4	0,366	-0,00727 Vb	-3,56	0,78	-0,01843
Dentro poblaciones	96	19,934	0,20765 Vc	101,84	0,88	-0,03627

gl: grados de libertad
¹ dos grupos de poblaciones: Poblaciones de KUALB, SSLB y SSRE (Norte), y RNLB, RNRE y TAMLB (Sur).

Tabla 13: Estructura genética, basada sobre el mtCytB, de las poblaciones agrupadas en norte y sur por el análisis de la variancia molecular AMOVA

Origen de la variación	gl	Suma de los cuadrados σ^2	Componente de variación	% de variación	p	Índices de fijación
Entre grupos ¹	1	37,095	0,64681 Va	34,57	0,10	0,34573
Entre poblaciones intra grupos	4	14,348	0,15423 Vb	8,24	0,00	0,42816
Dentro poblaciones	100	106,983	1,06983 Vc	57,18	0,00	0,12600

gl: grados de libertad
¹ dos grupos de poblaciones: Poblaciones de KUALB, SSLB y SSRE (Norte), y RNLB, RNRE y TAMLB (Sur).

Se exploró también la distribución de la variancia por el AMOVA con una subestructuración de las poblaciones, agrupándolas como poblaciones de LB y re-infestantes. Con el marcador ITS-2 no se detectó ninguna diferencia significativa entre ambos grupos ni inter poblaciones dentro de cada grupo (Tabla 14). Para el marcador mtCytB, un muy bajo porcentaje de la varianza total se explicó por diferencias inter grupos ($p = 0,65$) y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, sin embargo se observó una diferenciación entre las poblaciones dentro de los grupos (22,49%) y también entre las poblaciones (81,41%). Para los dos marcadores la mayor varianza es explicada por la alta diversidad encontrada dentro de las poblaciones (Tabla 15).

Tabla 14: Estructura genética, basada sobre el ITS-2, de las poblaciones agrupadas en línea de base y re-infestantes por el análisis de la variancia molecular AMOVA

Origen de la variación	gl	Suma de los cuadrados σ^2	Componente de variación	% de variación	<i>p</i>	Índices de fijación
Entre grupos ¹	1	0,124	0,00077 Va	0,38	0,32	0,00379
Entre poblaciones intra grupos	4	0,490	-0,00567 Vb	-2,80	0,77	-0,02418
Dentro poblaciones	96	19,934	0,20765 Vc	102,42	0,77	-0,02808

gl: grados de libertad
¹ dos grupos de poblaciones: Poblaciones de KUALB, SSLB, RNLB y TAMLB (Línea de base), y SSRE y RNRE (re-infestantes).

Tabla 15: Estructura genética, basada sobre el mtCytB, de las poblaciones agrupadas en línea de base y re-infestantes por el análisis de la variancia molecular AMOVA

Origen de la variación	gl	Suma de los cuadrados σ^2	Componente de variación	% de variación	<i>p</i>	Índices de fijación
Entre grupos ¹	1	1,408	-0,01450 Va	-3,90	0,65	-0,03900
Entre poblaciones intra grupos	4	6,404	0,08361 Vb	22,49	0,00	0,18591
Dentro poblaciones	100	30,263	0,30263 Vc	81,41	0,00	0,21646

gl: grados de libertad
¹ dos grupos de poblaciones: Poblaciones de KUALB, SSLB, RNLB y TAMLB (Línea de base), y SSRE y RNRE (re-infestantes).

VI. DISCUSIÓN

En la región de Izozog se observa una fuerte persistencia de triatominos dentro de las casas a pesar de que toda la región este bajo control vectorial llevado a cabo por el Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia. Frente a esta situación muy preocupante, se desarrolló un programa específico financiado por la agencia canadiense IRDC, para analizar los determinantes biológicos y socioculturales ligados a la re-infestación. En el marco de este programa, pese al rociado de las casas de las 4 comunidades estudiadas, se observó una rápida recolonización (menos de 4 meses) de las viviendas por poblaciones de *T. infestans* y no se pudo controlar esta re-infestación por nuevos rociados. Se observó nuevamente a los 8 meses una importante tasa de infestación en las casas.

Se propuso en la literatura diferentes orígenes de re-infestación: re-infestaciones por poblaciones presentes en el peridomicilio (Cecere et al. 1996), poblaciones residuales de las casas (Dujardin et al. 1996; 1997), poblaciones transportadas de manera pasiva desde pueblos alejados, y además, existe la constante amenaza de las poblaciones silvestre que se encuentran en los alrededores (Noireau F. 2009; Guhl et al. 2009), las cuales podrían colonizar el hábitat por dispersión activa (Schofield et al. 1992, Gürtler 1999).

1. VARIABILIDAD DE ITS-2 EN *Triatoma infestans*

El ITS-2 es un marcador que permite diferenciar especies de triatominos pero también observar divergencias entre poblaciones de diferentes orígenes geográficos dentro de la misma especie, como por ejemplo *T. infestans*. Además este marcador es considerado como un buen reloj molecular que presenta un rango de sustitución de bases de 0,4-1% por 1 millón de años (Bargues et al. 2000; Bargues et al. 2006). Siendo un marcador de evolución lenta, existía la posibilidad de que éste sea poco resolutivo para el propósito de detectar el origen de re-infestantes. Sin embargo, fue analizado para caracterizar, por primera vez, las poblaciones de la región Izozog, siendo un marcador de referencia.

Comparado con trabajos previos (Bargues et al. 2006), en nuestro estudio se observó una mayor variabilidad para este marcador en individuos procedentes de

comunidades relativamente cercanas (< de 40 km). Sin embargo, no se observó diferenciación genética entre las poblaciones capturadas antes y después del rociado (prueba de *F_{st}*, test exacto y AMOVA), salvo una diferencia significativa de frecuencias haplotípicas (test exacto) entre las dos poblaciones más alejadas: Tamachindi (al sur) y Kuarirenda (al norte) (Tabla 8). Así, la ausencia de diferenciación entre las poblaciones no nos permitió concluir sobre el origen de las poblaciones re-infestantes.

Sin embargo, el análisis detallado de los 3 haplotipos identificados en este trabajo y su alineamiento con los haplotipos depositados en el GenBank ha permitido precisar sus relaciones genéticas con los haplotipos ya descritos. Así, el Hap1ITS2 (mayoritario) fue anteriormente descrito por Bargues et al. (2006) como el haplotipo 2 de ITS-2 presente en el haplotipo compuesto GT2A (haplotipo 2 para el ITS-2 y A para el ITS-1), encontrado en varios ejemplares de *T. infestans* procedentes de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay, agrupados en este estudio como *T. infestans* no andino. El haplotipo Hap3ITS2 también ya fue descrito como el haplotipo 1 de ITS-2 en este mismo trabajo, encontrado en 3 haplotipos compuestos (GT1C, GT1A y GT1B) (Bargues et al. 2006) hallados en Bolivia (Valle de Cochabamba), Perú y Chile, en poblaciones consideradas como poblaciones andinas de *T. infestans*. En cuanto al haplotipo Hap2ITS2, este es muy próximo al haplotipo 5 de ITS-2 (incluido en el haplotipo compuesto GT5A, diferenciado por un indel de 2 nucleótidos) correspondiente a un *T. infestans* silvestre del Chaco conocido como dark morph, así como al ITS-2 haplotipo 4 (incluido en el haplotipo compuesto GT4A, diferenciado por un indel de 4 nucleótidos), encontrado en individuos de Argentina, en la Provincia de Santiago del Estero.

Para precisar las relaciones genéticas entre los haplotipos, se elaboró un árbol de Neighbor-Joining en base al alineamiento de las secuencias ITS-2 de GenBank y las identificadas en nuestro trabajo (Anexo 1). A pesar de los bajos valores que sostienen las diferentes ramas del árbol, se observan agrupamientos de haplotipos relacionados al origen geográfico de las poblaciones. Se puede observar que el haplotipo Hap1ITS2 idéntico al haplotipo 2 de ITS2 (Bargues et al. 2006) (previamente citado) y la secuencia depositada por Martínez et al. (2006) procedente de Brasil se agrupan con otro haplotipo encontrado por Marcilla et al. (2001) en individuos del Paraguay, formando un grupo estructurado de poblaciones domésticas de la región del

Chaco. El haplotipo Hap3ITS2, idéntico al haplotipo 1 de ITS2 (Bargues et al. 2006), encontrado en individuos procedentes de Bolivia, Perú y Chile, está más próximo a otro haplotipo descrito por Marcilla et al. (2001) en individuos procedentes del departamento de La Paz correspondiendo a poblaciones domésticas andinas. Siendo formado el tercer grupo por el haplotipo Hap2ITS2, el haplotipo 5 (dark morph, Bargues et al. 2006), el haplotipo 4 (Bargues et al. 2006) de Santiago del Estero (Argentina) y el haplotipo descrito por Martínez et al. (2006) procedente de Brasil (Mart 02), se puede sugerir que ciertos haplotipos identificados en medio doméstico procedentes del Chaco, norte de Argentina y Brasil podrían ser derivados de poblaciones silvestres del Chaco y haberse dispersados hacia el sur y adaptado al domicilio.

Bargues et al (2006), a partir de un muestreo de 34 especímenes, mostró que las poblaciones de *T. infestans* de Argentina, Bolivia y Chile presentaban mayor diversidad para el marcador ITS, el cual incluía al ITS-1 e ITS-2 y el gen de la subunidad ribosomal 5,8S, encontrándose más de 1 haplotipo en cada población y con valores de diversidad haplotípica de 0,667, 0,656 y 0,444 respectivamente, en comparación con poblaciones de otros países (Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay), los cuales presentaban un valor de 1 (poblaciones monomórficas). En este trabajo, considerando solamente el ITS-2, se encontró un valor de diversidad haplotípica total de 0,407, y diversidades parciales por comunidad que oscilan desde 0,343 en la población de Tamachindi hasta 0,621 para la población de Kuarirenda, mostrando que existe una alta diversidad genética en la región Izozog para este marcador.

De manera interesante, se observa que las poblaciones domésticas de la región de Izozog agrupan haplotipos de ITS-2 representativos de la diversidad genética de *T. infestans* que conocemos hasta ahora para este marcador, estando presentes haplotipos relacionados a las poblaciones andinas como no andinas y a poblaciones silvestres del Chaco. Falta entender el origen de esta diversidad tomando en cuenta 2 mecanismos importantes: la domesticación de poblaciones originalmente silvestres (gran plasticidad de *T. infestans*) así como los fenómenos de transporte pasivo por los hombres que permitió a *T. infestans* colonizar extensas áreas.

2. VARIABILIDAD DE mtCytB EN *Triatoma infestans*

Hasta ahora, así como para el marcador ITS-2, no existen muchos trabajos que analizaron la variabilidad genética de poblaciones de *T. infestans* a través de secuencias del citocromo B. La mayor parte de las secuencias depositadas en GenBank son las de triatominos colectados en el departamento de Chuquisaca en Bolivia (Giordano et al. 2005), las cuales fueron comparadas con las secuencias obtenidas en nuestro estudio. Lastimosamente, no se cuenta con las secuencias analizadas por Monteiro et al. (1999), trabajo donde los autores identifican dos grupos de haplotipos para *T. infestans*, uno formado por insectos procedentes de Argentina y Brasil y el otro por insectos de Bolivia procedentes de la zona de Cochabamba y un insecto (dark morph) del Chaco. En nuestro estudio se detectó una gran variabilidad de secuencias mtCytB, observándose la presencia de 8 haplotipos distribuidos en las 4 comunidades del estudio. Se observaron diferencias significativas entre las poblaciones antes del rociado, en particular entre las poblaciones de Rancho Nuevo y de San Silvestre para las cuales se estudiaron también las poblaciones de re-infestantes (análisis F_{st} y prueba exacta). El análisis de las poblaciones de re-infestantes muestra que existen diferencias significativas entre ellas (valores de F_{st} y prueba exacta significativas), pero no se diferencian claramente cada una de las poblaciones correspondientes antes del rociado lo que sugiere que podrían originarse de poblaciones residuales de *T. infestans* en cada comunidad. El análisis AMOVA entre poblaciones antes del rociado y las re-infestantes muestra una ausencia de diferenciación confirmando que las poblaciones de re-infestantes son originarias de la región del Izozog.

Giordano et al. (2005) ya describió la existencia de una gran variedad de haplotipos para el citocromo B, encontrando 7 haplotipos en el norte de Chuquisaca con una variedad haplotípica que oscilaba desde 0 a 0,7 en las provincias estudiadas. En nuestro trabajo se obtuvo una diversidad haplotípica para la población total de 0,725, variando de 0,363 en la población re-infestante de San Silvestre hasta 0,833 en la población de Tamachindi, siendo estos mayores a los encontrados en el trabajo de Giordano et al. (2005). Entre los 8 haplotipos identificados en nuestro estudio, solo dos de ellos fueron anteriormente descritos. El primero es el Hap1CytB (mayoritario en nuestro trabajo) que es idéntico al haplotipo B descrito por Giordano et al. (2005),

siendo el segundo más frecuente. El otro es el Hap8CytB (segundo mayoritario en nuestro trabajo) es idéntico a la clona TI-61 descrita por Assumpcao et al. (2008), pero cuyo origen es desconocido. Al igual que lo observado para el marcador ITS-2, el análisis del mtCytB también exhibe la gran diversidad genética de las poblaciones de *T. infestans* en la región de Izozog.

Sin embargo no se observó estructuración entre las poblaciones más al norte (Kuarirenda y San Silvestre) y las más al sur (Rancho Nuevo y Tamachindi), un resultado no sorprendente porque estos dos grupos no están separados por distancias geográficas significativas. Aplicando la prueba de Mantel proporcionada por el programa GENETIX 4.05 (Belkhir et al. 2004), que permite examinar si dos matrices de datos están correlacionadas, así como la aplicación de matrices de distancias geográficas y distancias genéticas (Kimura 2P, Kimura 1980), no se obtuvo tampoco una correlación significativa ($p > 0,05$). Por tanto, a esta escala geográfica (la mayor distancia entre las poblaciones es de 47 km) no se puede proponer un modelo de diferenciación genética por distancias geográficas.

Para profundizar el estudio de las relaciones genéticas entre los haplotipos del mtCytB identificados en nuestro estudio, se examinó la topología de un árbol tipo Neighbor-Joining construido a partir de las distancias genéticas calculadas entre pares de secuencias (distancia Kimura 2P) (Anexo 2). Los haplotipos Hap1CytB, Hap2CytB, Hap3CytB se agrupan juntos y se apartan de un segundo grupo formado por los demás haplotipos. Los valores de significancia de estos dos grupos son bastante elevados, 0.71 y 0.87 respectivamente. Estos dos grupos podrían originarse de poblaciones originalmente diferenciadas geográficamente (poblaciones andinas y no andinas), algunas de las cuales convergen en la zona del Izozog.

3. ORIGENES DE REINFESTACION POR *Triatoma infestans*

La recolonización por *T. infestans* de áreas tratadas con insecticidas es un problema de salud pública. Se necesita conocer el origen de las re-infestaciones para implementar mejores estrategias para el control de la enfermedad de Chagas. Desde 1996 existen trabajos cuyo propósito es detectar el origen de la re-infestación por *T. infestans*. Cecere et al. (1996, 2002 y 2004), trabajando en varias zona endémicas de

Argentina, mostraron la gran importancia que tiene el peridomicilio en el proceso de re-infestación. Así, observaron que los focos residuales de triatominos se encontraban en árboles (los cuales servían como gallineros) y corrales existentes en el peridomicilio. Otros focos re-infestantes podían originarse de poblaciones preexistentes como las de casas no tratadas con insecticida porque estaban cerradas durante la campaña de rociado. En todos los casos las poblaciones re-infestantes fueron poblaciones de triatominos de origen local. Dujardin, Cardozo y Schofield (1996), a través de un análisis isoenzimático, mostraron que en la región de Vallegrande en Bolivia los orígenes de re-infestación eran poblaciones residuales locales ya que no se encontró una diferencia significativa entre las poblaciones antes y después del rociado con insecticidas. Gürtler (1999), al observar los fenómenos de re-infestación de las casas en el noreste de Argentina, realiza una revisión de la información que se tenía hasta el momento. Se sugiere tomar en cuenta otros factores que pueden estar relacionados a las re-infestaciones. Se observa que las casas con altas tasas de infestación inicial son las primeras en presentar re-infestaciones, además, indica que la no estabilidad del insecticida posiblemente debido a condiciones climáticas de la región, predispone a la baja eficacia de los tratamientos en esta área.

Los presentes resultados del análisis de la variabilidad del citocromo B han permitido inferir un origen local de re-infestación como lo observado en otras comunidades argentinas de la región del Gran Chaco. Sin embargo, a la escala de una comunidad, se puede pensar que el análisis del polimorfismo de microsatélites podría ser más discriminante para precisar los focos originarios de la re-infestación en la comunidad. García et al. (2004) mostraron que la variabilidad encontrada con el uso de microsatélites constituye una herramienta muy útil para el estudio de la estructuración a micro escala de poblaciones de *T. infestans*. Así, por ejemplo, Marcet et al. (2008) estudiaron a poblaciones colectadas en diversos periodos de tiempo (Octubre 2002 y Febrero 2004) en la comunidad de Amamá (Argentina) con marcadores microsatélites, y observaron que la re-infestación era debida a poblaciones de triatominos que se dispersaron de casa a casa a partir de corrales de la misma comunidad.

Dentro de los factores por los cuales los *T. infestans* reaparecen en las comunidades bajo control con insecticidas, uno es el desarrollo de las resistencias a

los insecticidas. En el trabajo de Cecere et al. (2006b) se indica que para el control de poblaciones del peridomicilio en comunidades del noroeste de Argentina se debe utilizar insecticidas a una concentración de 100mg/m². Además los resultados de los trabajos de Picollo et al. (2005) muestran que en regiones tratadas con insecticidas existe una selección de poblaciones resistentes para las cuales se deben incrementar las concentraciones de insecticida con rangos de hasta 50,5 mg/m² (para la deltametrina) y 667,6 mg/m² (para el beta-cyfluthrin). Toloza et al. (2008) muestran también que existen poblaciones resistentes en poblaciones colectadas de Mataral y Sucre (regiones próximas al Chaco o en el Chaco) en Bolivia. En el marco del proyecto IDRC, realizado en paralelo a este estudio, se evaluó el nivel de resistencia de las poblaciones colectadas en las comunidades estudiadas. Se evidenciaron niveles de resistencia a la deltametrina pronunciados pero nuestro estudio muestra una ausencia de selección poblacional por efecto del rociado inicial. La persistencia de la diversidad genética de las poblaciones puede estar relacionada a tratamientos insecticidas anteriores que ya seleccionaron una población que mantiene su diversidad y es ahora resistente o pueden ser las poblaciones de *T. infestans* originalmente resistentes en esta región.

VII. CONCLUSIONES

El objetivo general de este trabajo era determinar de dónde proceden las poblaciones domésticas re-infestantes (post rociado con insecticidas) de *T. infestans*, encontradas en cuatro comunidades de la región de Izozog (Gran Chaco) en Bolivia. Los resultados obtenidos con el marcador ITS-2 no permitieron concluir sobre el origen de las re-infestaciones ya que no se detectó diferenciación genética entre las poblaciones. Por el contrario, con el marcador mtCytB, se pudo identificar que los re-infestantes se originaban de poblaciones residuales de las áreas tratadas y no de poblaciones aledañas. Además, este estudio permitió obtener una primera exploración de la variabilidad y estructura genética de *T. infestans* en esta región, la cual servirá de base para futuros estudios.

Para precisar la dinámica de re-infestación a microescala (dentro del pueblo, entre casas o entre sitios de capturas), se podría ampliar el estudio con un marcador genético más resolutivo (polimórfico) como son los microsatélites, ya descritos para *T. infestans*. Sin embargo, si los marcadores genéticos son útiles para entender la dinámica del vector, los factores causantes de estas re-infestaciones tienen que ser estudiados en el marco de estudios multidisciplinarios de entomología, parasitología, antropología, sociología y genética de poblaciones.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- **Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, and Saunders NC.** (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 18. Pag. 489–522.
- **Ballard W and Whitlock M.** (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. Vol. 13. Pag. 729–744.
- **Bargues MD, Marcilla JA, Ramsey J, Dujardin JP, Schofield CJ and 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*. Vol. 95. Pag. 567-573.
- **Bargues MD, Klisiowicz DR, Panzera F, Noireau F, Marcilla A, Perez R, Rojas MG, O'Connor JE, Gonzalez-Candelas F, Galvão C, Jurberg J, Carcavallo RU, Dujardin JP and 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*. Vol. 6. Pag. 46-62.
- **Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N and Bonhomme F.** (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier.
- **Beltran M and Ayala M.** (2003) Evaluación externa de los resultados serológicos en los bancos de sangre de Colombia. *Revista Panamericana Salud Pública*. Vol.13. Pag. 138-142.
- **Bonaldo M, Souto-Padron T, de Souza W and Goldenberg S.** (1988) Cell-Substrate Adhesion during *Tripanosoma cruzi* Differentiation. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 106. Pag. 1349-1358.
- **Brenière SF, Bosseno MF, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Noel S, Dujardin JP and Tibayrenc M.** (1998) Smallness of the panmictic unit of the *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology*. Vol. 35. Pag. 911-917.
- **Brenière SF, Taveira B, Bosseno MF, Ordoñez R, Lozano-Kasten F, Magallón-Gastélum E, Ouaiissi A and Ramsey J.** (2003) Preliminary results of random amplification of polymorphic DNA among triatominae of the Phyllosoma complexe (Hemiptera Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 98(8). Pag. 1033-1038.
- **Carvalho C, Spata MCD, Coura JR, Garcia ES, Azambuja P, Gonzalez MS and Mello CB.** (2003) In vivo in vitro metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomine vectors *Triatoma pseudomaculata* and

Rhodnius neglectus: short/long-term and comparative study. *Experimental Parasitology*. Vol. 103. Pag. 102-111.

- **Catalá S, Gorla DE, Juárez P, Picollo MI, Panzera F, Noireau F, Rojas Cortes M, Dujardin JP, Zerba E, Vassena C, Perez R, Calderón L, Abrahan L, Hernández ML, Cardozo R, Lopez E, Porcasi X, Moreno M, Schachter Broide J, Gürtler R, Lucero C, Ferrandis I, Calleros L, Ferreiro MJ, Cardozo L, Girotti J, Mijailovski S, Richer W, Kengne P, Perrineau MM, Cahuet A, Fontenille D, Herrera B, Gentile A, Gemio A, Alderete P, Diosque P, Acosta N, Alcaraz P, Llanos A and Uncos A.** (2007) Analytical appraisal, Southern Cone - biological and environmental causes of the spatial structuration in *Triatoma infestans* and the implications for vector control programmes. *Proceedings SSA/EC American Trypanosomiasis Update Workshop*. Pag. 13-18.
- **Cecere MC, Gürtler RE, Canale D, Chuit R and Cohen JE.** (1996) El papel del peridomicilio en la eliminacion de *Triatoma infestans* de comunidades rurales argentinas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. Vol 121. Pag. 1-10.
- **Cecere MC, Gürtler RE, Canale D, Chuit R and Cohen JE.** (2002) Effects of partial housing improvement and insecticide spraying on the reinfestation dynamics of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. *Acta Tropica*. Vol 84. Pag. 101-116.
- **Cecere MC, Vasquez-Prokopec GM, Gürtler RE and Kitron U.** (2004) Spatio-Temporal Analysis of Reinfestation by *Triatoma infestans*, (Hemiptera: Reduviidae) Following Insecticide Spraying in a Rural Community in Northwestern Argentina. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*. Vol 71. Pag. 803-810.
- **Cecere MC, Vasquez-Prokopec GM, Gürtler RE and Kitron U.** (2006a) Reinfestation sources for Chagas disease vector, *T. infestans*, Argentina. *Emerging Infectious Diseases* Vol 12. Pag. 1096-1102.
- **Cecere MC, Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Gurevitz JM, Zárate JE, Zaidenberg M, Kitron U and Gürtler RE.** (2006b) Comparative trial of effectiveness of pyrethroid insecticides against peridomestic populations of *T. infestans*, in northwestern Argentina. *Journal of Medical Entomology*. Vol 43. Pag. 902-909.
- **Del Barco M, Streiger M, Caraballo R, Demonte MA and Gaité L.** (1998) Chagas agudo por transplante renal. *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*. Vol.2. Pag. 19-23.
- **Dobarro D, Gomez-Rubin C, Sanchez-Recalde A, Olias F, Bret-Zurita M, Cuesta-Lopez E, Robles-Marhuenda A, Fraile-Vicente JM, Paño-Pardo JR and Lopez-Sendon J.** (2008) Chagas heart disease in Europe: an emergent disease?. *Journal of Cardiovascular Medicine*. Vol. 9. Pag. 1263-1267.

- **Dorn PL, Melgar S, Rouzier V, Gutierrez A, Combe C, Rosales R, Rodas A, Kott S, Salvia D and Monroy CM.** (2003) The Chagas Vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae), is Panmictic within and Among Adjacent Villages in Guatemala. *Journal of Medical Entomology*. Vol. 40. Pag. 436-440.
- **Dorn PL, Melgar S, Combe C, Rodas A and Monroy CM.** (2004) Analysis of microsatellite markers for population genetic studies of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. In *IX European Multicolloquium of Parasitology EMOP, MEDIMOND*. Vol. 18. Pag. 107-110.
- **Dujardin JP, Bermudez H and Schofield CJ.** (1997) The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Tropica*. Vol. 66. Pag. 145-153.
- **Dujardin JP, Cardozo L and Schofield CJ.** (1996) Genetic analysis of *Triatoma infestans* following insecticidal control interventions in central Bolivia. *Acta Tropica*. Vol. 61. Pag. 263-266.
- **Dujardin JP, Schofield CJ and Tibayrenc M.** (1998) Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. *Medical and Veterinary Entomology*. Vol 12. Pag. 20-29.
- **Dujardin JP, Chávez T, Moreno JM, Machane M, Noireau F and Schofield CJ.** (1999) Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Journal of Medical Entomology*. Vol. 36. Pag. 653-659.
- **Dujardin JP, Schofield CJ and Panzera F.** (2000) Les vecteurs de la maladie de Chagas recherches taxonomiques, biologiques et génétiques. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer. Tomo 24. Bruselas. 102pp.
- **Dujardin JP, Schofield CJ and Panzera F.** (2002) Los Vectores de la Enfermedad de Chagas. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Classe des Sciences naturelles et médicales, N.S., Tomo 25. Fascículo 3, Bruselas. . 189pp.
- **Eding JH and Laval G.** (1999) Measuring genetic uniqueness in livesyock. In *Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources*. Pag. 33-58.
- **Edwards JK. (1998)** Miniprep procedures for the isolation of plant DNA. In: *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman & Hall, London, pp. 22–24.
- **Efron B.** (1979) **Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife.** *The Annals of Statistics*. Vol. 7. Pag. 1-26.
- **Eickbush T and Eickbush D.** (2007) Finely orchestrated movements: Evolution of the Ribosomal RNA genes. *Genetics*. Vol. 175. Pag. 477-485.

- **Ewens WJ.** (1972) The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology*. Vol. 3. Pag. 87-112.
- **Excoffier L, Smouse P and Quattro J.** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. Vol. 131. Pag. 479–491.
- **Excoffier L and Heckel G** (2006) Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics*. Vol. 7. Pag. 745-758.
- **Ferraz AS and Figueiredo JFC.** (1993) Transmission of Chagas disease through transplanted kidney: occurrence of the acute form of the disease in two recipients from the same donor. *Rev. Institute Medicine Tropical*. Vol. 35. Pag. 461-463.
- **Fu X.** (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. Vol. 147. Pag. 915-925.
- **Galvão C.** (2003) A sistemática dos triatomíneos (Hemiptera, Reduviidae), de De Geer ao DNA. *Entomología y vectores*. Vol. 10. Pag. 511-530.
- **García B, Zheng L, Pérez de Rosas A and Segura E** (2004) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Molecular Ecology Notes*. Vol. 4. Pag. 568-571.
- **Gascon J, Bern C and Pinazo MJ.** (2009) Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*. Version online.
- **Gascuel O.** (1997) Concerning the NJ algorithm and its unweighted version, UNJ. *Mathematical hierarchies and biology*. Pag. 149–170.
- **Gentile AG, Sartini J, Campo M and Sánchez JF.** (2004) Efficacy of Fipronil in the control of the peridomestic cycle of *Triatoma infestans* in an area resistant to Deltamethrin. *Cadernos Saúde Pública*. Vol. 20. Pag. 1240-1248.
- **Giordano R, Pizarro JC, Paulk S and 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*. Vol. 100. Pag. 753-760.
- **Goldstein DB and Schlötterer C.** (1999) Microsatellites: Evolution and applications. *Oxford University Press*. New York. 368pp.
- **Guhl F, Pinto N and Aguilera G.** (2009) Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 104. Pag. 71-75.

- **Gürtler RE.** (1999) Monitoreo poblacional de *Triatoma infestans* durante la fase de vigilancia en una comunidad rural del noroeste argentino. *Medicina*. Vol. 59. Pag. 47-54.
- **Gürtler RE, Segura E and Cohen JE.** (2003) Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 9. Pag. 29-32.
- **Gürtler RE et al.** (1996) Host-Feeding patterns of domiciliary *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in northwest Argentina: seasonal and instar variation. *Journal of Medical Entomology*. Vol. 33. Pag. 15-26.
- **Guzmán C, García L, Floriani J, Guerrero S, Torres M, Ramírez C and Velasco O.** (1998) Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Revista Panamericana Salud Pública*. Vol. 4. Pag. 94-99.
- **Hack WH.** (1955) Estudios sobre biología de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae). *Anales del Instituto de Medicina Regional*. Vol. 4. Pag. 125-147.
- **Hall TA.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Ser* Vol. 41. Pag. 95-98.
- **Hey J and Machado C.** (2003) The study of structured populations-new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews*. Vol. 4. Pag. 535-543.
- **Kimura M.** (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular and Evolution*. Vol. 16. Pag. 111-120.
- **Librado P and Rozas J.** (2009) **DnaSP** v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. Vol. 25. Pag. 1451-1452.
- **López N and Jesús R.** (1996) Infectividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* diferenciadas por primocultivo en medio LIT. *Revista Medica ULA*. Vol. 5. Pag. 44-47.
- **Lyman DFE, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM, Dujardin JP and Beard CB.** (1999) Mitochondrial DNA sequence variation among Triatominae vectors of Chagas disease. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* Vol. 60. Pag. 377-386.
- **Marcet PL, Mora MS, Cutrera AP, Jones L, Gürtler RE, Kitron U and Dotson EM.** (2008) Genetic structure of *Triatoma infestans* populations in rural communities of Santiago del Estero, northern Argentina. *Infection, Genetics and Evolution*. Vol. 8. Pag. 835-846.
- **Marcilla A, Barges MD, Ramsey J, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ and 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*. Vol 18. Pag. 136-142.
- **Martínez FH, Villalobo GC, Cevallos AM De la Torre P, Laclette JP, Alexandre-Aguilar R and 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*. Vol 41. Pag. 279-287.
 - **Minoprio P.** (2001) Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches?. *International Journal for Parasitology*. Vol. 31. Pag. 587-590.
 - **Mollinedo S, Laurent B, Dominique S, Postigo J, Santalla J, Salas A, Castillo H, Michel G and Díaz V.** (2005) Chagas Congénito en Bolivia. *Revista Médica*. Vol. 11. Pag. 7-24.
 - **Monteiro FA, Pérez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvão C, Rocha D, Noireau F, Schofield C and Beard CB.** (1999) Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* Populations and its Implication on the Specific Status of *T. melanosoma*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 94. Pag. 229-238.
 - **Moraes H.** (1999) Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 94. Pag. 419-423.
 - **Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G and Pfaller M.** (2005) Microbiología Médica. Elsevier Science. 5 ed. Madrid. Pag 875-877.
 - **Nei M.** (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals Human Genetics*. Vol. 41. Pag. 225-233.
 - **Nei M and Li WH.** (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Vol. 76. Pag. 5269-5273.
 - **Nei M and Tajima F.** (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. Vol. 97. Pag. 145-163.
 - **Nobrega A, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J and Araujo WN.** (2009) Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Acai Palm Fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 15. Pag. 653-655.
 - **Noireau F.** (2009) Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol 104. Pag. 60-64.
 - **Noireau F, Bastrenta B, Catalá S, Dujardin JP, Panzera F, Torres M, Perez R, Galvão C and Jurberg J.** (2000) Sylvatic population of *Triatoma infestans*

from Bolivian Chaco: from field collection to characterization. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol 95. Pag. 119-122.

- **Noireau F, Rojas Cortez MG, Monteiro FA, Jansen AM and Torrico F.** (2005) Can wild *Triatoma infestans* foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts?. *Trends in Parasitology*. Vol 21. Pag. 7-10.
- **Noss A and Leny R.** (2001) Community attitudes towards wildlife management in the Bolivian Chaco. *Oryx*. Vol. 35. Pag. 292-300.
- **OMS.** (2005) Manual de Manejo de Enfermedades Parasitarias Prioritaria en Honduras. AZER impresos. 1 ed. Tegucigalpa. Pag. 59-68.
- **OPS/OMS.** (1999) Treatment of the early chronic phase of Chagas disease in children and adults. Informe de un Grupo de Expertos. Washington D.C.
- **Ouassi A, Guilvard E, Delneste Y, Caron G, Magistrelli G, Herbault N, Thieblemont N and Jeannin P.** (2002) The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *Journal of immunology*. Vol. 168. Pag. 6366-6374.
- **Pacheco RS, Almeida CE, Costa J, Klisiowicz DR, Mas-Coma S and Bargues MD.** (2003) RAPD analyses and rDNA intergenic-spacer sequences discriminate Brazilian populations of *Triatoma rubrovaria* (Reduviidae: Triatominae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. Vol. 97. Pag. 757-768.
- **Panzer F, Pérez R, Panzer Y, Alvarez F, Scvortzoff E and Salvatella R.** (1995) Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Chromosome Research*. Vol 3. Pag. 143-150.
- **Panzer F, Dujardin JP, Nicolini P, Caraccio MN, Rose V, Tellez T, Bermúdez H, Bargues MD, Mas-Coma S O'Connor JE and Pérez R.** (2004) Genomic changes of Chagas disease vector, South America. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 10. Pag. 438-446.
- **Pereira J, Dujardin JP, Salvatella R and Tibayrenc M.** (1996) Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. *Heredity*. Vol 77. Pag. 47-54.
- **Piccinali RV, Marcet PL, Noireau F, Kitron U, Gürtler RE and Dotson EM.** (2009) Genetic variability, population structure and phylogeography of Argentinian and Bolivian *Triatoma infestans* populations based on *COI*. *Journal of Medical Entomology*. Vol. 46. Pag. 796-809.
- **Picollo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidenberg M and Zerba E.** (2005) High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *T. infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from northern Argentina. *Journal of Medical Entomology*. Vol 42. Pag. 637-642.

- **Pinto J.** (2006) The Treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis). *Annals of Internal Medicine*. Vol. 144. Pag. 172-174.
- **Pinto J.** (2009) Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* a suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 39. Pag. 370-375.
- **Pizarro JC, Gilligan L and Stevens L.** (2008) Microsatellites reveal a high population structure in *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *Plos Neglected Tropical Diseases*. Vol. 2. Pag. 1-8.
- **Postan M, Arnaiz MR and Fichera L.** (1999) Respuesta de las células musculares cardíacas a la infección con *Tripanosoma cruzi*. *Medicina*. Vol. 59. Pag. 57-62
- **Rassi A, Luquetti A, Florisval J, Fernandes J, Rassi GG, Rassi-Junior A, Vaz de Mello A and Pinto J.** (2003) Impacto do controle químico extensivo de *Triatoma infestans* a incidência de casos agudos e a prevalência de doença de Chagas. O exemplo de Montalvânia, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 36. Pag. 719-727.
- **Reithinger R, Ceballos L, Stariolo R, Davies C and Gürtler RE.** (2006) Extinction of experimental *Triatoma infestans* populations following continuous exposure to dogs wearing deltamethrin-treated collars. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*. Vol 74. Pag. 766-771.
- **Richer W, Kengne P, Rojas M, Perrineau MM, Cohuet A, Fontenille D and Noireau F.** (2007) Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Tropical Medicine & International Health*. Vol 12. Pag. 759-764
- **Rodríguez A, Silvestre J and Cazorla-Perfetti DJ.** (2009) Chagas disease in Barcelona, Spain. *Acta Tropica*. Vol. 112. Pag. 86-87.
- **Rojas M.** (2007) Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud y Deportes. 1ª ed. 352 p.
- **Saitou NM and Nei M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 4. Pag. 406–425.
- **Schachter-Broide J, Dujardin JP, Kitron U and Gürtler RE.** (2004) Spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) populations from northwestern Argentina using wing geometric morphometry. *Journal of Medical Entomology*. Vol. 41. Pag. 643-649.
- **Schofield CJ.** (1988) Biosystematics of the Tratominae. *En MW Service, Biosystematics of Haematophagous Insects*. Vol. 37. Pag. 285-312.
- **Schofield CJ, Jannin J and Salvatella R.** (2006) The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*. Vol. 22. Pag. 583–588.

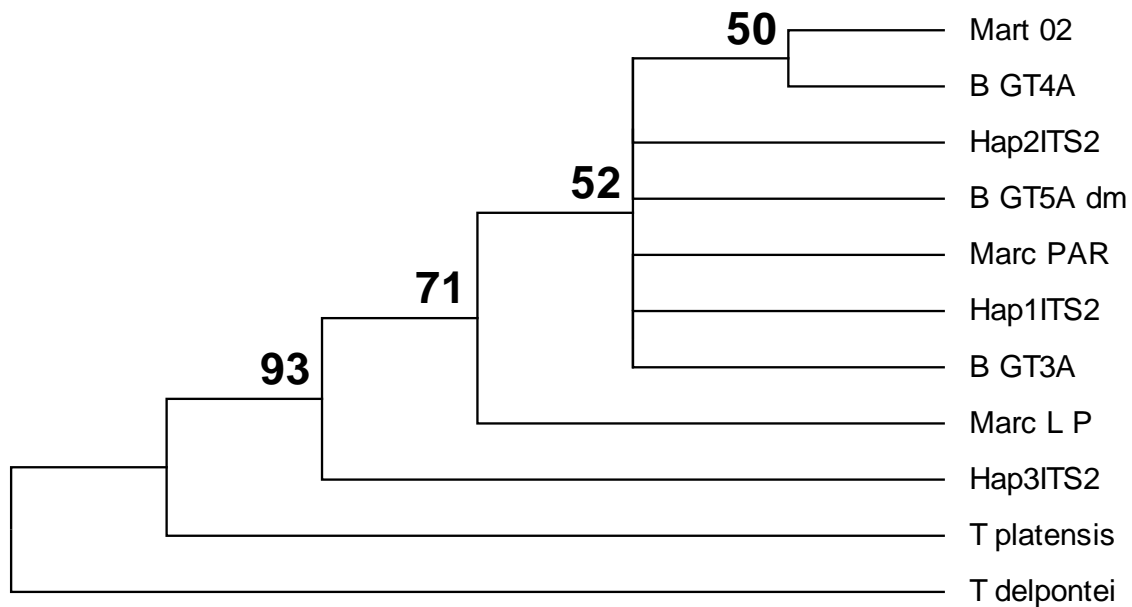
- **Schofield CJ, Lehane MJ, McEwen P, Catala SS and Gorla DE.** (1992) Dispersive flight by *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*. Vol. 6. Pag. 51-56.
- **Segura E.** (2003) Mitos y realidades de la utilización de sangre segura para las transfusiones. *Gaceta Medica Mexicana*. Vol. 139. Pag. S75-S77.
- **Segura E, Torres AG, Fusco O and García BA.** (2009) Mitochondrial 16S DNA variation in populations of *Triatoma infestans* from Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*. Vol. 23. Pag. 34-40.
- **Takezaki N and Nei M.** (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. Vol. 144. Pag. 389-399.
- **Tajima F.** (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*. Vol. 105. Pag. 437-460.
- **Tajima F.** (1989) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*. Vol. 123. Pag. 585-595.
- **Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S.** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. Vol. 24. Pag.1596-1599.
- **Tarleton R, Grusby MJ, Postan M and Glimcher LH.** (1996) *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *International Immunology*. Vol. 8. Pag. 13-22.
- **Tolosa AC, Germano M, Cueto GM, Vassena C, Zerba E and Picollo MI.** (2008) Differential patterns of insecticide resistance in eggs and first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology*. Vol. 45. Pag. 421-426.
- **Torrice RA.** (1946) Hallazgo de *Eratyrus mucronatus*, infestación natural de vinchucas de cerro y *Eutriatoma sordida* en Cochabamba. *Anales Laboratorio Central Cochabamba*. Vol. 1. Pag. 19-23.
- **Usinger RL, Wygodzinsky P, Ryckman R.** (1966) The biosystematics of Triatominae. *Annual Review of Entomology*. Vol. 11. Pag. 309-330.
- **Viotti R, Vigliano C, Armenti H and Segura E.** (1994) Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with longterm follow-up. *American Heart Journal*. Vol. 127. Pag. 151-62.
- **Watterson G.** (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* Vol. 7. Pag. 256-276.
- **Watterson G.** (1978) The homozygosity test after of neutrality. *Genetics*. Vol. 88. Pag. 405-417.

- **Weir BS.** (1990) Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 377 p.
- **Weir BS.** (1996) Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, INC. Publishers, Sunderland, Massachusetts. 283 pp.
- **WHO** (2002) Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. WHO *Technical Report Series*.
- **WHO** (2008) Enfermedad de Chagas: control y eliminación. Informe de Secretaria. WHO *Technical Report Series*.
- **Wood S.** (1964) The laboratory Culture of *Triatoma* (Hemiptera, Reduviidae). *Bulletin World Health Organization*. Vol 31. Pag. 579-581.
- **Wright S.** (1951) The genetical structure of populations. *Annals of eugenics*. Vol. 15. Pag. 323-354.
- **Wright S.** (1965) The interpretation of population structure by F-statistics whit special regard to systems of mating. *Evolution*. Vol. 19. Pag. 395-420.
- **Zerba E.** (1999) Susceptibility and resistance to insecticides of Chagas disease vectors. *Medicina*. Vol. 59. Pag. 41-46.
- **Zu Dohna H, Cecere MC, Gürtler RE, Kitron U and Cohen JE.** (2007) Re-establishment of local populations of vectors of Chagas disease after insecticide spaying. *Journal of Applied Ecology*. Vol. 44. Pag. 220-227.
- **Zu Dohna H, Cecere MC, Gürtler RE, Kitron U and Cohen JE.** (2009) Spatial Re-Establishment Dynamics of Local Populations of Vectors of Chagas Disease. *Plos Neglected Tropical Diseases*. Vol. 3. Pag. 1-11.

Anexo 1

Neighbor-Joining para el ITS-2

Las relaciones genéticas entre haplotipos fueron exploradas por el método de Neighbor-Joining. Se incluyeron para la construcción del árbol filogenético los haplotipos identificados en este trabajo y las siguientes secuencias depositadas en GenBank: *T. infestans* Marcilla La Paz [AJ286874](#); *T. infestans* Marcilla Paraguay [AJ286876](#); *T. infestans* Martínez 02 [AY860388](#); *T. infestans* Bargues GT3A [AJ576052](#); *T. infestans* Bargues GT4A [AJ576053](#); *T. infestans* Bargues GT5A [AJ576055](#), *T. platensis* Bargues GT1A [AJ576061](#) y *T. delponteii* Bargues GT1A [AJ576057](#). La distancia genética fue la de Kimura 2-parameter. Para evaluar el valor de probabilidad de las ramas se aplicó 10000 repeticiones (Botstrap) de construcción de árboles. Se presenta la topología del árbol de manera condensada aplicando un límite de valores de bootstrap de 50%.



Anexo 2

Neighbor-Joining para el mtCytB

Las relaciones genéticas entre los haplotipos identificados en este trabajo fueron exploradas por el método de Neighbor-Joining. Se incluyeron para la construcción del árbol filogenético las secuencias de de *T. brasiliensis* [AY494161](#) y *T. sordida* [AF045730](#) que juegan el papel de grupo externo. La distancia genética fue la de Kimura 2-parameter. Para evaluar el valor de probabilidad de las ramas se aplicó 10000 repeticiones (Botstrap) de construcción de árboles. Se presenta la topología del árbol de manera condensada aplicando un límite de valores de bootstrap de 50%.

