

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA
DEL ARTRÓPODO VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE
CHAGAS EN ZONAS URBANAS Y ALEDAÑAS A LA
CIUDAD DE LA PAZ

Tesis de grado presentada para la obtención del Grado de Licenciatura en Bioquímica

POR: DELMA EUNICE ZAPATA SAAVEDRA

TUTORA: SUSANA REVOLLO ZEPITA, *M. Sc., Ph.D.*

LA PAZ – BOLIVIA
Abril, 2019

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA
DEL ARTRÓPODO VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE
CHAGAS EN ZONAS URBANAS Y ALEDAÑAS A LA
CIUDAD DE LA PAZ

Tesis de grado presentada para la obtención del Grado de Licenciatura en Bioquímica

POR: DELMA EUNICE ZAPATA SAAVEDRA

LA PAZ – BOLIVIA
Abril, 2019



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
BENEMÉRITA Y CENTENARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
 UNIDAD ACADÉMICA ACREDITADA POR EL SISTEMA DE LA UNIVERSIDAD BOLIVIANA 2014-2020
 LA PAZ - BOLIVIA



FCFB./ACTA-TESIS/Nro. 002/2019

ACTA DE DEFENSA DE TESIS

Facultad: *Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas*
 Carrera de: *Bioquímica*
 Postulante: *Zapata Saavedra Delma Eunice*
 Grado Académico: *Licenciatura*
 Lugar de Defensa: *Auditórium Facultativo "Domingo Lorini"*
 Libro: *Nº 1*



En la ciudad de La Paz a hrs. 17:00 del día 5 de abril del 2019, en el Auditórium Domingo Lorini de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas; se hizo presente la **Univ. Zapata Saavedra Delma Eunice con CI. y RU.** para la presentación y defensa de la modalidad de graduación "TESIS DE GRADO" con el tema:

"CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y GENETICA DEL ARTROPODO VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN ZONAS URBANAS Y ALEDAÑAS A LA CIUDAD DE LA PAZ"

Habiendo concluido la exposición, defensa, debate, y absuelto las preguntas en los tiempos establecidos; el tribunal examinador otorga la siguiente calificación final:

Calificación obtenida:

NUMERAL:
 LITERAL:
 VALORACIÓN:

Escala de valoración

Buena	51 a 79
Sobresaliente	80 a 89
Excelente	90 a 100

Concluido el acto de la Defensa de Tesis, se procede a las firmas del tribunal examinador.

Dra. Wilma Strauss Zegada
TRIBUNAL

Dr. Doynet David Guzmán Yapu
TRIBUNAL

Dr. Pablo Alfredo Jrahola Schmeisser
TRIBUNAL

M.Sc. Ph.D. Ma. Susana Revollo Zepita
ASESOR

Dr. Fernando Pinto Guzmán
DIRECTOR DE CARRERA

Dr. Dagoberto Cáceres Paja
VICE DECANO



*En la escala del 1 al 100. De 51 a 79 la valoración es Buena, Aprobado. De 80 a 89 la valoración es Sobresaliente, Aprobado con felicitación y recomendación de publicación. De 90 a 100 la valoración es Excelente, Aprobado con mención honorífica y recomendación de publicación. Oruro. Comité Ejecutivo de la Universidad Boliviana, XI CONGRESO NACIONAL DE UNIVERSIDADES del 15 al 19 de junio de 2009: Reglamento General de Tipos de Modalidades de Graduación, Título I, Capítulo II, Artículo 41. p. 355

Dedicatoria

*A mi mamá Narda y a mi abuela Etelvina
por todo su apoyo, su paciencia
y amor que me dan.*

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Jehová Dios por su cuidado y protección, brindándome fuerza y animo frente a las adversidades de la vida, colocando a las personas correctas en los momentos indicados.

A mi asesora de tesis Dra. Susana Revollo por darme esta oportunidad, por la confianza, por su comprensión, enseñanza, siempre motivándome a pensar en grande para crecer profesionalmente y sobre todo por introducirme al mundo de la investigación.

A doctores que me apoyaron durante este proceso como la Dra. Marcia Gumiel por toda su guía, enseñanza y ayuda incondicional convirtiéndose en una luz en el camino. Dr. Marcelo Jurado por disponer de su tiempo para guiarme en el desarrollo de este trabajo y así poder culminarlo, muchas gracias por todo tu apoyo.

A mis tribunales de tesis como el Dr. Pablo Irahola, Dr. David Gutiérrez por su paciencia en la revisión de esta investigación desde un inicio hasta llegar al trabajo final, por todo su conocimiento impartido

durante la carrera universitaria que me fue de mucho beneficio al realizar esta investigación permitiéndome realizarla con éxito y Dra. Wilma Strauss que fue quien me hizo amar la parasitología y me dio ánimo durante toda la carrera.

También agradezco a la Dra. Vanessa Neiva Lima del Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, por su tiempo y disponibilidad en el secuenciamiento de los productos de PCR.

Agradezco también a la Dra. Ana Gabriela Herrera, responsable del Programa Nacional de Vigilancia y Control de Chagas y a SEDES La Paz, por proporcionar información sobre el control vectorial en el Municipio de Mecapaca.

También agradezco a amigos como Anahí, Narda, Brian, Pame, Marlene, Abel, Melani, Karen y Cristian por su esfuerzo físico acompañándome en las expediciones, por su buena disposición y gracias también a otros que se ofrecieron a ayudar.

Finalmente, y no menos importante agradezco a mi papá Delfor, familiares, amistades cercanas, a Arq. Alejandra Saavedra y a los integrantes del laboratorio de Genética Molecular del Instituto SELADIS por su ayuda brindada y apoyo continuo en diferentes etapas

durante el desarrollo de esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.1.	Justificación.....	2
1.2.	Objetivos	4
1.2.1.	Objetivo General	4
1.2.2.	Objetivos Específicos.....	5
2.	DISEÑO TEÓRICO.....	5
2.1.	Marco Referencial.....	5
2.1.1.	Antecedentes Generales	5
2.1.1.1.	Enfermedad de Chagas	5
2.1.2.	Enfermedad de Chagas en Bolivia	7
2.2.	Marco Teórico	10
2.2.1.	Historia de la Enfermedad.....	10
2.2.1.1.	Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.....	10
2.2.1.2.	Etiología de la Enfermedad de Chagas	14
2.2.1.3.	Rutas de Transmisión de la Enfermedad de Chagas.....	16
2.2.1.3.1.	Transmisión Vectorial	16
2.2.1.3.2.	Transmisión Transfusional de Sangre	17
2.2.1.3.3.	Transmisión por Trasplante de Órganos	18
2.2.1.3.4.	Transmisión por Vía Oral.....	18
2.2.1.3.5.	Transmisión Congénita	19
2.2.1.3.6.	Transmisión Accidental.....	19
2.2.1.4.	Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad de Chagas.....	20
2.2.1.4.1.	Diagnóstico y Tratamiento para la Enfermedad de Chagas....	21
2.2.2.	Los Triatomínicos como Vectores de la Enfermedad de Chagas.....	24
2.2.2.1.	Ciclo de Vida de los Triatomínicos.....	28
2.2.2.2.	Dispersión de Triatomínicos	30
2.2.2.2.1.	Dispersión Activa	30

2.2.2.2.2.	Dispersión Pasiva	31
2.2.2.3.	<i>Triatoma infestans</i> (Klug, 1834)	32
2.2.2.3.1.	Estudios de la Morfología Externa.....	35
2.2.2.3.2.	Adaptación y Cambio Climático	38
2.2.3.	Análisis de la Estructura de poblaciones a través de Secuencias de DNA	39
2.2.3.1.	Marcadores Genéticos	40
2.2.3.1.1.	Secuencia Interna Ribosomal (ITS-2).....	40
2.2.3.1.2.	Gen Mitocondrial Citocromo B (mt Cyt B).....	40
3.	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS.....	41
4.	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	42
5.	DISEÑO METODOLÓGICO	42
5.1.	Población en estudio, ámbito y periodo de investigación	42
5.2.	Recolección de Triatominos	44
5.3.	Procedimiento en el Laboratorio.....	44
5.3.1.	Estudio Morfológico	44
5.3.2.	Extracción de DNA de los Triatominos	45
5.3.2.1.	Extracción con CTAB.....	45
5.3.2.2.	Extracción semiautomatizada mediante el equipo Thermo Scientific KingFisher	46
5.3.3.	Cuantificación de DNA	47
5.3.4.	Amplificación por PCR de los genes.....	47
5.3.5.	Secuenciación de los productos de PCR	48
5.3.6.	Análisis de las Secuencias.	49
6.	RESULTADOS	51
6.1.	Recolección de Triatominos	51
6.2.	Estudio Morfológico	51
6.2.1.	Determinación de tasa de infección con <i>Trypanosoma cruzi</i>	52

6.3.	Extracción de DNA, amplificación y selección de muestras para el análisis.....	53
6.4.	Variabilidad genética de individuos de <i>Triatoma infestans</i> procedentes del Municipio de Mecapaca (Huayhuasi, Yanari y Huajchilla)	53
6.5.	Test de neutralidad selectiva Tajima's D en tres comunidades del Municipio de Mecapaca (Huayhuasi, Yanari y Huajchilla).....	54
6.6.	Análisis filogenético de <i>Triatoma infestans</i> mediante árboles y redes	55
6.6.1.	Gen Mitocondrial Cyt B.....	55
7.	DISCUSIÓN.....	58
7.1.	Estudio morfológico, tasas de infección, factor de riesgo por crecimiento de la región metropolitana y su efecto en la salud	58
7.2.	Variabilidad genética de individuos de <i>Triatoma infestans</i> procedentes del Municipio de Mecapaca (Huayhuasi, Yanari y Huajchilla)	60
7.2.1.	Variabilidad genética mediante el marcador ITS-2.....	61
7.2.2.	Variabilidad genética mediante el marcador mt Cyt B	62
7.3.	Análisis Filogenético de <i>Triatoma infestans</i> mediante Árboles y Redes..	62
8.	CONCLUSIONES	65
9.	BIBLIOGRAFÍA	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución de la Enfermedad de Chagas.	82
Figura 2 Número estimado de inmigrantes con infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> que viven en países no endémicos..	82
Figura 3 Control vectorial de <i>Triatoma infestans</i> en Municipios..	83
Figura 4 Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	84
Figura 5 Distribución geográfica de los seis principales vectores triatomíneos de la Enfermedad de Chagas.....	85
Figura 6 Ciclo biológico de la vinchuca (<i>Triatoma infestans</i>).....	86
Figura 7 Tipos de dispositivo oral: A - hematófago, B depredador - C – fitófagos..	86
Figura 8 Comparación de Cabeza de un Triatomíneo.....	87
Figura 9 Comparación Posición del tubérculo antenífero.....	87
Figura 10 Componentes del Tórax.....	88
Figura 11 Abdomen de la hembra.....	88
Figura 12 Ubicación del área de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia	89
Figura 13 Trampeo y captura de triatominos, mediante trampas Noireau	90
Figura 14 Triatominos capturados en: Huayhuasi, Yanari y Huajchilla.	90
Figura 15 Especímenes capturados clasificados por estadio hallados en: Huayhuasi, Yanari y Huajchilla, Mecapaca, La Paz- Bolivia.....	91
Figura 16 Triatominos recolectados en diferentes ambientes en poblaciones de Mecapaca, La Paz- Bolivia..	91

Figura 17 Morfología de triatominos en fase adulta.	92
Figura 18 Comparación morfológica de estadios ninfales capturados.	92
Figura 19 Comparación morfológica de cabeza de estadios ninfales capturados.	93
Figura 20 Morfología de triatolino hallado con diferencias externas.	93
Figura 21 Árbol por haplotipos establecido mediante el gen mt Cyt B utilizando el algoritmo de Maximum Likelihood	94
Figura 22 Red haplotípica mediante el marcador mt Cyt B.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Variables Estudiadas.	42
Tabla 2 Clasificación de Triatominae.	96
Tabla 3 Localización geográfica e infestación en comunidades investigadas	97
Tabla 4 Individuos de <i>Triatoma infestans</i> , según Estadio	99
Tabla 5 Infección en por <i>Trypanosoma cruzi</i>	100
Tabla 6 Número de secuencias utilizadas para cada análisis	101
Tabla 7 Índices de variabilidad de genes estudiados.....	101
Tabla 8 Origen geográfico de poblaciones de <i>Triatoma infestans</i> estudiadas	102
Tabla 9 Haplotipos hallados con marcador mt CytB	111

ANEXOS

Anexo 1 Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia.	112
Anexo 2 Comportamiento de infestación: Planilla de Evaluación Entomológica	120
Anexo 3 Áreas exploradas: sitios de trampeo (silvestre, doméstico y peridoméstico)..	122
Anexo 4 Búsqueda de triatominos: sitios estratégicos.....	123
Anexo 5 Hoja de georreferenciación	124
Anexo 6 Clasificación de insectos recolectados a través de estéreo microscopio: Estadios ninfales N1, N2, N4, N5.....	125
Anexo 7 Proceso de extracción de DNA de triatominos	126
Anexo 8 Protocolo de PCR y condiciones de temperatura para el marcador mt Cyt B	126
Anexo 9 Protocolo de PCR y condiciones de temperatura para el marcador ITS-2.....	127
Anexo 10 Protocolo de Kit de purificación de DNA.....	128
Anexo 11 Revisión de la calidad de las secuencias mediante el uso del software Chromas 2.6.5 (Technelysium)	129
Anexo 12 Alineamiento y edición de todas las secuencias mediante software BioEdit 7.0.4.1.....	129
Anexo 13 Distancia entre sitios de trampeo positivos.	130
Anexo 14 Distancia entre sitios de captura y la Ciudad de La Paz, Mallasa.....	131

RESUMEN

Los resultados de trampeo y captura de triatomíneos en áreas silvestres, peridomésticas y domésticas y análisis de la estructura genética de poblaciones urbanas del Municipio de Mecapaca cercanas a La Paz, dan cuenta de la propagación del insecto vector de la enfermedad de Chagas desde poblaciones geográficamente bajas del mencionado Municipio hacia poblaciones cercanas a la ciudad de La Paz y geográficamente altas debido al importante número de triatomíneos hallados (101 especímenes). Lo relevante de este estudio fue el hallazgo de triatomíneos caracterizados morfológicamente como *Triatoma infestans* en área peridoméstica de la población de Huajchilla, distante solo a 20 km desde la ciudad de La Paz; en esta locación fue hallado un triatomíneo en tercer estadio ninfal con morfología que difería a las de estadios ninfales normales de *Triatoma infestans*, lo cual probablemente demostraría la hipótesis de que el insecto estaría adaptándose a nuevas condiciones de hábitat. En esta misma población se encontró un haplotipo anteriormente hallado únicamente en una población más al sur, denotando un flujo de estas poblaciones a nuevas regiones. Adicionalmente se hicieron estudios para la determinación de variabilidad genética de estos especímenes, evidenciando que sufrieron una pérdida de la variabilidad genética, seguido de un crecimiento acelerado de la población junto a una acumulación de mutaciones. Los hallazgos genéticos y las observaciones morfológicas podrían ser indicios de nuevos patrones de distribución geográfica, ecológica y cambios ambientales, como el aumento de temperatura que potenciaría la dispersión y proliferación más extensa de los vectores, lo cual genera un riesgo potencial en la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en poblaciones urbanas cercanas a la ciudad de La Paz.

Palabras claves: *Enfermedad de Chagas, Triatoma infestans, Genética de poblaciones, Filogeografía, Cambio climático, Riesgo epidemiológico*

SUMMARY

The results of trapping and capture of triatomines in wild, peridomestic and domestic areas and analysis of the genetic structure of urban populations in the Municipality of Mecapaca near La Paz, account for the spread of the vector insect of Chagas disease from geographically low populations of the mentioned municipality towards populations near the city of La Paz and geographically high due to the important number of triatomines found (101 specimens). The relevant aspect of this study was the finding of triatomines morphologically characterized as *Triatoma infestans* in the peridomestic area of the Huajchilla population, distant only 20 km from the city of La Paz; In this location, a triatomine was found in the third nymphal stage with morphology that differed from those of normal nymph stages of *Triatoma infestans*, which would probably demonstrate the hypothesis that the insect would be adapting to new habitat conditions. In this same population, a haplotype previously found only in a population further to the south was found, denoting a flow of these populations to new regions. Additionally, studies were carried out to determine the genetic variability of these specimens, showing that they suffered a loss of genetic variability, followed by an accelerated population growth together with an accumulation of mutations. The genetic findings and the morphological observations could be indications of new patterns of geographical, ecological and environmental changes, such as the increase in temperature that would favor the dispersion and more extensive proliferation of the vectors, which generates a potential risk in vector transmission. Chagas disease in urban populations near the city of La Paz.

Keywords: *Chagas disease, Triatoma infestans, Population genetics, Phylogeography, Climate change, Epidemiological risk*

1. Planteamiento del problema

El acelerado crecimiento urbano fundamentalmente en los países en desarrollo está teniendo un profundo efecto en la salud global, lo cual está convirtiendo a las ciudades en centros importantes para la transmisión de enfermedades infecciosas, como lo demuestran las pandemias recientes (Alirol et al., 2011).

Bolivia, particularmente la ciudad de La Paz se enfrenta a un inevitable crecimiento demográfico debido a migraciones campo-ciudad, generando una urbanización acelerada en los últimos años. La problemática radica en que, al ampliarse la región metropolitana mediante la urbanización, aumenta la densidad de personas, de animales domésticos y peridomésticos que adicionalmente junto a la elevación de temperatura ocasionada por el cambio climático, crean condiciones que potencian la propagación y proliferación de diversos vectores de enfermedades endémicas en hábitats no naturales (Carcavallo, 1999; Levy, et al., 2014).

Por lo tanto, se realizó un análisis morfológico y genético del insecto vector de la enfermedad de Chagas, para identificar posibles cambios en poblaciones domésticas, silvestres y peridomésticas determinando así los posibles factores de adaptación del vector de la enfermedad de Chagas en zonas urbanas cercanas a la ciudad de La Paz.

Este trabajo responderá las siguientes preguntas de investigación:

¿A qué altitud geográfica se han dispersado las poblaciones de triatomos capturados en el Municipio de Mecapaca?

¿Qué características morfológicas propias de la especie se mantienen y cuáles son los posibles cambios de los especímenes hallados en las zonas urbanas en altitudes por encima de los 3000 m s.n.m.?

¿Cuál es la importancia de examinar la estructura genética de insectos vectores de la enfermedad de Chagas?

¿Cuánta variabilidad nucleotídica y haplotípica existirá en las poblaciones de triatominos capturados?

¿Cuáles son los factores que determinan la existencia de triatominos en zonas urbanas y aledañas a la Ciudad de La Paz?

1.1. Justificación

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria crónica, causada por *Trypanosoma cruzi*. Se transmite a los seres humanos por las heces de vectores hematófagos denominados triatominos, los cuales por contacto de la piel abierta o de las mucosas con las heces infectan al individuo; esta enfermedad también se puede transmitir a través de transfusión sanguínea o por vía transplacentaria (PAHO, 2016).

La enfermedad de Chagas es crónica ya que puede permanecer entre 20 y 30 años en el cuerpo sin manifestarse, permaneciendo generalmente en el músculo cardíaco y digestivo (Oliva, 2015).

El vector principal de esta enfermedad en el país es *Triatoma infestans*, el cual tiene un control vectorial desde el año 1999, mediante campañas de fumigación en viviendas, contándose con la participación comunitaria dentro de los Municipios de las

zonas endémicas (Programa Nacional de Vigilancia y Control Integral de la Enfermedad de Chagas, 2015).

El 23 de marzo de 2006 se promulgo en Bolivia la Ley de Chagas No. 3374, que declara la prioridad nacional, de prevenir y luchar contra el mal de Chagas en todos los Departamentos del país. (<https://www.lexivox.org>)

En el año 2011, una comisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró al Departamento de La Paz libre de infestación de *Triatoma infestans* intradomiciliaria, vectores que portan el parásito *Trypanosoma cruzi*, que producen el mal de Chagas (PAHO, 2011).

Sin embargo, estudios realizados en valles de La Paz dilucidaron que los focos de infección no son de exclusividad doméstica, encontrando que poblaciones silvestres de *Triatoma infestans* tienen una dispersión más grande (Buitrago et al., 2010). Conduciendo a la persistencia de *Triatoma infestans*, pese al control llevado a cabo todos estos años, manifestando que su eficacia es interrumpida por la posible re-infestación de viviendas y áreas peridomiciliares por poblaciones silvestres existentes, generando dificultad en el control total de estos vectores (Brenière et al., 2013).

Esta persistencia vectorial en valles de La Paz se complica por el crecimiento demográfico actual de la ciudad de La Paz, porque la rápida urbanización de estas zonas aledañas genera una mayor densidad poblacional y establece un microambiente propicio para el vector, creando condiciones de propagación de la enfermedad en vez de reducir su transmisión. (Levy et al., 2014). Asimismo, Aparicio (2013) afirma que la urbanización expone a poblaciones humanas al cambio climático y al impacto de la variabilidad del clima. Lo que favorece la proliferación de vectores de enfermedades endémicas, como la enfermedad de Chagas (Carcavallo, 1999; Medone et al., 2015).

Siendo la temperatura un factor de importancia en la distribución geográfica de diferentes especies triatomíneos (Gorla, 2002; de la Vega et al., 2015), observándose también que, en zonas geográficas con altas temperaturas, los insectos vectores pueden aumentar la cantidad de generaciones por año (Neiva, 1913; Hack, 1955). Adicionalmente, estudios demostraron que, pese a que la mayoría de las especies se encuentran en áreas tropicales y subtropicales y altitudes que varían de 100 m s.n.m. a 1.800 m s.n.m., la especie vectorial más importante, *Triatoma infestans*, se encuentra en altitudes más altas (Carcavallo, 1999).

Estos factores ambientales, la creciente urbanización junto a la capacidad que tienen los insectos vectores de la enfermedad de Chagas a adaptarse a diferentes y nuevos hábitats humanos, incluso en altitudes elevadas, podrían significar incluso cambios morfológicos, generándose un riesgo epidemiológico para los habitantes de la ciudad La Paz y la creciente región metropolitana del Departamento de La Paz.

Por estas razones, se realizó el estudio en zonas urbanas del Municipio de Mecapaca ubicado a 20 Km de la ciudad de La Paz con una altitud por encima de los 3.000 m s. n. m., contribuyendo de esta manera a la salud pública.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Caracterizar morfológica y genéticamente al vector de la enfermedad de Chagas que está circulando en zonas urbanas del Municipio de Mecapaca cercanas a la ciudad de La Paz.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la altitud geográfica, a la que se han dispersado las poblaciones de triatominos capturados en el Municipio de Mecapaca.
- Identificar morfológicamente los triatominos hallados a través de características propias de la especie y posibles cambios.
- Analizar las secuencias de los triatominos capturados, con marcadores genéticos de un gen mitocondrial y un gen nuclear.
- Examinar la estructura genética de poblaciones de los triatominos capturados.
- Determinar la variabilidad nucleotídica y haplotípica de las diferentes poblaciones de triatominos, así como su distribución.
- Evaluar los factores de adaptación del vector de la enfermedad de Chagas en zonas urbanas cercanas a la ciudad de La Paz.

2. Diseño Teórico

2.1. Marco Referencial

2.1.1. Antecedentes Generales

2.1.1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Es una parasitosis endémica en América Latina encontrándose alrededor de 21 países afectados (Figura 1) y se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas según informes emitidos en febrero 2018 por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2018).

La enfermedad, que puede ser mortal, conduce a menudo a lesiones muy debilitantes del corazón y tracto intestinal. Se estima que hasta el 30% de las personas desarrollarán una enfermedad cardíaca crónica, mientras que hasta el 10% desarrollarán alteraciones digestivas, neurológicas o mixtas que pueden requerir un tratamiento específico. (PAHO, 2007; WHO, 2018). Su agente causal, un protozoo flagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, es clásicamente transmitido por vectores hematófagos de la subfamilia Triatominae, llamados comúnmente “vinchucas” en Bolivia. (Noireau, 1999).

La enfermedad de Chagas, reconocido por la OMS como una de las 13 enfermedades tropicales desatendidas del mundo (Hotez et al., 2007), tiene una diversidad de formas de transmisión, características parasitarias, patología clínica y reservorios.

Se relaciona con el desarrollo económico y social, es decir, que mientras América Latina continúe teniendo viviendas inadecuadas, migración de personas y rápida urbanización sin previo saneamiento, esta enfermedad seguirá en prevalencia (WHO, 1991). Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado casos asociados a esta enfermedad en países no endémicos como Estados Unidos de América y países

Europeos (Figura 2). Esto debido al incremento migratorio entre América Latina y el resto del mundo (WHO, 2012).

En América Latina la participación del hombre en la cadena epidemiológica de la enfermedad se inició cuando éste invadió el ambiente silvestre, edificando viviendas con paredes de barro o madera llenas de grietas y techo vegetal, ofreciendo el biotopo apropiado a triatominos que huían de su medio natural amenazado por la reducción gradual de la fauna silvestre (Noireau, 1999). Por ello, para el control eficaz de la Enfermedad de Chagas, se implementaron programas para eliminar los vectores, para el diagnóstico de la infección y para el control obligatorio en los bancos de sangre que previene la infección a través de la transfusión y el trasplante de órganos (WHO, 2018).

2.1.2. Enfermedad de Chagas en Bolivia

En Bolivia, existen tres regiones que presentan la enfermedad de Chagas: Amazonía, Valles Interandinos y el Chaco Boliviano. El área endémica en el país abarca 6 de los 9 departamentos con una aproximación del 60% del territorio, siendo los más afectados los departamentos de Tarija, Chuquisaca, Cochabamba, Santa Cruz y parcialmente Potosí y La Paz (Albarracín, 2012).

El conocimiento de esta enfermedad en el país data desde tiempos pre coloniales, los Triatominos eran conocidos por los nativos, pero los llamaban “vinchucas” que deriva de la palabra quechua “huichucuy” que se traduce como “dejarse caer” (Guillén, 2002). Durante la colonia, el sacerdote Fray Reginaldo de Lizarraga, en sus viajes de inspección de conventos de la región, notó que, en los valles de Cochabamba, existían insectos chupadores de sangre como cucarachas, que eran llamados "vinchucas", las

cuales durante la noche caían desde los techos de las casas mientras la gente estaba durmiendo, particularmente en la cara y otras partes expuestas del cuerpo (De Lizarraga, 1928).

Las investigaciones en Bolivia relacionadas con la enfermedad de Chagas, comenzaron en 1916, mediante el investigador brasileño Artur Neiva, quien encontró triatomos infectados en la Localidad de Sococha, un pequeño pueblo del Departamento de Potosí cercano a la frontera con Argentina (Dias y Torrico, 1939). Salvador Mazza entre 1937 y 1943, realizó expediciones a varias regiones de Bolivia descubriendo triatomos infectados de la especie *Triatoma infestans*, encontrando una niña de 2 años infectada con *Trypanosoma cruzi* (Telleria y Tibayrenc, 2010).

El doctor Rafael Torrico aportó un gran conocimiento inicial realizando varios estudios sobre la enfermedad de Chagas. En 1943, Torrico y Dias publicaron una investigación relacionada con triatomos infectados de la especie *Triatoma infestans* en varias ciudades de Cochabamba (Dias y Torrico, 1943). En 1946, Torrico describió el primer caso en Bolivia de forma aguda de la enfermedad de Chagas en el departamento de Cochabamba, era una niña de 14 años que tenía un edema en el párpado debido a la picadura en dicho sitio. En el área donde vivía la paciente, Torrico encontró que el 84.9% de 427 insectos de la especie *Triatoma infestans* que estaban infectados con *Trypanosoma cruzi* (Torrico, 1946). Paralelamente Ponce, publicó un estudio de casos de la enfermedad de Chagas confirmados por xenodiagnóstico provenientes de la ciudad de Colcapirhua, Cochabamba (Ponce, 1946). El año 1949, Torrico presentó un trabajo sobre el conocimiento de la enfermedad de Chagas en Bolivia, indicando que *Triatoma infestans* era el principal vector de la enfermedad y el más importante por su alto índice de infección, su prevalencia y amplia distribución, el cual predominaba en la región de

los valles. Afirmando que los animales domésticos fueron los únicos reservorios de *Trypanosoma cruzi* conocidos, especialmente en casas rurales (Torrico, 1949).

En Bolivia al igual que en otros países sudamericanos *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) es el principal vector de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas (Dias et al., 2007). Los estudios acerca de esta enfermedad no se frenaron, es más se ampliaron y estudios actuales muestran que, en el departamento de La Paz, los vectores de la Enfermedad de Chagas son: *Triatoma infestans*, *Triatoma sordida*, *Triatoma guasayana*, *Eralyus mucronatus*, *Microtriatoma trinidadensis*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus megistus*, *Panstrongylus rufotuberculatus*, *Rhodnius stall*, *Rhodnius robustus* y *Triatoma sp.* (Vidaurre, 2016). Pero cabe resaltar que, en los valles de La Paz, se encontraron poblaciones silvestres de *Triatoma infestans*, donde persiste la transmisión de *Trypanosoma cruzi*, con una amplia distribución. Este hallazgo de *Triatoma infestans* es importante ya que fue encontrado en entornos nunca antes descritos como hábitats de esta especie (colinas espinosas, campos de higos espinosos, barrancos, muros fronterizos, ruinas y grietas profundas formadas por la erosión), sugiriendo la existencia de una distribución continua de poblaciones silvestres en los valles de La Paz. (Buitrago et al., 2010). Estudios posteriores realizados con microsatélites, que son marcadores genéticos hipervariables, mostraron la ausencia de diferenciación significativa entre poblaciones de *Triatoma infestans* recogidos en ambientes intra-peridoméstico y salvajes, mostrando que poblaciones intra-peridomésticas y silvestres cercanas pueden estar compuestas de miembros que son genéticamente muy similares. Los análisis sobre la base de la secuencia mitocondrial mostraron haplotipos compartidos entre poblaciones de *Triatoma infestans* salvajes y domésticos, indicando un origen común entre ellos (Brenière et al., 2013).

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Historia de la Enfermedad

Carlos Chagas (1879-1934) descubrió la tripanosomiasis americana en 1909, una enfermedad que posteriormente recibió su nombre. En 1908, durante una campaña contra el paludismo Carlos Chagas fue informado de grandes insectos chupadores de sangre que vivían en masa en viviendas locales y mordían a las personas mientras dormían. Por ello diseccionó a este insecto y encontró numerosos tripanosomas en su intestino posterior, a los que llamó *Trypanosoma cruzi* en honor de su mentor, Oswaldo Cruz (1872-1917). En 1909 tras el examen a una niña de dos años con agrandamiento del bazo, el hígado y ganglios linfáticos inflamados se pudo observar numerosos tripanosomas en su sangre. Es así como Chagas había descubierto una nueva enfermedad humana que pronto llevó su nombre. Carlos Chagas dio una descripción clínica detallada de la fase aguda de la enfermedad y relacionó la infección con algunos síntomas crónicos de la enfermedad, lo cual fue notable, considerando que la fase crónica de la tripanosomiasis americana generalmente aparece décadas después de la primera inoculación con *Trypanosoma cruzi* (Steverding, 2014).

2.2.1.1. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas

Tradicionalmente la enfermedad de Chagas se limitó a zonas rurales pobres de Sudamérica y Centroamérica, transmitida a través de vectores, siendo la población más

vulnerable personas con viviendas precarias. No obstante, la enfermedad se propagó a nuevas zonas no afectadas, zonas urbanas, a causa de la migración interna de las zonas rurales a zonas urbanas, la transmisión congénita y la donación de sangre (Bowman et al., 2008; Schmunis, 2007). Convirtiéndose en un problema de salud mundial debido al flujo migratorio hacia países desarrollados (Schmunis y Yadon, 2010).

Como indica Schmunis (2007), las estimaciones de prevalencia informadas muestran que en Australia en 2005-2006, 1067 de los 65.255 inmigrantes latinoamericanos (16 por 1000) pueden estar infectados con *Trypanosoma cruzi*; en Canadá, en 2001, 1218 de los 131.135 inmigrantes (9 por 1000) están infectados. En Estados Unidos, se sugiere que hay más de 300.000 personas están infectadas siendo en su mayoría migrantes mexicanos; en este país el año 2007 se detectaron más de 500 donantes con infección por *Trypanosoma cruzi*, de los cuales solamente alrededor de un 11% de donantes positivos realizaron consultas para tratamiento de la enfermedad (Stimpert y Montgomery, 2010). En Europa se tiene una prevalencia estimada de 4,2%, siendo una mayor prevalencia en migrantes de Bolivia con un 18,1% (Requena-Mendez, 2015).

En Latinoamérica se tomaron medidas eficaces para control de bancos de sangre y eliminación de los vectores desde principios de la década de los 90, siendo evidente el descenso de la prevalencia y transmisión vectorial en la región. A pesar de ello, la transmisión por vía oral aumentó en la región amazónica (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012) y se observa en el noreste de Argentina una resistencia moderada del vector a los piretroides (Gurevitz et al., 2013). Entre los países Latinoamericanos estimaciones de prevalencia por cada 100 habitantes de la infección debido a la transmisión vectorial es mayor en Bolivia con 6,104, seguido por Argentina, Paraguay y Ecuador (WHO, 2015).

En Bolivia, la dispersión del vector principal de la enfermedad de Chagas cubre alrededor del 60% del país. En la gestión 2016 de los 154 municipios endémicos, solo 34 municipios se encuentran en alto riesgo (Programa Nacional de Vigilancia y Control de la enfermedad de Chagas, 2017).

Debido a que esta enfermedad continúa siendo un problema grande de salud pública ligada a la extrema pobreza que se sufre en áreas periféricas de las ciudades y áreas rurales, se mantiene rigurosas actividades de control vectorial intradomiciliario y peridomiciliario por el Programa Nacional del Chagas del Ministerio de Salud, logrando reducir en los municipios endémicos los índices de infestación por el vector al 55% registrado a nivel nacional en el año 1999 a 2,1% en la gestión 2015. (Programa de Prevención de Chagas del Ministerio de Salud,2015).

Desde el año 1999 se mantiene un control vectorial frente al principal vector de esta enfermedad en el país, *Triatoma infestans*, mediante campañas de fumigación en viviendas, contándose con la participación comunitaria dentro de los Municipios de las zonas endémicas (Programa Nacional de Vigilancia y Control Integral de la Enfermedad de Chagas, 2015).

En mayo de 2011, se generó un hito importante para el país y para América Latina en su batalla contra la enfermedad parasitaria, cuando la Comisión Internacional de Evaluación que integran expertos de Brasil, Colombia y Honduras, funcionarios de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) y contrapartes del Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia, señalaron que la transmisión de la enfermedad de Chagas a través de insectos ha sido interrumpida en el departamento de La Paz (PAHO, 2011), teniendo un área de distribución de *Triatoma infestans* cubriendo 23 municipios y 905 comunidades, localizados en la

zona subandina que comprenden las regiones biogeográficas de los valles mesotérmicos (secos), valles húmedos y el trópico de los yungas (Informe Situacional de la Epidemiología y el Control de la Enfermedad de Chagas en Bolivia, 2011).

Como resultado de las actividades continuas del Programa Nacional de Chagas en control vectorial (Figura 3), se logró reducir en los municipios endémicos los índices de infestación por el vector *Triatoma infestans* de 12,3% registrado a nivel nacional en el 2003 a 2,3% en la gestión 2014 (Programa de Prevención de Chagas del Ministerio de Salud, 2015).

Sin embargo, en 2015 se tuvo una prevalencia de la enfermedad de 33,4% siendo 33 de cada 100 personas que padecen Chagas. También se registraron 12.000 gestantes con la enfermedad y 185 recién nacidos con Chagas congénito (Programa de Prevención del Chagas del Ministerio de Salud), denotando que el problema aún se encuentra latente en el país.

Esta prevalencia muestra la dificultad que se tiene en el control y vigilancia de las poblaciones residuales del vector en el domicilio, la presencia de poblaciones silvestres de *Triatoma infestans* próximo a comunidades y el fenómeno de la migración campo-ciudad con densos asentamientos humanos en situación de pobreza en áreas periurbanas de las ciudades capitales de Bolivia, representan un serio riesgo de recolonización del vector transmisor del agente etiológico *Trypanosoma cruzi* (Cortez et al., 2006). Estas peculiaridades hacen que la enfermedad de Chagas presente características epidemiológicas que distinguen a Bolivia de los demás países de la región y conlleva como prioridad a implementar y fortalecer los sistemas de vigilancia en el área endémica del país (Fernández et al., 2016).

2.2.1.2. Etiología de la Enfermedad de Chagas

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, es un parásito hemoflagelado que posee un flagelo para su locomoción y al ser parte del orden kinetoplástida, familia Trypanosomatidae, posee el organelo peculiar que los define, llamado kinetoplasto, que es un organelo especializado en el que se encuentra el DNA del parásito (WHO, 2002). Es un parásito protozooario que adquiere formas flageladas en la sangre periférica y fluidos biológicos y en los tejidos de animales y humanos infectados se transforma en amastigote, que es la forma reproductiva del parásito (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012; Tay et al., 1991).

La transmisión se produce en los sitios donde pican los insectos triatominos que defecan durante o inmediatamente después de alimentarse y cuando la persona se frota la región donde está la lesión o la mucosa, va introduciendo el contenido de heces cargadas de parásitos que contienen las formas infectantes tripomastigotes metacíclicos que pasan activamente a través de la herida, mucosas o la conjuntiva del huésped. *Trypanosoma cruzi* es incluido en la sección de *Stercoraria*, junto con el grupo de tripanosomas cuyas etapas infecciosas se desarrollan en el tracto digestivo de los vectores y contaminar a los mamíferos a través de las heces (Figura 4). El subgénero *Schizotrypanum* contempla los tripanosomas que se multiplican en vertebrados a través de etapas intracelulares, llevando el nombre taxonómico completo de *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) (WHO, 2002).

El ciclo vital de *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por poseer **cuatro estadios** en los cuales adopta diferentes formas, que dependerán del hospedero y tipo de tejido donde se encuentre.

En un mamífero parasitado, la **forma amastigote**, es la forma no móvil del parásito porque tiene forma esférica y carecen de flagelo. Se instalan en el interior de las células de los individuos infectados que principalmente son células musculares y nerviosas. Caracterizado por ser una forma no infectiva, pero sí replicativa. Se multiplican por fisión binaria longitudinal; ya multiplicadas rompen la célula quedando libres en circulación. En circulación se transforman en su forma móvil denominado **tripomastigote sanguíneo** y circulan en la sangre hasta que vuelvan a parasitar otra célula (Telleria y Tibayrenc, 2010); en esta forma el parásito es ingerido por los vectores los cuales se transforman en **epimastigotes** en el intestino medio o estómago del triatomino, son formas móviles, replicativas, más no infectivas. Se convierten en **tripomastigotes metacíclicos** en el intestino posterior permaneciendo en la porción distal del intestino del insecto. Al alimentarse los triatominos van empujando el contenido intestinal y defecan, dejando en las deyecciones tripomastigotes metacíclicos, convirtiéndose en la fase infecciosa del ciclo. Cuando el parásito ya está en los tejidos se puede reproducir en las células del sistema fagocítico mononuclear, y puede introducirse en las células o ser fagocitado. Dentro de las células o de los macrófagos, se convierte en amastigote, se multiplican, pero cuando la célula se rompe se transforman en tripomastigote sanguíneo o circulante invadiendo nuevas células como son el tejido muscular estriado y células nerviosas, repitiéndose el ciclo biológico (Romero-Cabello, 2007).

Trypanosoma cruzi, está compuesta por diferentes cepas, cada una de las cepas poseen características y orígenes diferentes entre sí (Brenner, 1992). Que *Trypanosoma cruzi* no sea una población homogénea es debido a que originalmente era transmitido directamente entre los marsupiales, pero posteriormente fue dirigido a otros mamíferos a

través del advenimiento de la Hemiptera (Triatominae) que ahora se consideran los principales vectores. Esta transferencia de marsupiales a otros mamíferos puede haber sido el principal factor de adaptación del parásito de la forma original extendida (*T. cruzi* I) a un rango de otros linajes ahora agrupados como *T. cruzi* II, *T. cruzi* III y *T. cruzi* VI. Se dice que la primera divergencia de *T. cruzi* I a *T. cruzi* II (principalmente humanos) se produjo hace unos 10 millones de años (Zingales et al., 2009).

2.2.1.3. Rutas de Transmisión de la Enfermedad de Chagas

2.2.1.3.1. Transmisión Vectorial

El modo de transmisión más común e importante para la enfermedad de Chagas es la infección parasitaria contraída a partir de la picadura del vector que durante o después de alimentarse deposita heces que contienen formas infectantes como tripomastigotes metacíclicos las cuales pueden penetrar activamente a través del orificio de la picadura, arañazos en la piel o la mucosa, siendo el insecto triatomino hematófago el protagonista principal de la transmisión. Los vectores biológicos son insectos domésticos y selváticos de la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Familia Reduviidae); Se conocen 140 especies, sin embargo, solo unas pocas especies de tres géneros: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, son vectores importantes de *Trypanosoma cruzi* entre animales domésticos (mamíferos, no mamíferos) y humanos áreas endémicas (WHO, 2002). No obstante, no todos los insectos de la subfamilia Triatominae están infectados con *Trypanosoma cruzi*.

2.2.1.3.2. Transmisión Transfusional de Sangre

Los movimientos de migración rural a urbana cambiaron el patrón epidemiológico tradicional de la enfermedad de Chagas, transformándose de ser una infección de condición rural a una infección urbana que puede transmitirse por transfusión de sangre. Por ese motivo en los países endémicos, dentro de los bancos de sangre, se establecieron sistemas para detectar muestras infectadas (Telleria y Tibayrenc, 2010).

Cuando la migración poblacional se extendió mundialmente, provocó la aparición de casos de la enfermedad en áreas donde el vector de la enfermedad no se encuentra (Flores-Chávez et al., 2008). Por ese motivo en América del Norte y Europa, la enfermedad de Chagas se introdujo mediante la transfusión de sangre (Wendel y Gonzaga, 1993), presentándose casos de infección sobre todo en los Estados Unidos (Grant et al., 1989) y España, ya que es muy común la disposición voluntaria y altruista por parte de migrantes Latinoamericanos en programas de donación de sangre, países no endémicos someten a donantes de sangre a pruebas serológicas para anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* haciendo énfasis en migrantes de América Latina (Flores-Chávez et al., 2008).

El riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas después de la transfusión de una unidad de sangre de un donante infectado es menor del 10-20% y depende de factores como la concentración de parásitos en la sangre del donante, el componente sanguíneo transfundido y la cepa del parásito (Rassi, Rassi y Marin-Neto, 2010).

2.2.1.3.3. Transmisión por Trasplante de Órganos

En los últimos años se hizo evidente esta forma de contagio, por el aumento de pacientes donadores de órganos. Reportes de pacientes que han recibido órganos de donantes con enfermedad de Chagas crónica han experimentado episodios agudos de la enfermedad. Esto ha ocurrido con mayor frecuencia después de un trasplante de riñón (Márquez et al., 2013), los trasplantes de corazón, médula ósea y páncreas de donantes muertos y vivos (WHO, 2002).

Por consiguiente, el estado de infección del donante debe considerarse al aceptar un órgano para trasplante (Corey et al., 2017).

2.2.1.3.4. Transmisión por Vía Oral

Los brotes en humanos atribuidos a la transmisión oral se han registrado en áreas rurales y periurbanas no endémicas en América del Sur. Entre los años 1930 y 1950 se consideraba que esta transmisión se restringía únicamente en animales silvestres a través de la ingesta de deyecciones de triatomino, no obstante, se verificó que este mecanismo de transmisión también involucraba al hombre. El año 1965, se reportó el primer caso de este tipo de transmisión en Brasil (Toso, Vial y Galanti, 2011)

Esta transmisión ocurre debido a la ingesta de triatominos triturados, jugos contaminados hechos de fruta de açaí, caña de azúcar o guayaba, agua o sopa contaminadas con heces de triatominos (Dias et al., 2008; Cavalcanti et al., 2009; Nóbrega et al., 2009), de carne o sangre de mamíferos infectados y secreciones infectadas de las glándulas anales de los marsupiales (Shikanai-Yasuda et al., 1991). También se ha encontrado el parásito en leche humana de pacientes cursando el estadio

agudo de la enfermedad de Chagas y hay casos descritos de infección de *Trypanosoma cruzi* vía oral a través de la leche durante la lactancia materna (Toso, Vial y Galanti, 2011).

2.2.1.3.5. Transmisión Congénita

El parásito también puede transferirse de madres infectas a sus hijos por vía intrauterina, durante cualquier etapa de la gestación o durante el parto por el contacto de las mucosas del feto con la sangre de la madre infectada. La transmisión transplacentaria o congénita no se limita a las áreas rurales en donde ocurre la transmisión vectorial, es más, la frecuencia en ciudades donde no hay transmisión vectorial aumenta, por la migración campo-ciudad de mujeres infectadas en edad fértil (WHO,2002). De hecho, la cantidad de parásitos en las madres infectadas, las cepas involucradas, los factores placentarios y / o la inmunidad materna pueden determinar la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* (Riera et al., 2006). La transmisión congénita se produce en el 5% de los embarazos o más en las mujeres con infección crónica en algunas regiones de Bolivia (Torrice et al., 2004).

2.2.1.3.6. Transmisión Accidental

Es la transmisión menos frecuente, pero se ha informado casos en laboratorios y hospitales de países endémicos y no endémicos. Debido al mal manejo y descuido de trabajo por parte de investigadores, médicos y técnicos que trabajan con materiales

contaminados ya sea deyecciones de triatominos, cultivos del parásito y la sangre infectada de humanos y animales (WHO, 2002; Dias y Schofield, 1999).

2.2.1.4. Manifestaciones Clínicas de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas se caracteriza por pasar por dos etapas sucesivas: fase aguda y crónica.

La **fase aguda** dura de 6 a 8 semanas, en esta fase la mayoría de los pacientes infectados parecen saludables, normalmente es asintomática debido a la baja carga de parásitos, o puede presentarse como una enfermedad febril inespecífica, inflamación en el lugar de la inoculación, hinchazón unilateral de los párpados (signo de Romaña), palidez, dolor muscular, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o en el pecho, adenopatía y hepatoesplenomegalia. Posteriormente los pacientes infectados aparentan estar sanos (WHO, 2002; Rassi, Marcondes de Rezende, Luquetti y Rassi, 2010). Los síntomas aparecen de 1 a 2 semanas después de la exposición a insectos triatominos infectados, o hasta unos pocos meses después de la transfusión de sangre infectada (Rassi et al., 2010). La infección se detecta únicamente mediante pruebas serológicas que pueden revelar anticuerpos IgM contra *Trypanosoma cruzi* o parasitológicas.

En la **fase crónica** comienza aproximadamente 2 meses después de la infección inicial; se diferencia en dos formas definidas: **indeterminada** (preclínica) y **determinada** (clínica), que se subdivide en cardíaca, digestiva (generalmente expresada como megaesófago y / o megacolon) y formas cardiodigestivas. La enfermedad cardíaca se clasifica en etapas y la enfermedad de Chagas esofágica en grupos (Rassi et al., 2010)

Los pacientes que tienen la forma indeterminada se caracterizan por la positividad para anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en suero, un ECG normal y un examen radiológico normal del tórax, esófago y colon (Dias, 1989; Rassi et al., 2010). No obstante, a su buen pronóstico, ha adquirido una importancia creciente debido a algunas anormalidades en pruebas y lesiones focales miocárdicas en algunos pacientes (Prata, 2001). Mientras que, un 40% de los pacientes, después de 10-30 años desde la infección inicial, desarrollan la forma determinada de la enfermedad conocida como forma cardíaca (arritmias, insuficiencia cardíaca o tromboembolia) o digestiva (megaesófago y megacolon) (Pérez-Molina y Molina, 2018).

2.2.1.4.1. Diagnóstico y Tratamiento para la Enfermedad de Chagas

Como indica la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002), el diagnóstico laboratorial de la infección por *Trypanosoma cruzi* se basa en: **a) pruebas parasitológicas directas**, puesto que una gran cantidad de parásitos están presentes en la sangre periférica y **b) métodos indirectos** a través del **diagnóstico serológico**, a consecuencia de que en su mayoría los individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* en la fase crónica desarrollan anticuerpos (predominantemente de la clase IgG) contra la mezcla antigénica compleja del parásito.

a) Pruebas parasitológicas directas:

Observación microscópica al fresco: Mediante observación directa de muestras de sangre periférica fresca u otro fluido, se determina la presencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Xenodiagnóstico: Por medio de ninfas de triatomíneos libres de infección, se detecta a *Trypanosoma cruzi* en forma de tripomastigote, en deyecciones de triatomíneos luego de alimentarse de sangre infectada. Se debe enfatizar que, actualmente no se utiliza este método de diagnóstico.

Método de concentración Microstrout: Examen microscópico de la fracción leucoplaquetaria de la sangre total, en el cual se busca formas tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, en un capilar de micro-hematocrito cargado con sangre del paciente.

Gota gruesa: Tiene por objeto concentrar la muestra de sangre, colocando de 3 a 4 gotas de sangre sin anticoagulante en un portaobjeto, seguidamente se desfibrinan, se tiñen con Giemsa y se observan al microscopio buscando la presencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

b) Métodos indirectos:

IFI (Inmunofluorescencia Indirecta): Técnica de inmunomarcación, que muestra la presencia de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente, empleando dos antígenos, el primer antígeno son epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y el segundo antígeno es un fluoróforo.

HAI (Hemaglutinación indirecta): Valora la presencia de antígenos en los glóbulos rojos de la sangre, capaces de reaccionar con anticuerpos y proteínas específicas de algunos microorganismos. Diluciones superiores a 1/16 se consideran significativos.

ELISA: Es un ensayo inmunoenzimático para la detección cualitativa de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, con la ayuda de un antígeno inmovilizado, se detecta un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como, por ejemplo, cambio de color. Dada la gran sensibilidad y especificidad de ELISA, una sola prueba puede ser suficiente para la detección.

Pruebas diagnósticas rápidas: Son análisis inmunocromatográficos con proteínas recombinantes. Cabe destacar que no son suficientemente sensibles para ser empleadas como herramientas diagnósticas serológicas de primera línea (Sánchez-Camargo et al., 2014).

PCR (Reacción en cadena de la polimerasa): Técnica molecular que se basa en la amplificación de secuencias diana de DNA, que son abundantes y específicas para el parásito en cuestión. Para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* se utilizan dos secuencias diana: la región variable del minicircle kinetoplast DNA y una secuencia reiterada de 195 pb de DNA del parásito. Esta prueba puede ser útil cuando los resultados serológicos no son concluyentes, para monitorear la detección precoz del fracaso terapéutico y para tratar a pacientes inmunosuprimidos. Este método parasitológico indirecto, es más sensible que el hemocultivo y el xenodiagnóstico y es muy útil para el diagnóstico de la transmisión madre-hijo (Murcia et al., 2012). No obstante, su sensibilidad depende del grado de parasitemia del paciente.

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se administran fármacos como el **benznidazol** y el **nifurtimox**, ambos administrados por vía oral (WHO, 2002). Ambos medicamentos son casi 100% efectivos para curar la enfermedad si se administran poco después de la infección al inicio de la fase aguda, incluidos los casos de transmisión congénita. La eficacia de ambos disminuye, sin embargo, cuanto más tiempo ha estado

infectada una persona (WHO, 2018). Se recomienda el uso de drogas tripanocidas en fase aguda y congénita de la enfermedad, en infecciones de fase crónica en menores de 18 años. También se sugiere a pacientes con Chagas crónico en la fase indeterminada y a pacientes con enfermedad de leve a moderada. Ambos medicamentos están contraindicados durante el embarazo y para pacientes con insuficiencia renal o hepática (Castro et al., 2011).

El tratamiento tripanocida de las mujeres con infección crónica de Chagas fue eficaz para prevenir la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* a sus hijos (Fabbro et al., 2014).

En la fase crónica indeterminada la tasa de curación es mayor en menores de 14 años; la tasa de curación es menor en la fase crónica. El benznidazol es mejor en tolerabilidad, penetración y posiblemente, eficacia, en adultos con infección crónica; tiene una actividad considerable en fases agudas (Pérez-Molina y Molina, 2018).

Por otro lado, estudios demostraron que el nifurtimox es poco tolerado entre los adultos con infección crónica, desencadenando una baja tasa de finalización del tratamiento. Debido a la presencia de efectos secundarios como: anorexia, irritabilidad, insomnio, cambios de estado de ánimo, náuseas, vómitos y fiebre. Teniendo en cuenta estos eventos, es necesario una estrecha vigilancia al paciente tratado. (Jackson et al., 2010).

2.2.2. Los Triatominos como Vectores de la Enfermedad de Chagas

Los vectores biológicos son insectos domésticos y selváticos de la subfamilia Triatominae pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae. Se caracterizan por

su hábito hematófago y adaptación morfológica asociada con la búsqueda de hospedadores. En el presente, se reconocen 140 especies existentes, se clasifican habitualmente en 5 tribus y 15 géneros (Lent y Wygodzinsky, 1979) (Tabla 2). Se cree que derivaron de formas depredadoras de los Reduviidae (Bargues, Schofield y Dujardin, 2010).

Todos son probablemente vectores capaces de transmitir *Trypanosoma cruzi* empero, pocos son de importancia epidemiológica como vectores transmisores de *Trypanosoma cruzi* entre animales domésticos y humanos en áreas endémicas. Se está al tanto que *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* tienen esta capacidad transmisora de *Trypanosoma cruzi* (Schofield y Galvão, 2009; WHO, 2002), siendo poblaciones que se adaptaron para vivir en estrecho contacto con los humanos. La concentración principal ha sido en *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus* de los países del Cono Sur, y *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en los países del Pacto Andino y partes de América Central. Estos insectos hematófagos viven en estrecha asociación con sus huéspedes selváticos en hábitats tales como coronas de palmeras, nidos de pájaros, madrigueras de roedores, refugios de zarigüeyas y montones de rocas. Para algunos géneros, la clasificación de Triatominae refleja estas asociaciones, con por ejemplo el *Rhodnius* adaptado a las palmeras, el *Psammolestes* que vive en nidos de pájaros, y el *Panstrongylus* y el *Paratriatoma* asociados con madrigueras (Noireau y Dujardin, 2010).

Algunas especies pueden sobrevivir solo dentro de un rango estrecho de temperaturas y humedad. Otros pueden tolerar una amplia gama de condiciones climáticas (como: *Panstrongylus geniculatus*, *Triatoma infestans*, y *Mepraia spinola*). Otros Triatominae requieren fuentes específicas de alimentos, (*Cavernicola pilosa*, que

se alimenta de murciélagos, y *Triatoma protracta*, que se alimenta de ratas espinosas del género *Neotoma*). Otras especies no tienen preferencias especiales de alimentación; estos incluyen *Triatoma guasayana*, *Triatoma sanguisuga* y *Triatoma sordida* (WHO, 2002).

Casi todas las especies triatomíneas se limitan a las regiones neotropicales y neoárticas, encontrándose algunas de ellas en ambas regiones. Se distribuyen geográficamente desde la ciudad de Salt Lake City, a 41° de latitud N, en los Estados Unidos de América, donde se ha notificado la existencia de *Triatoma protracta*, hasta la Patagonia, en América del Sur, donde se ha hallado el *Triatoma patagónica* a los 46° S. (WHO, 1991).

En Bolivia y Paraguay, *Triatoma infestans* se encuentra ampliamente disperso, sin embargo, se ha encontrado la especie *Panstrongylus megistus* en pequeños focos. *Triatoma sordida* se encuentra distribuido en la parte oriental de Bolivia y en una amplia zona del sur del Brasil, como también en zonas de Argentina, Paraguay y Uruguay (Figura 5). Sin embargo, el vector más importante en Argentina, Bolivia, Uruguay y Chile es *Triatoma infestans*. (WHO, 1991).

En Latinoamérica mediante los asentamientos humanos se generó deforestación, ocasionando la dispersión de los triatominos y adaptación de estos al hábitat doméstico del ser humano. Debido a esta alteración que redujo la presencia de mamíferos y aves silvestres de su hábitat natural, los triatominos (vectores del parásito causante de la enfermedad) encontraron nuevas fuentes emergentes de alimento en animales domésticos y en humanos; y es así, como una enfermedad que se mantenía en un ciclo enzoótico en mamíferos y aves silvestres, pasa a convertirse en una zoonosis, es decir,

una enfermedad que tiene como reservorio natural a ciertos animales silvestres, y se transmite a los seres humanos (Fitzpatrick *et al.*, 2008).

Las especies de insectos triatominos que transmiten la enfermedad de Chagas, durante el día descansan en lugares oscuros cerca de su fuente de alimento, principalmente los triatominos domésticos, que son abundantes en paredes agrietadas de adobe. Otros escondites que utilizan están detrás de cuadros colgados, entre muebles, cajas, techos de madera y en camas. Los triatominos peridomésticos encuentran lugares de descanso en áreas circundantes a las casas, en lugares donde pueden volver a entrar a las casas para alimentarse. Alojándose en objetos almacenados, como leña, madera, baldosas, piedras y bolsas de comida, los cuales crean microambientes. Estos insectos también se pueden encontrar en alojamientos de animales, como gallineros y corrales (WHO, 1997).

Si bien los triatominos silvestres viven fuera del hábitat humano, los crecientes informes de especies de triatominos silvestres que invaden hábitats peridomésticos y domésticos respaldan la necesidad de profundizar las investigaciones de sus hábitats y poblaciones silvestres originales (Noireau *et al.*, 2002).

Entre los vectores de la Enfermedad de Chagas, el *Triatoma infestans* está muy bien adaptado al ambiente doméstico, por ello según su importancia epidemiológica en su grado de asociación con el hombre se lo define como primaria, por esta razón, son claramente antropofílicas mostrando tendencias sinantrópicas y presentan un índice significativo de infección natural por *Trypanosoma cruzi* (Noireau *et al.*, 2005); es por ello que las campañas de control vectorial son continuas, el problema recae en que este control se realizaba creyendo que esta especie era casi exclusivamente doméstica, excepto para pequeños focos silvestres encontrados principalmente en los valles de

Cochabamba en Bolivia (Torrico et al.,1946). También se descubrieron poblaciones silvestres de *Triatoma infestans* en el Chaco boliviano, lo que indica que ocasionalmente pueden entrar en contacto con seres humanos y colonizar los intra-peridomicilios, creando una peligrosa situación de persistencia del contacto hombre-vector (Buitrago et al., 2016); de acuerdo con Noireau (2005), esto sucede cuando existen cambios ambientales antropogénicos y el daño subsiguiente a los biotopos de los triatominos parecen promover la dispersión y favorecer el proceso sinantrópico de las especies silvestres, los mecanismos básicos de adaptación del insecto a los ecotopos artificiales. No obstante, las especies pueden mostrar una relación cercana con un ecotopo específico; es interesante que algunos triatominos se pueden encontrar en hábitats variados como arbóreos o rocosos, cuando la gran mayoría de Triatominae no exhiben esta característica. Un claro ejemplo son *Triatoma infestans* y *Triatoma sordida*, cuyas poblaciones de altitud viven en pilas de roca y las poblaciones de tierras bajas viven en árboles (Dujardin, 1999), e incluso es posible observar diferencias cromáticas entre *Triatoma infestans* arbóreos en el Chaco Boliviano (Noireau et al., 2000).

2.2.2.1. Ciclo de Vida de los Triatominos

El ciclo de vida de los triatominos está compuesto por huevos, cinco estadios ninfales (etapas inmaduras) y adulto (masculino y femenino); durante todas estas fases, generalmente son hematófagos.

Estudios determinaron que el desarrollo de triatominos se da a temperaturas entre 20 °C y 30 °C, aproximadamente completa su desarrollo entre 5-6 meses, pero puede

variar según la especie. Este desarrollo en un entorno natural puede durar más tiempo (Noireau y Dujardín, 2010).

Los insectos adultos pueden copular varias veces durante su vida, lo que aumenta la variabilidad genética. La cópula dura de 5 a 15 minutos; tras una copulación exitosa se depositan los huevos después de 10 a 30 días. Las hembras pueden ser fecundadas por más de un macho (Lima, Jurberg y Almeida, 1987). Una sola hembra de *Triatoma infestans* puede poner alrededor de 100 huevos durante su vida, pero dependiendo de las condiciones de densidad, puede ovipositar un par de veces más. La cantidad de huevos también está correlacionada con la cantidad de sangre que se ha ingerido, mostrando que la disponibilidad de alimento está estrechamente relacionada con la fecundidad.

Los huevos son ovoides, y su envoltura presenta una textura con algunos aspectos de importancia taxonómica. Son blancos en la oviposición, luego de color rosa, se oscurecen con el endurecimiento de la quitina y finalmente oscurecen cuando llegan a la madurez (Barata, 1981). Después de 10 a 40 días desde la oviposición ocurre la eclosión. Las ninfas nacidas pueden tener su primera comida de sangre, ingiriendo sangre equivalente a 8-9 veces su propio peso, mientras que los adultos lo hacen de 2-4. La muda se desencadena por un estímulo nervioso que se genera debido a la distensión de la pared que se produce cuando la cantidad de sangre (alimento) es completa.

Las ninfas se diferencian de los adultos principalmente por su falta de alas o genitales completamente desarrollados (Figura 6). El hecho de que ninfas y adultos habitualmente ocupan el mismo hábitat, indica que se alimentan de la sangre de los mismos vertebrados y son capaces de infectarse y transmitir *Trypanosoma cruzi* por igual. Casos de alta densidad de población puede repercutir en el desarrollo retrasándolo, evitando la iniciación de la muda y una falla en la transmisión del parásito si está

presente en el intestino (Noireau y Dujardin, 2010; Schofield, 1982). Un hecho que resalta en los triatominos es que pueden ayunar por períodos de hasta 200 días.

Los triatominos normalmente están activos por la noche. No obstante *Triatoma infestans* tiene dos picos de actividad, que son controlados por la luz y temperatura, uno al anochecer y el otro al amanecer, que corresponden a la búsqueda de alimento y a los escondites para descansar.

Otras especies revelan variaciones en cuanto actividad, por ejemplo, *Triatoma brasiliensis* se adapta a ambientes secos con altas temperaturas y luz abundante, su actividad máxima ocurre al final del día, en sincronización con los hábitos nocturnos de los roedores que son sus huéspedes naturales (WHO, 2002).

2.2.2.2. Dispersión de Triatominos

La competencia por la comida puede estimular a los adultos a buscar nuevos hábitats y a abandonar los ecotopos selváticos en el llamado "período de infestación".

Asimismo, los cambios ambientales desfavorables hacen que los triatominos se trasladen a hábitats artificiales, que son altamente estables y ofrecen una variedad de escondites y una gran cantidad de alimentos durante todo el año. Como resultado de esta estabilidad ambiental, las poblaciones domiciliarias de triatominos pueden alcanzar densidades mucho más altas que las observadas en hábitats selváticos (WHO, 2002).

2.2.2.2.1. Dispersión Activa

La dispersión activa de Triatominae está asociada al estado nutricional, la temperatura externa, la humedad relativa y la densidad de población, provocando su dispersión volando (Lehane, McEwen, Whitaker y Schofield, 1992; Noireau y Dujardin, 2001; Noireau y Dujardin, 2010). No obstante, la dispersión activa se realiza no solo volando sino también, se dispersa gradualmente, en pequeñas distancias, caminando dentro de una parcela con una cubierta vegetal continua (Richer et al., 2007).

Los insectos adultos domésticos cuando son descubiertos en su escondite no vuelan, intentan escapar caminando. Al contrario, los insectos en condiciones selváticas, cuando es descubierto se alejan o permanecen absolutamente inmóvil, pero algunas especies estrictamente selváticas pueden volar inmediatamente si son perturbadas (Noireau y Dujardin, 2010).

Lehane y Schofield (1976) establece que la actividad de vuelo generalmente necesita una preparación fisiológica, un calentamiento previo durante el cual el insecto agita sus alas durante unos minutos, y que es más frecuente en especímenes hambrientos.

2.2.2.2. Dispersión Pasiva

La dispersión pasiva se considera una de las formas más frecuentes de propagación de triatominos en grandes áreas. Se da cuando Triatominae migran con sus anfitriones, especialmente cuando están altamente adaptados a su anfitrión. Es por ellos estudios suponen que las principales poblaciones domésticas de Triatominae (por ejemplo, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma rubrofasciata*) se originaron por una migración pasiva con los seres humanos, debido a

su alta adaptación al hábitat humano y a los huéspedes que viven allí o alrededor, lejos de su ecotopo natural, perdiendo su contacto con los focos selváticos originales y aumentando su dependencia de los huéspedes humanos. Algunos Triatominae aumentan su posibilidad de seguir al huésped produciendo huevos para pegar (Noireau y Dujardin, 2010).

Las ninfas, los huevos y los adultos pueden ser transportados en o sobre ropa humana, pelo de mamífero o plumas de ave (Forattini, Rocha e Silva, Ferreira, Rabello y Pattoli, 1971), contribuyendo a la reinfestación de los domicilios humanos de los sitios peridomésticos.

2.2.2.3. *Triatoma infestans* (Klug, 1834)

Triatoma infestans (Klug, 1834) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) es el principal vector del parásito *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas en una gran parte los países del Cono Sur de Latinoamérica.

Triatoma infestans se encuentran entre las especies que están estrictamente domiciliadas o, excepcionalmente, se encuentran en ecotopos salvajes. *Triatoma infestans* es originario de Bolivia, el único país donde se ha demostrado su existencia en áreas domésticas, peridomésticos y silvestres (Coura, 2014). En los Andes, los factores climáticos pueden obstaculizar el proceso de intrusión doméstica por *Triatoma infestans* silvestres. Entre 1.700-2.800 m s. n. m., es el rango de altitud donde las poblaciones silvestres *Triatoma infestans* están muy extendidas, el frío crepuscular restringe la dispersión del vuelo (Noireau, 2009).

En su hábitat natural, vive en asociación con roedores, bajo pilas de rocas. Adaptado desde el período precolombino a las viviendas humanas, se ha dispersado pasivamente a Argentina, Brasil, Chile, Paraguay, sur de Perú y Uruguay. Predominantemente domiciliar, se considera que *Triatoma infestans* es la especie triatomífera más importante en todos los países donde se ha encontrado. Estrechamente asociadas con los seres humanos y los animales domésticos en su dispersión, se han seleccionado poblaciones con características genéticas muy simplificadas, lo que resulta en una baja variabilidad y una incapacidad para adaptarse a los entornos cambiantes. Esta adaptación extrema a las viviendas humanas ha hecho que *Triatoma infestans* sea el vector más importante de la enfermedad de Chagas humana, pero también ha resultado en una mayor fragilidad genética, posibilitando su completa eliminación en la mayoría de las áreas en las que ocurre (WHO, 2002).

Triatoma infestans ha sido considerado casi exclusivamente doméstica por mucho tiempo, a pesar de informes de hallazgos de *Triatoma infestans* en áreas silvestres en Argentina, Brasil y Paraguay, se pensó que los verdaderos focos silvestres estaban restringidos a los valles andinos de Cochabamba en Bolivia, donde se habían detectado repetidamente poblaciones silvestres (Torrico et al., 1946). Estos hallazgos demostraron que poblaciones silvestres andinas en Bolivia se distribuyen en áreas más grandes que los valles de Cochabamba, y su importante papel en la recolonización de las áreas tratadas con control vectorial. De hecho, *Triatoma infestans* persiste principalmente en los valles andinos bolivianos y en la ecorregión del Gran Chaco, precisamente donde se han encontrado poblaciones silvestres (Waleckx et al., 2012).

La incógnita de si el éxito en la eliminación de vectores podría ser interrumpido por repetidas recolonizaciones en viviendas y áreas peridomésticas por las poblaciones silvestres cercanas sigue siendo una pregunta abierta. (Brenière et al., 2013).

Estudios realizados en sitios de recolonización dentro de las aldeas, utilizando diferentes marcadores genéticos como aloenzimas y microsatélites, representaron un alto grado de estructura genética microgeográfica entre poblaciones de las regiones andina y del Gran Chaco (Pizarro et al., 2008), observándose una diferenciación sustancial entre poblaciones, indicando que la estructura genética de *Triatoma infestans* en los ambientes humanos puede estar basada en eventos infrecuentes de desplazamientos de insectos entre los ecotopos, dando lugar a una disminución del flujo genético y aislamiento de la población (Brenière et al., 2013).

Al referirnos a *Triatoma infestans* doméstico hablamos de su adaptación a las construcciones del hombre. Se separa a los Triatominos en vectores “domésticos” que en realidad es un insecto sinantrópico y vectores “silvestres” haciendo referencia a insectos enzoóticos asociados a animales salvajes que viven fuera del hábitat humano. Un Triatomino es llamado “peridoméstico” cuando es encontrado en los lugares destinados a los animales domésticos y no dentro de la habitación del hombre. De esta manera se describe un carácter de comportamiento de la especie y, de manera más general, una etapa de colonización de los Triatominos hacia el domicilio, cuando el insecto se aproxima sin ser capaz de adaptarse al hombre, porque encuentra facilidades para vivir en su medio ambiente inmediato. Esta distinción no parece ser un carácter específico del insecto ya que él puede ser “doméstico” en una región geográfica, “peridoméstico” en otra y “silvestre” en otra. Por otro lado, también puede reflejar casos de competición entre especies diferentes que viven en simpatria (Dujardin et al., 2002).

2.2.2.3.1. Estudios de la Morfología Externa

La identificación taxonómica de los triatominos inició con un enfoque basado en las características morfológicas. La taxonomía morfológica se basa en las características de la morfología externa de las diferentes fases de desarrollo (huevo, ninfas y adultos) y su patrón cromático. Y mediante una clave dicotómica se identifica al espécimen. Lent y Wygodzinsky en el año 1979 realizaron una monografía en la cual recopilaron la morfología de casi todas las especies Triatominae de ese tiempo.

En la familia Reduviidae, el aparato bucal es del tipo picador-aspirador constituido por una probóscide de tres o cuatro segmentos, diferenciando su hábito alimenticio. La subfamilia Triatominae generalmente se puede distinguir de otros redúvidos (Reduviidae) por la probóscide recta, esbelta, afilada y de tres segmentos. En cambio, los predadores presentan una probóscide curva con tres segmentos más fuertemente quitinizada y los fitófagos poseen una probóscide recta con cuatro segmentos (Figura 7) (WHO,2002). El cuerpo está dividido en cabeza, tórax y abdomen. En la **cabeza** se encuentran: antenas, ojos compuestos y ocelos, y el aparato bucal. En el **tórax**: los apéndices locomotores, patas y alas; y en el **abdomen**: los genitales en su porción posterior.

En los triatominos, el cuerpo puede presentar variaciones en el tamaño, la coloración, la pilosidad y la forma de algunas estructuras de acuerdo con la especie. También se observan variaciones en la cabeza, en su forma, tamaño y coloración diferentes (Monte y Costa, 2017).

En 2002 Dujardin, Schofield y Panzera establecen que, de manera general, se diferencia a Triatominae de otras subfamilias de Reduviidae por los siguientes caracteres de la cabeza y del tórax. **La cabeza** (Figura 8): a) Una cabeza estrecha, dos veces más larga que ancha (entre los ojos) o igualmente larga; b) La proboscis constituida por tres segmentos los que en reposo no sobrepasan el prosternum; c) Las antenas formadas por cuatro segmentos insertados lateralmente sobre los pedúnculos anteníferos (Figura 9); d) Los ocelos, siempre presentes, frecuentemente colocados sobre una protuberancia; e) Un segmento III del rostro que es capaz de levantarse cuando el rostro está extendido (este último carácter es muy importante, ya que permite la hematofagia, ninguna otra subfamilia de Reduviidae presenta esta característica).

El tórax: a) El segmento anterior del tórax (protórax) presenta sobre su cara superior (pronoto) unos surcos que permiten distinguir un lóbulo anterior y un lóbulo posterior, siendo el primero mucho más corto; b) De las tres partes del tórax (pro, meso y meta), el mesotórax es el más esclarecedor, en él se encuentra un proceso alargado, el escutelo, visible sobre la cara dorsal. Este es de forma triangular y está unido a un proceso posterior subcónico; c) El metanoto está recubierto por el escutelo y las alas mesotorácicas, de manera que no puede ser observado directamente sobre el insecto en reposo; d) Las alas y las patas articuladas al tórax (localizados en el pro, meso y metatórax, y meso y metatórax, respectivamente), las patas no ofrecen características propias de los Triatominae, pero se destaca que están generalmente desprovistas de espinas a diferencia de los hemípteros predadores (Figura 10) (Dujardin et al., 2002, pp. 29–35).

Ventralmente en el primer par de muslos se presenta una estructura acanalada, el surco estridulador, de forma triangular. Movimientos repetitivos de la cabeza hacen que

el ápice del rostro frotar esta estructura produciendo un sonido, que cumpliría la función de detener al predador.

El abdomen se compone de 11 segmentos dorsales o urotergitos y 11 ventrales o uroesternitos, siendo que el 10° y el 11° corresponden al tubo anal y ano, respectivamente (Figura 11). De lado a lado, están los conectores cuya función es proporcionar la dilatación del abdomen en el momento del repaso sanguíneo. Esta estructura tiene importancia taxonómica debido a la variabilidad en los patrones cromáticos de algunas especies. En hembras el abdomen dorsal tiene nueve segmentos y siete ventral porque el 8° y 9° esternitos modificados en estructuras denominadas gonocoxitos y gonapófisis para formar los genitales externos. Los machos poseen siete segmentos dorsales y siete ventrales. Los 8° y 9° segmentos se modificaron para formar estructuras de los genitales externos. El 8° segmento es una estructura en forma de C, que recubre parte del 9° segmento, también denominado de pigóforo. Este puede presentar una estructura puntiaguda en la región distal dorsal, denominada proceso mediano del pigóforo. Dentro del pigóforo está alojado el órgano copulador que se divide en edeago y aparato articular.

Las ninfas se diferencian de los adultos por la ausencia de ciertas estructuras. En la cabeza, el rostro no alcanza el prosterno, los ocelos son ausentes y los ojos compuestos tienen tamaño menor que el de la forma adulta. En el pecho, protórax está desprovisto de tubérculos y quillas, y en prosterno no presenta aparato estridulador. A partir del tercer estadio ya es posible visualizar en el meso y metatórax las manchas alares, que pasan a denominarse de teca alar en los 4° y 5° estadios (Monte y Costa, 2017).

Actualmente existe una variación morfológica en especies de Triatominae, relacionada con la eco geografía, esta flexibilidad fenotípica es principalmente una característica intraespecífica, pero con potencial para cambios evolutivos (Dujardin, Costa, Bustamante, Jaramillo y Catalá, 2009).

2.2.2.3.2. Adaptación y Cambio Climático

En los últimos años observaciones sobre el cambio climático demuestran que un aumento de temperatura originando un ambiente que aumenta la distribución geográfica de los vectores y la altitud a la que pueden sobrevivir, generando una proliferación en hábitats no naturales de diversos vectores de las enfermedades endémicas, como es la enfermedad de Chagas (Carcavallo, 1999).

Este factor es muy importante cuando se tiene especies silvestres con una tendencia a invadir los hábitats humanos. Efectos tales como la disminución de humedad, si bien posiblemente ayude a la distribución geográfica y aumento en la densidad poblacional, puede afectar adversamente a Triatominos en sus ciclos de vida en ambientes tropicales y subtropicales secos y áreas áridas. Por otra parte, con un aumento de temperatura en entornos de especies domésticas pueden ocasionar un desarrollo de ciclos de vida más cortos y mayores densidades de población.

Estudios realizados evidencian que, en áreas con altas temperaturas, *Triatoma infestans* tiene dos generaciones por año, debido a que el calentamiento acortaba su periodo embrionario, mientras que, en áreas templadas o frías, tiene solo una generación durante el mismo período. La temperatura no solo afecta el tiempo de eclosión, sino también el tiempo requerido para completar el ciclo de vida, la frecuencia de picadura o

frecuencia de alimentación, el metabolismo y la estacionalidad. Es por ello que debido a que con altas temperaturas y un clima seco por la baja humedad relativa, aumenta la frecuencia de alimentación debido a la deshidratación (WHO, 2002).

2.2.3. Análisis de la Estructura de Poblaciones a través de Secuencias de DNA

Los análisis de población se han utilizado ampliamente con diferentes métodos basados en el DNA, diferentes marcadores genéticos, con el fin de comprender mejor la historia evolutiva y la dispersión de Triatomíneos (Pita et al., 2017).

La secuenciación de DNA es la técnica más eficiente y versátil que se usa hoy en día en la sistemática molecular. Por consiguiente, muchas secuencias están disponibles en bases de datos de acceso público, como GenBank, que proporcionan una gran fuente de datos acumulativa (Monteiro, Marcet y Dorn, 2010).

La secuenciación de fragmentos de genes permite la evaluación directa de polimorfismos de DNA, proporcionando el mejor tipo de datos para inferencias filogenéticas y determinación de relaciones de parentesco entre individuos y poblaciones (Monteiro, 2017). Asimismo, la disponibilidad de diferentes genomas (mitocondriales y nucleares), y de genes con un amplio rango de grados de conservación, significa que se puede abordar cualquier problema en la sistemática (Monteiro et al., 2010).

Diversos segmentos de DNA mitocondrial y nuclear evolucionan a tasas diferentes. Las regiones de evolución rápida son adecuadas para el estudio de organismos cercanos, mientras que las regiones más conservadas son más apropiadas para la comparación entre los taxones más divergentes (Monteiro, 2017).

2.2.3.1. Marcadores Genéticos

2.2.3.1.1. Secuencia Interna Ribosomal (ITS-2)

Como indica Monteiro (2017), los genes nucleares son generalmente más conservados que genes mitocondriales. En consecuencia, son más indicados para análisis de la diversidad y relaciones por encima del nivel de especie. No obstante, los espaciadores de RNA ribosomal como los espaciadores internos transcritos (ITS) pueden ser informativos para análisis poblacionales. Estos marcadores también se han empleado en estudios taxonómicos y evolutivos en Triatominae.

El segundo espaciador interno transcrito, ITS-2, del rDNA nuclear fue probado como marcador molecular para poblaciones, especies y relación filogenética en Triatominae debido a su utilidad conocida a nivel de especies y subespecies, incluida la diferenciación de taxones dentro de grupos problemáticos, como es el caso de los que comprenden especies crípticas o hermanas de otros grupos de insectos. Además, las secuencias del ITS-2 ya han demostrado ser una herramienta útil en el análisis de especies, subespecies, híbridos y poblaciones, y para inferir relaciones filogenéticas en Triatominae en general (Bargues et al., 2008; Marcilla et al., 2001).

2.2.3.1.2. Gen Mitocondrial Citocromo B (mt Cyt B)

El DNA mitocondrial es muy importante en el entendimiento de la taxonomía y la filogenia de Triatominae (García y Powell, 1998; Lyman et al., 1999), estructura de la población y filogeografía (Piccinali et al., 2009).

El genoma mitocondrial es buen marcador, evoluciona aproximadamente 10 veces más rápido que el genoma nuclear. Su naturaleza haploide es útil en los análisis debido al cruce no son motivo de preocupación. Sin embargo, como las mitocondrias se heredan maternalmente, debe tenerse en cuenta que, al medir y analizar el flujo de genes, solo se realiza inferencias sobre el movimiento de las hembras (Monteiro et al., 2010).

Citocromo B (mt Cyt B) es un marcador predilecto en estudios de análisis filogenéticos y para establecer relaciones entre especies cercanas. Puesto que, han mostrado niveles significativos de diferenciación de nucleótidos entre las dos formas, sugiriendo un aislamiento genético establecido, determinando el origen de la diversificación de especies pertenecientes a un complejo muy cercanas entre ellas (Monteiro et al., 1999).

3. Formulación de Hipótesis

El análisis de las muestras recolectadas de triatomíneos, muestran que hubo cambio en la morfología y genética en su adaptación a zonas urbanas.

4. Operacionalización de las Variables.

Tabla 1.

<i>Variables Estudiadas</i>			
Variable	Tipo	Concepto	Escala
Caracterización genética de Triatominos	Población Silvestre	Vectores “silvestres” haciendo referencia a insectos enzoóticos asociados a animales salvajes que viven fuera del hábitat humano.	Gen Mitocondrial
			Gen Nuclear
Caracterización genética de Triatominos	Población Peridoméstica	Vectores “peridomésticos” son insectos encontrados en lugares destinados a los animales domésticos y no dentro de la habitación del hombre.	Gen Mitocondrial
			Gen Nuclear
Caracterización genética de Triatominos	Población Doméstica	Vectores “domésticos” que en realidad es un insecto sinantrópico	Gen Mitocondrial
			Gen Nuclear

Fuente Propia

5. Diseño Metodológico

5.1. Población en estudio, ámbito y periodo de investigación

Los triatominos que se utilizaron para esta investigación provienen de zonas urbanas y aledañas a la Ciudad de La Paz que pertenecen al Municipio de Mecapaca del Departamento de La Paz, ubicado a 20 kilómetros al sur de la ciudad de La Paz; tiene un clima de valle y una población, según el Censo de Población y Vivienda 2013, de 16.086 habitantes (INE, 2012). Se estudiaron poblaciones silvestres, domésticas y

peridomésticas del insecto vector de la Enfermedad de Chagas, las cuales fueron recolectadas considerando la ubicación geográfica, altitud, ambiente, durante un período de investigación el cual inició en temporada con ausencia de precipitaciones pluviales del año 2017. El tipo de investigación es correlacional y descriptiva, en el periodo de tiempo comprendido en el periodo de 2017-2018, en el laboratorio de Genética Molecular del Instituto SELADIS.

Se exploraron ocho poblaciones de acuerdo a su proximidad a la ciudad de La Paz: Huajchilla, Carreras, Taypichullo, Chojjo, Aleluyani, Yanari, Avircato y Huayhuasi, ubicadas a diferentes alturas sobre el nivel del mar. Las zonas fueron escogidas de manera aleatoria según la característica de ecotopos de la región y comportamiento de infestación registrado en gestiones pasadas (Figura 12; Anexo 1 y 2).

Las poblaciones estudiadas del municipio de Mecapaca están ubicadas a una distancia entre 18 - 28 Km al sur de la ciudad de La Paz; tienen un clima cálido y templado, los veranos tienen buena cantidad de lluvia. El clima se clasifica como Cwb por el sistema Köppen-Geiger (<https://es.climate-data.org/>), teniendo una temperatura promedio en de 14.7 °C, con una precipitación media aproximada de 659 y 664 mm. Los suelos son poco profundos arcillosos, arenosos, aptos para producción agropecuaria de cultivos (arveja, haba, maíz, tomate) y florales. La actividad pecuaria también es importante dentro de su producción, además cuentan con una variedad de aves, insectos, animales domésticos y silvestres como la vizcacha, zorro, ratón, liebre, entre otros (Gobierno Autónomo Departamental de La Paz, 2014). La temperatura que marcó las fechas de colecta del estudio fue entre 15-24°C (temperatura mínima y máxima respectivamente), con una humedad de 59%. La temperatura puede oscilar $\pm 4.5^{\circ}\text{C}$ dependiendo de la estación (Anexo 3).

5.2. Recolección de Triatominos

El trapeo y captura de triatominos, fue realizado usando trampas Noireau (Figura 13) que se tratan de frascos plásticos con una tapa de malla metálica que lleva en su interior a un ratón, la tapa se encuentra envuelta con una cinta adhesiva de doble cara (Noireau, et al., 2002). Las trampas fueron colocadas en lugares estratégicos (Anexo 4) para recolectar diferentes poblaciones de triatominos, en sitios como madrigueras, cuevas en las rocas, raíces de árboles, vegetación espinosa, jardines, ventanas, muros y otros (Buitrago et al., 2010). Las trampas se pusieron en dichos lugares durante la tarde con el objetivo de atraer vinchucas y fueron recuperadas la mañana siguiente; siendo cada una registradas en un formulario de georreferenciación (Anexo 5). Los insectos atrapados fueron colocados en tubos plásticos debidamente rotulados para ser transportados al laboratorio.

5.3. Procedimiento en el Laboratorio

5.3.1. Estudio Morfológico

El estudio morfológico, clasificación por sexo y fase ninfal de los insectos recolectados se realizó utilizando claves taxonómicas (Lent y Wygodzinski, 1979) (Anexo 6) con la ayuda de un estero microscopio (Euromex).

5.3.2. Extracción de DNA de los Triatominos

La extracción de DNA de 100 individuos capturados (detallados en la tabla), fue realizada bajo dos técnicas, la técnica manual CTAB-Cloroformo (modificada) y la técnica de extracción automatizada mediante el equipo Thermo Scientific KingFisher.

En ambas, el DNA total se extrajo y purificó a partir de insectos enteros para los 1^{er} y 2^{do} estadios y con 3 patas para 3^{ro}, 4^{to}, 5^{to} estadios y adultos, conservados en alcohol 70% a 4°C (Anexo 7).

5.3.2.1. Extracción con CTAB

Se corta las patas secas en fragmentos pequeños, se colocan en un microtubo, y se añade 200 µl de CTAB al 2% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se deja incubar la solución durante toda la noche en baño maría a 37°C para digerir las proteínas y liberar el DNA. Al día siguiente, se añaden 200 µl de cloroformo mezclando por inversión para extraer el DNA, se centrifuga la solución 5 minutos a una velocidad de 12.000 rpm y se recupera la fase superior acuosa. La precipitación del DNA se realiza añadiendo 200 µl de isopropanol y se centrifuga nuevamente la solución durante 15 minutos a 12.000 rpm. Para un enjuague del sedimento del DNA se vacía el isopropanol, y se añade 200 µl de etanol al 70% y se vuelve a centrifugar por 5 minutos a 12000 rpm; a continuación, se vacía el alcohol y se seca el sedimento de DNA que el sedimento, ya seco finalmente se suspende en 20 µl de agua bi-destilada.

5.3.2.2. Extracción semiautomatizada mediante el equipo Thermo Scientific KingFisher

Para la extracción se procedió a extraer del alcohol al 70% las patas y cuerpos de los insectos, secadas en papel absorbente, seguidamente se empezó a cortar las patas y cuerpos de cada individuo con ayuda de una hoja de bisturí en cajas petri de vidrio individuales, hasta obtener pequeños pedazos. Estos pedazos fueron trasladados a tubos eppendorf de 1,5 ml debidamente etiquetados con el código de cada insecto y fecha. Se adicionaron a cada muestra 100 μ l de Lysis Buffer KF, 200 μ l de PBS, 25 μ l de proteinasa K y 25 μ l de dTT, con el uso de un pistilo estéril se procedió a la maceración hasta obtener una turbidez en cada tubo. Se utilizó el vórtex para mezclar las muestras y se colocaron a incubar en el thermoshaker a 56°C a 1000 rpm durante toda la noche, para lograr una lisis completa de todos los compuestos proteicos que componen las patas de los insectos. Transcurrido este tiempo, se retiraron las muestras del thermoshaker y fueron mezcladas por vórtex durante 15 segundos. Después se transfirieron 320 μ l de la muestra a la fila A de la placa KF, adicionando PBS si el volumen a transferir era menor a 320 μ l, para completar. Se deja vacía la fila B de la placa porque está reservada para los tips, al igual que filas C, D, E también se dejan vacías, se agrega 900 μ l del Wash Buffer 1 a la fila F, 800 μ l del Wash Buffer 1 a la fila G y 800 μ l del Wash Buffer 2 a la fila H. Se adiciona 100 μ l de Elution Buffer a la tira de elución, a continuación, se depositan la tira de tips en la fila B y se carga la placa y la tira de elución en los respectivos bloques dentro del equipo, se inicia el equipo y se agregaron 25 μ l de las KingFisher Magnetic Beads y 400 μ l del Binding Buffer a la fila A durante el paso para dispensar. Cuando el protocolo se completa, se remueve la placa y la tira de elución para

transferir el eluido de DNA purificado a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 ml debidamente codificado. Las muestras fueron almacenadas a -20°C.

5.3.3. Cuantificación de DNA

Teniendo las extracciones de DNA se procedió a la cuantificación de las muestras mediante el uso del kit “Qubit assays” de Thermo Fisher, el cual está basado en la fluorescencia mediante el sistema Qubit, utilizando tintes selectivos al blanco que emiten fluorescencia cuando se unen a DNA. Determinada la concentración (ng/μl) de material genético de cada individuo, las muestras fueron conservadas a -20°C hasta que sean analizadas.

5.3.4. Amplificación por PCR de los genes

Para la amplificación del citocromo B (mt Cyt B) y del ITS-2, se utilizó un volumen total de 30 μl, que contenían 4 μl de DNA de cada muestra y 26 μl de mix: 3 μl de PCR Buffer 10X, 0,6 μl de dNTPs, 1,2 μl de cada primer (Forward y Reverse) a una concentración de 10 mM, 0,3 μl de Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase , 0,45 μl de MgCl₂ a una concentración de 50 mM y 19,25 μl de H₂O ultra pura.

El mt Cyt B fue amplificado usando los primers: CytB F (5'GGA CGW ATT TAT TAT GGA TC'3) y CytB R (5'GCW CCA ATT CAR GTT ART AA'3), descritos por Lyman et al., (1999), en las siguientes condiciones: 1 ciclo 5 minutos a 95°C, 35

ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y finalmente 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos (Anexo 8).

Las secuencias utilizadas para amplificar ITS-2 fueron: 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., (2001). Las condiciones para la amplificación que se siguieron fueron las siguientes: 1 ciclo 5 minutos a 95°C, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y finalmente 1 ciclo a 72°C durante 5 minutos (Anexo 9).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Veriti® Thermal Cycler, de la marca Thermo Fisher Scientific Invitrogen.

Para confirmar la presencia de amplicones y el tamaño de los productos, se realizó con 5 µl de cada muestra de PCR una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% sembradas con un marcador de peso molecular con un rango de 100-3000 pb.

5.3.5. Secuenciación de los productos de PCR

Una vez confirmados los resultados mediante corrida electroforética, se procedió a purificar y concentrar los fragmentos de DNA con el kit de purificación de DNA illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit de GE Healthcare Life Sciences™ (Anexo 10). Consecutivamente se procedió con el envío de las muestras para su secuenciación al Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasil. Para ello se envió un volumen de 25 µl de cada uno de los productos de la PCR purificados en tubos eppendorf de 1,5 ml debidamente etiquetados con el código de la muestra acompañados de un formulario con los datos correspondientes.

5.3.6. Análisis de las Secuencias.

Después de que las muestras fueron secuenciadas, se procedió a la revisión de la calidad de las mismas mediante el uso del software Chromas 2.6.5 (Technelysium) (Anexo 11). Para la obtención de la secuencia consenso y corrección se empleó el Software SeaView 3.2 (Galtier, Gouy y Gautier, 1996), y la verificación de los fragmentos correctos para el estudio y comparación con otras secuencias publicadas se realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de cada una de las secuencias recibidas de los dos marcadores utilizados para definir las especies.

Mediante el software BioEdit 7.0.4.1 (Hall, 1999) (Anexo 12), se efectuó el alineamiento y edición de todas las secuencias. Con el software DnaSP v6 (Rozas *et al.*, 2017), se logró determinar: el número de sitios polimórficos (S), número total de mutaciones (Eta), el número de sitios únicos (singleton sites), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (Pi); dicho análisis se dividió en dos etapas, en la primera etapa se hizo el análisis de variabilidad de secuencias obtenidas en comunidades positivas y una segunda etapa de análisis de variabilidad con secuencias de referencia obtenidas del banco de datos GenBank[®], las secuencias de referencia nos permitirán realizar el estudio de relaciones filogenéticas, comparando estas secuencias referencia con las secuencias propias. Esta comparación de secuencias para la parte de estudios filogenéticos, se consideró únicamente al gen mitocondrial debido a que para los análisis filogenéticos se usa marcadores no recombinantes, por lo tanto, a partir del total de los haplotipos obtenidos con el programa DNAsp, que contempla secuencias estudiadas y las secuencias de referencia, las cuales fueron sometidas a un análisis filogenético molecular.

Por medio del Software MEGA v6.0 (Tamura *et al.*, 2013), se construyeron árboles filogenéticos a partir del total de haplotipos que fueron determinados mediante el programa DnaSP, en los cuales se incluyeron las secuencias de referencia. El árbol filogenético fue construido para ambos genes, mediante el método estadístico máximo de verosimilitud (Maximum Likelihood), se eligió el mejor modelo con las puntuaciones BIC más bajas (Criterio de Información Bayesiana) que describen mejor el patrón de sustitución, siendo el T92 (+G) (Tamura 3 parámetros) el modelo que mejor se adaptó, la prueba de filogenia fue calculada por el método Bootstrap con 1000 repeticiones.

Con el fin de comprender su expansión geográfica y las relaciones entre los haplotipos del gen mt Cyt B observados en las muestras estudiadas, se construyeron redes de haplotipos utilizando el programa Network v5.0 (Fluxus Technology Ltd.) utilizando el algoritmo Median-Joining: con pre-processing, ϵ igual a 10, standart post-processing.

Donde los círculos de colores representan nuestros haplotipos según ubicación geográfica que representan los haplotipos en estudio determinados previamente, donde el tamaño es proporcional a la frecuencia de cada uno, así como también, la distancia entre los haplotipos es proporcional al número de mutaciones entre ellos, observándose secuencias hipotéticas (a menudo ancestrales) representadas por pequeños nodos color rojo que son requeridas para conectar secuencias existentes dentro de la red con parsimonia máxima.

Estos análisis realizados permiten conocer el nivel de variabilidad genética de los triatomos pertenecientes a diferentes hábitats que habitan zonas urbanizadas cercanas a la ciudad de La Paz, y también nos permiten comprender el proceso de colonización que

se puede dar hacia los hábitats sinantrópicos, debido a una población silvestre permanente en esta región, manteniendo el riesgo de infección de la enfermedad en los seres humanos.

6. Resultados

6.1. Recolección de Triatominos

Las expediciones fueron realizadas en ocho comunidades, de las cuales solo tres resultaron sitios de trapeo positivos.

Fueron un total de 101 triatominos capturados (11 adultos y 90 en estadio ninfal) como se muestra en la Figura 14 y 15. La mayoría de los triatominos fueron capturados en ambientes silvestres cercanos a lugares rocosos con variedad de animales silvestres y alta proliferación de mosquitos debido a elevadas temperaturas; con mayor presencia de estadios ninfales. Los insectos adultos se observaron en los tres ambientes, pero predominando en ambientes peridomésticos (Figura 16; Tabla 3 y 4).

6.2. Estudio Morfológico

Los especímenes adultos fueron identificados según sus características morfológicas como *Triatoma infestans* en poblaciones de Huaywasi, Yanari y Huajchilla, mediante claves dicotómicas provistas por Lent y Wygodzinski, 1979.

Cabeza negra y larga como el pronoto, las antenas insertadas a la mitad de la distancia entre el ápice de la cabeza y el margen anterior de los ojos. Región anteocular

tres veces tan largo como postocular. Pronoto totalmente negro, cuerpo de color marrón, conexivo con manchas transversales amarillo claro, patas oscuras, excepto el trocánter y la región basal de los fémures, que son claros (Figura 17).

Adicionalmente, la caracterización morfológica de los triatomos permitió el hallazgo de un triatomo en tercer estadio ninfal en zona peridomiciliar de la comunidad de Huajchilla distante solo a 20 km de la ciudad de La Paz, con variaciones morfológicas significativas, que difieren a la estructura conocida de estadios ninfales normales del *Triatoma infestans* (Figura 18, 19 y 20).

Estas diferencias se observaron en la coloración de estructuras anatómicas de cabeza, patas y pronoto: i) Ojos compuestos más prominentes, ii) Cuello completamente marrón oscuro. iii) Pronoto oscuro con leves manchas marrones. iv) Patas hasta el tercer segmento con aspecto oscuro; los fémures con leves áreas claras y oscuras, desde el segmento de la tibia presenta tonalidad caoba y el segmento del tarso color marrón amarillento. v) Cuerpo marrón amarillento a marrón oscuro con granulaciones, presentando cabeza y tórax más oscuros; en el abdomen se ve la ausencia de manchas oscuras en el conexivo. vi) Antenas, labio superior e inferior de coloración rojiza.

6.2.1. Determinación de tasa de infección con *Trypanosoma cruzi*

Adicionalmente se analizaron microscópicamente los contenidos rectales de los insectos para detectar la presencia de *Trypanosoma cruzi* y luego se procedió a la disección de los mismos. Se procesaron un total de trece muestras de deyecciones de los triatomos adultos, N4 y N5, de las cuales, tres especímenes de la población de Huayhuasi portaban al parásito de *Trypanosoma cruzi* y ninguna de la población de

Huajchilla, lo que significa una tasa de infección total de 23.07% por *Trypanosoma cruzi*, siendo estas dos localidades las únicas donde se hallaron insectos vectores adultos y en estadio ninfal N4 y N5 (Tabla 5).

6.3. Extracción de DNA, amplificación y selección de muestras para el análisis

Las extracciones de DNA realizadas por método manual y método automatizado resultando exitosas. La extracción manual fue realizada en 35 individuos y 65 individuos por método semiautomatizado.

La amplificación de los fragmentos por medio de ambos marcadores moleculares (ITS-2, mt Cyt B) fue comprobado a través de geles de agarosa al 1%.

De las 100 muestras amplificadas se eligieron 30 muestras más representativas (Tabla 6) para cada gen de cada comunidad positiva para la secuenciación y análisis posteriores.

6.4. Variabilidad genética de individuos de *Triatoma infestans* procedentes del Municipio de Mecapaca (Huayhuasi, Yanari y Huajchilla)

La primera etapa de análisis de variabilidad genética de genes mitocondrial y nuclear con muestras procedentes de las 3 comunidades positivas se realizó con un total de 24 muestras para el marcador mt Cyt B y 10 muestras para ITS-2, sin incluir las secuencias de referencia. La Tabla 7 detalla los índices de variabilidad correspondientes. Mediante este análisis se observó que en ningún gen existen sitios con incertidumbres, una diversidad nucleotídica (P_i) de 0.00067 para mt Cyt B y de 0 para ITS-2, el gen

nuclear muestra que no existe variabilidad a nivel nucleotídico. De una longitud total de 683 pb del fragmento analizado, se encontraron un total de 3 sitios polimórficos para el gen mitocondrial Cyt B de los cuales 1 fue una mutación sinónima y 2 mutaciones no sinónimas. El número de sitios informativos de parsimonia para Cyt B fue 1 y 2 sitios únicos en las posiciones 140 y 579. Se determinaron 4 haplotipos y una diversidad haplotípica (Hd) de 0.370. El contraste es evidente cuando se analiza la variabilidad del gen nuclear ITS-2, la cual es inexistente debido a que no presentó diversidad alguna, haciendo evidente una mayor diversidad en el gen mitocondrial Cyt B frente al gen nuclear ITS-2.

El análisis de variabilidad genética en su segunda etapa, fue realizada considerando secuencias estudiadas y todas las secuencias de referencia halladas en GenBank para cada gen. En el análisis el promedio obtenido de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias (P_i) más bajo fue en el gen nuclear ITS-2 con $P_i = 0,00150$ en cambio, la más alta observada fue en el gen mitocondrial Cyt B con $P_i = 0.02810$ este último no solo mostró ser el más variable a nivel nucleotídico sino también a nivel haplotípico con una diversidad de $H_d = 0.959$ frente al más bajo de $H_d = 0,400$ que corresponde al gen nuclear ITS-2.

6.5. Test de neutralidad selectiva Tajima's D en tres comunidades del Municipio de Mecapaca (Huayhuasi, Yanari y Huajchilla)

La prueba estadística de neutralidad Tajima's D, fue calculada para deducir si la población en estudio proveniente de las tres comunidades positivas se halla incrementando o disminuyendo. El resultado para el gen mt Cyt B en la localidad de

Huayhuasi fue de $D_{HW} = -0,75445$; en Huajchilla de $D_{HJ} = -1,16387$, y para Yanari no se pudo realizar esta prueba debido a los pocos individuos que se obtuvieron. Se obtuvo un resultado global de $D_{global} = -1,08593$, este valor negativo significa un exceso de polimorfismos de baja frecuencia sugiriendo que esta población se encuentra en incremento.

Este estudio no pudo analizarse el gen nuclear ITS-2 debido a que no cuenta sitios polimórficos.

6.6. Análisis filogenético de *Triatoma infestans* mediante árboles y redes

6.6.1. Gen Mitocondrial Cyt B

El análisis filogenético fue realizado a partir de 112 secuencias, 24 de estas secuencias corresponden a secuencias estudiadas y 88 secuencias de referencia halladas en GenBank (Tabla 8), las cuales fueron elegidas bajo la medida de corte de E-value, 6 de estas secuencias dentro la base de datos tenía un porcentaje de 100% de similitud con las secuencias estudiadas (Query Cover), este análisis se generó junto con una secuencia como grupo externo perteneciente a *Triatoma platensis*.

Como se observa en la Tabla 9, a partir de estas 112 secuencias el programa DNAsp generó 68 haplotipos, detectando que las 24 secuencias en estudio se agruparon en 2 haplotipos (HAP1 y HAP62) junto a fragmentos de secuencias de mtCytB previamente informados para *Triatoma infestans* que eran más cortas que las secuencias en estudio (296 pb de diferencia). HAP1 llegaría a ser el haplotipo principal con el 83,33% de los especímenes encontrados agrupados con la secuencia HQ333221

previamente descrita en GenBank perteneciente a insectos de la comunidad de Huayhuasi del Municipio de Mecapaca (Waleckx et al., 2011, p. 1008). Este agrupamiento con esta secuencia descrita tiene bastante sentido debido a que en este haplotipo se hallan 3 secuencias estudiadas que pertenecían también a la comunidad de Huayhuasi, siendo esta la comunidad en estudio geográficamente ubicada más al Sur, sin embargo, dentro de este haplotipo se encontraron individuos pertenecientes a comunidades estudiadas ubicadas más al norte en zonas urbanizadas como la comunidad de Huajchilla.

HAP62 fue encontrado en el 16,67% de los especímenes, se compartió en las 3 comunidades positivas, que fueron agrupados con la secuencia del banco de genes HQ333216 perteneciente a la región geográfica de los valles andinos de La Paz (ver tabla 8).

En estudios anteriores estos haplotipos se encontraron solamente en poblaciones recolectadas en los valles andinos de La Paz, por lo tanto, coincide con los resultados obtenidos en esta investigación puesto que ambos haplotipos (HAP1, HAP62) fueron compartidos entre las poblaciones en estudio, siendo los únicos haplotipos hallados en el estudio.

La figura 21 ilustra el árbol filogenético de máximo de verisimilitud del gen mitocondrial Cyt B, donde se observa la notable diferencia entre especies producto de un ancestro común, evidenciando la distancia genética existente entre la especie *Triatoma infestans* y la especie *Triatoma platensis* (HAP2). Dentro la especie *Triatoma infestans*, se distingue 2 ramas principales que divergen directamente del ancestro principal para esta especie, la primera rama que agrupa haplotipos propios de la región de valles Andinos de La Paz con un bootstrap de 86 y una segunda rama con un Bootstrap de 87

del cual se observa la estructuración de 2 grupos débilmente diferenciados: el primero corresponde a HAP4 haplotipo de referencia proveniente del Departamento de Chuquisaca y el segundo que se subestructura con un grupo donde se encuentra HAP22 (Dep. Chuquisaca) y un segundo grupo que se subestructura dividiendo dos ramas: una rama significativa con un 86 de Bootstrap que agrupa a haplotipos de los Departamentos de Chuquisaca y Cochabamba (HAP16, HAP23) y otra rama con poca diferenciación que genera más ramas pero con débiles Bootstrap (HAP13, HAP14, HAP15, HAP17, HAP21, HAP63, HAP66, HAP67, HAP68) agrupando a haplotipos pertenecientes a la zona centro y sur Andina boliviana; hasta llegar a una estructura con un Bootstrap no tan significativo de 55 la cual se subestructura dando origen a haplotipos propios de regiones no Andinas no solo de Bolivia sino también de otros países. De esta región no Andina resalta la fuerte diferenciación de haplotipos nacionales HAP60, HAP61 (Dep. Tarija) y haplotipos de Paraguay (HAP6, HAP20), soportados por un Bootstrap de 97 y 94 respectivamente.

Usando el mismo conjunto de datos se contempla en la figura 22, la red filogenética del gen mt Cyt B que confirma la distancia evolutiva entre la especie de *Triatoma infestans* y *Triatoma platensis*, se diferenciaron y evolucionaron por separado. Muestra también un nodo interno principal constituido por HAP4, haplotipo descrito en el Departamento de Chuquisaca (número de acceso: AY702022), el cual está vinculado con los haplotipos en estudio y con haplotipos exclusivos de Bolivia. De este nodo principal se derivan dos ramas de haplotipos, la primera rama se conecta con HAP62 que pertenece a los haplotipos característicos de los valles Andinos de La Paz mostrando una amplia separación entre ellos; una segunda rama que se conecta con HAP15 y este a su vez con otros haplotipos más cercanos, informados solo en Bolivia, y este a su vez se

conecta con un nodo interno secundario interno HAP5 perteneciente a la región nacional no Andina (Dep. de Tarija), del cual se derivan todos los demás haplotipos del área no andina (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay). Este análisis de redes muestra nuevamente lo observado en el árbol filogenético.

7. Discusión

En el presente estudio se desarrolló un enfoque de análisis morfológico y genético al vector de la enfermedad de Chagas, que actualmente está circulando en zonas urbanas del Municipio de Mecapaca cercanas a la ciudad de La Paz que presentaron un alto crecimiento demográfico en los últimos años. Con el objetivo de explorar si existen cambios morfológicos en *Triatoma infestans* y de examinar la diversidad genética dentro y entre poblaciones de *Triatoma infestans* hallados en diferentes entornos, en nuevas zonas urbanizadas de la ciudad de La Paz.

7.1. Estudio morfológico, tasas de infección, factor de riesgo por crecimiento de la región metropolitana y su efecto en la salud

Considerando que la actividad en Bolivia para el control de la enfermedad de Chagas ha permitido alcanzar una situación nacional estable en el control vectorial con una tendencia descendente de 3,2% en vivienda durante la gestión 2011 a 1,9 % para el año 2016 (Programa Nacional de Vigilancia y Control Integral de la Enfermedad de Chagas, 2017). No obstante, los resultados del presente estudio reflejan la problemática a la cual nos enfrentamos cuando la población de una ciudad se expande alterando el medio ambiente, actualmente la región metropolitana no solo está compuesta de la

ciudad de La Paz y la ciudad de El Alto, si no también comprende los municipios Mecapaca, Palca, Achocalla, Laja y Viacha (SIMRED-La Paz). El crecimiento de la región metropolitana es a nivel mundial debido al acelerado crecimiento urbano lo cual tiene un profundo efecto en la salud, ya que, las ciudades se están convirtiendo en centros importantes para la transmisión de enfermedades infecciosas, como lo demuestran las pandemias recientes (Alirol, et al., 2011).

Si bien en los últimos años las actividades de vigilancia y control del *Triatoma infestans* ha sido priorizada y eficaz en el Departamento de La Paz, declarado en el 2011 como libre de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas, los resultados obtenidos demuestran la prevalencia de este vector distribuido en diferentes ambientes del área estudiada, ya que es una especie con una gran habilidad de adaptación a ambientes humanos disponibles, como son los microambientes creados en estructuras domésticas y peridomésticas (Gorla, 2002). Esto crea un problema, debido a la existencia de poblaciones silvestres de *Triatoma infestans* que pueden reinfestar viviendas de comunidades ya controladas (Breniere et al., 2012) o infestar por primera vez viviendas recientemente construidas en dichas comunidades debido al crecimiento urbano.

Se obtuvo 101 especímenes morfológicamente identificados como *Triatoma infestans* capturados en ambientes domésticos, peridomésticos y silvestres con una tasa de infección total de 23,07% por *Trypanosoma cruzi*. Un hecho relevante fue que en una población más urbanizada como Huajchilla, distante solo a 20 km de la ciudad de La Paz que cuenta con mayor cantidad de casas, se ha dado el hallazgo de triatomos adultos y en estadio ninfal de la especie *Triatoma infestans* lo cual, da cuenta de la propagación del insecto vector de la enfermedad de Chagas desde poblaciones geográficamente bajas

hacia poblaciones más urbanizadas cercanas a la ciudad de La Paz, el número de triatomino hallados fue menor por no tener condiciones de hábitat natural (Gottdenker et al., 2012). Además, en esta zona se encontró un mayor número de insectos adultos en ambiente peridoméstico. Adicionalmente, si bien los insectos adultos no presentaron variaciones en sus caracteres morfológicos externos propios de la especie, en esta locación fue hallado un triatomino en tercer estadio ninfal con morfología diferente a las de estadios ninfales normales de *Triatoma infestans*, lo cual demostraría la hipótesis de que el insecto estaría adaptándose a nuevas condiciones de hábitat ya que los cambios normales del triatomino desde los estadios ninfales al adulto están dados por el desarrollo hemimetabólico y puede cambiar como respuesta fisiológica a los cambios ambientales (Cristi, 2001).

Las observaciones morfológicas podrían ser indicios de nuevos patrones de distribución geográfica, ecológica y cambios ambientales, como el aumento de temperatura que potenciaría la dispersión y proliferación más extensa de los vectores, lo cual genera un riesgo potencial en la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en las poblaciones estudiadas, lo cual corrobora lo mencionado por investigadores argentinos respecto a que las variaciones térmicas podrían contribuir a la identificación no sólo de las áreas de distribución de estos vectores, y por lo tanto de transmisión del Chagas, sino también las nuevas áreas potenciales de transmisión como consecuencia del cambio climático global (Schilman y de la Vega, 2015).

7.2. Variabilidad genética de individuos de *Triatoma infestans* procedentes del Municipio de Mecapaca (Huayhuasi, Yanari y Huajchilla)

7.2.1. Variabilidad genética mediante el marcador ITS-2

Para la realización de este análisis se seleccionó ITS-2 como marcador debido a su reconocida utilidad en la diferenciación de taxones, análisis de especies y subespecies, pero sobre todo a la información proporcionada acerca de eventos evolutivos en los linajes de triatominos. Aun así, el estudio basado en 10 especímenes de *Triatoma infestans* de tres localidades urbanizadas del Municipio de Mecapaca (Huayhuasi, Yanari y Huajchilla) utilizando secuencias de DNA ribosomal nuclear (ITS-2), revela muy poca variación genética al no mostrar la presencia de polimorfismos y carencia de diversidad dentro de las muestras analizadas evidenciando ser un gen conservado, limitando los análisis de genética de poblaciones; estos resultados concuerdan con lo indicado por Monteiro (2017), que indica que los genes nucleares son generalmente más conservados que genes mitocondriales.

Este bajo nivel de polimorfismo fue resaltante cuando se buscó secuencias de referencias en GenBank, dado que fueron pocas secuencias halladas para *Triatoma infestans* con este marcador genético y la mayoría de las secuencias pertenecían a áreas no Andinas demostrando lo sugerido por Waleckx (2011), que en la región andina boliviana la propagación de poblaciones selváticas es más reciente revelando un monomorfismo de ITS-2 en la región Andina.

Debido a que los resultados obtenidos no fueron informativos no se realizaron más análisis con este gen, considerándolo un gen con baja utilidad para el análisis de poblaciones procedentes de los Valles de La Paz.

7.2.2. Variabilidad genética mediante el marcador mt Cyt B

Es muy útil trabajar con marcadores moleculares mitocondriales porque brindan un buen soporte entre haplotipos debido a que establecen las diferencias entre individuos de una misma especie, junto con su herencia casi exclusivamente materna, este marcador permite realizar una clara conexión entre los grupos establecidos durante el análisis (Lanteri y Confalonieri, 2003; Avise, 2000).

Los resultados que se obtuvo con este marcador muestran un alto polimorfismo demostrando ser muy útil para el estudio de la estructura de las poblaciones. Dentro de los parámetros determinados se encontró una mayor diversidad haplotípica (H_d) junto con una baja diversidad nucleotídica (P_i) en especímenes hallados, proponiendo que esta especie ha sufrido una situación de cuello de botella, generando una pérdida de la variabilidad genética en poblaciones de *Triatoma infestans* estudiadas, seguido de un crecimiento acelerado de la población junto a una acumulación de mutaciones (Grant y Bowen, 1998), es decir, una acumulación de variaciones puntuales de bases. Además, mediante el test de neutralidad Tajima's D realizado se pudo observar un valor negativo $D_{global} = -1,08593$, lo cual propone que la población se encuentra incrementándose, una expansión reciente.

7.3. Análisis filogenético de *Triatoma infestans* mediante árboles y redes

Según Schofield (1988), *Triatoma infestans* tiene un origen geográfico en los valles Andinos de Bolivia siendo esta región el centro de origen y expansión de

Triatoma infestans en los países del sur de América del Sur. Esta deducción fue generada debido al hallazgo de un foco silvestre de la especie solo en valles andinos, generando el proceso de domesticación de esta especie que dataría de la época precolombina y estaría asociado con la adquisición de la vida sedentaria por poblaciones preincaicas y la cría doméstica del conejillo de indias (*Cavia porcellus*).

Es por ello que se realizaron numerosos estudios de comparación entre especímenes de regiones Andinas y no Andinas. Estos estudios determinaron estos orígenes de distribución comparando la variabilidad genética de las poblaciones estudiadas, ya que las poblaciones más antiguas son las que presentan los mayores índices de variabilidad (Schofield y Dias, 1999). A pesar de los diferentes resultados entre estas investigaciones, no cabe duda de que *Triatoma infestans* es originario de Bolivia. La dispersión de *Triatoma infestans* de Bolivia al resto del Cono Sur resultó en grandes cambios genéticos, principalmente evidenciados por la pérdida de DNA de los especímenes en regiones no Andinas (Panzera et al., 2004).

De la misma manera, los resultados obtenidos en esta investigación del análisis filogenético mediante árboles y redes demostraron que existen haplotipos exclusivos para las regiones andinas y no andinas dentro del país; las secuencias nacionales se agruparon en un solo haplotipo, ya sean con varias o individualmente en un solo haplotipo todas pertenecían a haplotipos encontrados en el país, el mismo fenómeno fue observado en haplotipos de referencia, se observó también un haplotipo en común originario al sur de Bolivia, en el Departamento de Tarija cerca de la frontera con Argentina, originando la ocurrencia de una segunda expansión poblacional de *Triatoma infestans*, teniendo el norte de Argentina como centro de dispersión (Panzera et al., 2007).

Fue notable que los nodos internos son ancestrales, mientras que los nodos terminales son más recientes, notándose que haplotipos hallados en Huayhuasi, Yanari y Huajchilla son propios de esta región, estos 2 haplotipos coincidieron con haplotipos ya encontrados en los valles Andinos de La Paz (Waleckx et al., 2011) pertenecientes a la comunidad de Huayhuasi, lo que resulta interesante es que en nuestro estudio el mismo haplotipo que fue hallado solo en Huayhuasi, fue hallado en las 3 poblaciones positivas de la presente investigación. Este hecho es resaltante debido a que el punto de captura de triatomíneos en la comunidad de Huajchilla se encuentra a 8,35 Km. de Huayhuasi (Anexo 13), siendo la comunidad positiva intermedia Yanari (ubicada a 5,47 Km. de Huayhuasi).

Este hallazgo revela el importante flujo que hay en la región, el flujo existente dentro de estas comunidades que en la actualidad son zonas completamente urbanizadas. El encontrar especímenes de *Triatoma infestans* en Huajchilla llama mucho la atención por la cercanía que tiene a la ciudad de La Paz ubicada aproximadamente a 10 Km. de distancia de la zona de Mallasa que se encuentra al sur de la ciudad (Anexo 14), y por ser considerada un lugar ya controlado, sin infestación. Por lo cual se hace evidente la migración de poblaciones residuales de *Triatoma infestans*, las cuales conviven con habitantes de estas nuevas áreas metropolitanas, que, con el crecimiento de construcciones de viviendas, generan un desequilibrio en los ecotopos definidos convirtiendo a poblaciones silvestres en poblaciones peridomésticas porque crean un radio no mayor a cien metros entre el domicilio y al hábitat silvestre de *Triatoma infestans*. Generando un riesgo de infestación doméstica.

8. Conclusiones

- El estudio permitió constatar en que los valles de La Paz las poblaciones de triatominos aún no se dispersaron en regiones con altitudes por encima de los 3000 m s.n.m., de hecho, las poblaciones negativas resultaron ser las que se encontraban a altitudes entre los 3011-3703 m s.n.m., esto podría explicarse por la diferencia de habitantes en las áreas estudiadas, debido a que el mayor número de triatominos fueron hallados en comunidades con un mayor número de habitantes a una altitud entre 2803-2960 m s.n.m. que superan con 160 m al rango de altitud registrada (1700-2800 m s.n.m.) donde las poblaciones de *Triatoma infestans* están muy extendidas.
- Se identificó a *Triatoma infestans* por sus características morfológicas propias de la especie sin cambios entre los especímenes adultos y N1, sin embargo se halló un triatomino en tercer estadio ninfal con morfología diferente en comparación a otras ninfas con el mismo estadio las cuales presentaban características ninfales normales de *Triatoma infestans*, lo cual sugiere de que el insecto estaría sufriendo adaptaciones a nuevas condiciones de hábitat, por la intromisión del hombre, generando un cambio en su desarrollo como respuesta fisiológica a los cambios ambientales.
- El análisis de la estructura genética de *Triatoma infestans* permite conocer el nivel de variabilidad genética de los triatominos que habitan zonas urbanizadas cercanas a la ciudad de La Paz, los resultados revelan que esta especie ha sufrido una situación de cuello de botella, generando una pérdida de la variabilidad

genética entre su población con un posterior crecimiento de la población junto a una acumulación de mutaciones.

- Se evidencio que los valles de La Paz poseen haplotipos propios, siendo resaltante que se haya encontrado un haplotipo anteriormente identificado solo en Huayhuasi, el cual en este estudio fue identificado también en Huajchilla que se encuentra más al norte, manifestando el flujo que hay de estas poblaciones de *Triatoma infestans* hacia regiones geográficamente más elevadas y que actualmente tiene mayor urbanización.
- Los nuevos patrones de distribución geográfica, ecológica y cambios ambientales, como el aumento de temperatura son los factores que potencian la dispersión y una proliferación más extensa de los triatomos, generando un riesgo potencial en la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en zonas urbanas y aledañas estudiadas.
- Estos resultados reflejan la problemática a la cual nos enfrentamos cuando la población de una ciudad se expande alterando el medio ambiente convirtiendo poblaciones silvestres en peridomésticas; se reflejó la prevalencia de poblaciones residuales de *Triatoma infestans* en diferentes ambientes del área estudiada, demostrando ser una especie con una gran habilidad de adaptación a ambientes humanos disponibles, como son los microambientes creados en estructuras domésticas y peridomésticas.

9. Bibliografía

- Alirol, E., Getaz, L., Stoll, B., Chappuis, F., & Loutan, L. (2011). Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. *The Lancet Infectious Diseases*, *11*(2), 131–141. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(10\)70223-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(10)70223-1)
- Aparicio, M. (2013). Evaluación participativa del cambio climático y la variabilidad del clima en las ciudades ubicadas en ecosistemas de montaña. In OPS (Ed.), *Evaluación participativa del cambio climático y la variabilidad del clima en las ciudades ubicadas en ecosistemas de montaña* (pp. 22-24). Washington, DC, Estados Unidos de América: OPS.
- Avise, C.J. (2000). *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts.
- Barata, J. M. S. (1981). Aspectos morfológicos de ovos de triatominae: II - Características macroscópicas e exocoriais de dez espécies do gênero *Rhodnius* Stal, 1859 (Hemiptera - Reduviidae). *Revista de Saúde Pública*, *15*(5), 490–542. <https://doi.org/10.1590/s0034-89101981000500006>
- Bargues, M. D., Klisiowicz, D. R., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J. M., Monroy, C., Ponce, C., . . . Mas-Coma, S. (2008). Phylogeography and Genetic Variation of *Triatoma dimidiata*, the Main Chagas Disease Vector in Central America, and Its Position within the Genus *Triatoma*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *2*(5), 233. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000233>

- Bargues, M. D., Schofield, C., & Dujardin, J. (2010). Classification and Phylogeny of the Triatominae. *American Trypanosomiasis*, , 117–147. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384876-5.00006-x>
- Bern, C., & Montgomery, S. (2009). An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 49(5), 52–54. <https://doi.org/10.1086/605091>
- Bowman, N., Kawai, V., Levy, M., Cornejo del Carpio, J., Cabrera, L., Delgado, F., . . . Bern, C. (2008). Chagas Disease Transmission in Periurban Communities of Arequipa, Peru. *Clinical Infectious Diseases*, 46(12), 1822–1828. <https://doi.org/10.1086/588299>
- Brener, Z. (1992). *Trypanosoma cruzi*: Taxonomy, Morphology and Life Cycle. Recuperado 10 agosto, 2018, de <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter3.html>
- Brenière, S. F., Salas, R., Buitrago, R., Brémond, P., Sosa, V., Bosseno, M., . . . Barnabé, C. (2013). Wild Populations of *Triatoma infestans* Are Highly Connected to Intra-Peridomestic Conspecific Populations in the Bolivian Andes. *PLoS ONE*, 8(11), 80786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080786>
- Buitrago, R., Bosseno, M., Depickère, S., Waleckx, E., Salas, R., Aliaga, C., . . . Brenière, S. F. (2016). Blood meal sources of wild and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia: connectivity between cycles of transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1499-0>
- Buitrago, R., Vidaurre, P., Zoveda, F., Brenière, S. F., Waleckx, E., Salas, R., . . . Mamani, E. (2010). First Report of Widespread Wild Populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the Valleys of La Paz, Bolivia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 574–579. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0325>
- Carcavallo, R. U. (1999). Climatic factors related to Chagas disease transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl 1), 367–369. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700071>

- Castro, I., Andrade, J. P., Paola, A. A. V., Vilas-Boas, F., Oliveira, G. M. M., Marin Neto, J. A., . . . Oliveira Junior, W. A. (2011). I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, *97*(2), 01–48. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2011001600001>
- Cavalcanti LPG, Rolim DB, Pires-Neto RJ, Vilar DCLF, Nogueira JOL, Pompeu MML, Teixeira MJ, Sousa AQ (2009). Microepidemics of acute Chagas disease by oral transmission in Ceará. *Cad Saude Colet* *17*: 911-921.
- Corey, A. B., Sonetti, D., Maloney, J. D., Montgomery, S. P., Rademacher, B. L., Taylor, L. J., . . . Striker, R. (2017). Transmission of Donor-Derived *Trypanosoma cruzi* and Subsequent Development of Chagas Disease in a Lung Transplant Recipient. *Case Reports in Infectious Diseases*, *2017*, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2017/5381072>
- Cortez, M. R., Pinho, A. P., Cuervo, P., Alfaro, F., Solano, M., Xavier, S. C., . . . Jansen, A. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): Ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Experimental Parasitology*, *114*(4), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.04.010>
- Coura, J. R. (2014). The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *110*(3), 277–282. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140362>
- De la Vega, G. J., Medone, P., Ceccarelli, S., Rabinovich, J., & Schilman, P. E. (2015). Geographical distribution, climatic variability and thermo-tolerance of Chagas disease vectors. *Ecography*, *38*(8), 851–860. <https://doi.org/10.1111/ecog.01028>
- De Lizarraga, R., (1928). Descripción Colonia, Libro Primero, Lib. La Facultad, second ed. Buenos Aires, pp. 220, 221.
- Dias, E., & Torrico, R. A. (1943). Estudos preliminares sobre a doença de Chagas na Bolívia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *38*(2), 165–172. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761943000200003>

- Dias, J. C. P. (1989). The indeterminate form of human chronic Chagas' disease: a clinical epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22(3), 147–156. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821989000300007>
- Dias, J., & Schofield, C. (1999). The evolution of Chagas disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl 1), 103–121. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700011>
- Dias, J. C. P. (2007). Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusion Chagas disease: historical aspects, present situation, and perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(suppl 1), 11–18. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000092>
- Dias, J. P., Bastos, C., Araújo, E., Mascarenhas, A. V., Martins Netto, E., Grassi, F., . . . Aras, R. (2008). Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(3), 296–300. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000300014>
- Dujardin, J., Panzera, P., & Schofield, C. (1999). Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl 1), 223–228. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700036>
- Dujardin, J. P., Schofield, C. J., & Panzera, F. (2002). *Los Vectores de la Enfermedad de Chagas*. Recuperado de <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010055328>
- Dujardin, J., Costa, J., Bustamante, D., Jaramillo, N., & Catalá, S. (2009). Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. *Acta Tropica*, 110(2-3), 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.026>
- Fabbro, D. L., Danesi, E., Olivera, V., Codebó, M. O., Denner, S., Heredia, C., . . . Sosa-Estani, S. (2014). Trypanocide Treatment of Women Infected with *Trypanosoma cruzi* and Its Effect on Preventing Congenital Chagas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), 3312. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003312>
- Fernández A., Salazar E., Ortiz L., Palacios A., Rojas M. (2016). Vigilancia entomológica con participación comunitaria para el control de la enfermedad de

Chagas en el barrio el constructor de la ciudad de Tarija-Bolivia. *Revista Ventana Científica*, 7, 1-9.

- Fitzpatrick, S., Feliciangeli, M. D., Sanchez-Martin, M. J., Monteiro, F. A., & Miles, M. A. (2008). Molecular Genetics Reveal That Silvatic *Rhodnius prolixus* Do Colonise Rural Houses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(4), 210. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000210>
- Flores-Chavez, M., Fernandez, B., Puente, S., Torres, P., Rodriguez, M., Monedero, C., . . . Canavate, C. (2008). Transfusional Chagas Disease: Parasitological and Serological Monitoring of an Infected Recipient and Blood Donor. *Clinical Infectious Diseases*, 46(5), 44–47. <https://doi.org/10.1086/527448>
- Forattini, O. P., Rocha e Silva, E. O., Ferreira, O. A., Rabello, E. X., & Pattoli, D. G. B. (1971). Aspectos ecológicos da tripanossomose americana: III - dispersão local de triatomíneos, com especial referência ao *Triatoma sordida*. *Revista de Saúde Pública*, 5(2), 193–205. <https://doi.org/10.1590/s0034-89101971000200002>
- Galtier, N., M. Gouy and C. Gautier (1996). "SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny." *Comput. Appl. Biosci.* 12(6): 543- 548.
- García, B. A., & Powell, J. R. (1998). Phylogeny of Species of *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Journal of Medical Entomology*, 35(3), 232–238. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.3.232>
- Giordano, R., Cortez, J. C. P., Paulk, S., & Stevens, L. (2005). Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 753–760. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000700014>
- Gorla, D. (2002). Variables ambientales registradas por sensores remotos como indicadores de la distribución geográfica de *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae). *Ecología austral*, 12(2), 117-127. Recuperado en 22 de abril de 2018, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2002000200005&lng=es&tlng=es.

- Gottdenker, N. L., Chaves, L. F., Calzada, J. E., Saldaña, A., & Carroll, C. R. (2012). Host Life History Strategy, Species Diversity, and Habitat Influence Trypanosoma cruzi Vector Infection in Changing Landscapes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), 1884. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001884>
- Grant, I. H., Gold, J. W., Wittner, M., Tanowitz, H. B., Nathan, C., & Mayer, K. (1989). Transfusion-Associated Acute Chagas Disease Acquired in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 111(10), 849. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-111-10-849>
- Guillén, G. (2002). *El control de la Enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América* (1st ed., p. 110). Organización Panamericana de la Salud.
- Gurevitz, J. M., Gaspe, M. S., Enriquez, G. F., Provecho, Y. M., Kitron, U., & Gürtler, R. E. (2013). Intensified Surveillance and Insecticide-based Control of the Chagas Disease Vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(4), 2158. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002158>
- Hack, W. (1955) Estudios sobre biología del *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae) An Inst Med Regional. 4:125–147
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Health Organization, World. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Wkly. Epidemiol. Rec. 90. 33-43.
- Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S. E., Sachs, J. D., & Savioli, L. (2007). Control of Neglected Tropical Diseases. *New England Journal of Medicine*, 357(10), 1018–1027. <https://doi.org/10.1056/nejmra064142>
- Informe Situacional de la Epidemiología y el Control de la Enfermedad de Chagas en Bolivia. (2011). *Gaceta Médica Boliviana*, 34(1), 57. Recuperado en 03 de febrero de 2017, de

http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662011000100015&lng=es&tlng=es.

Instituto Nacional de Estadística (INE), (2012), Censo de Población y vivienda. Recuperado en 29 de febrero de 2018, de <http://www.ine.gob.bo>.

Jackson, Y., Alirol, E., Getaz, L., Wolff, H., Combescure, C., & Chappuis, F. (2010). Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 51(10), 69–75. <https://doi.org/10.1086/656917>

Lanteri, A., Confalonieri, V. (2003). Filogeografía : Objetivos , Métodos y Ejemplos. Una perspectiva Latinoamericana a la Biogeografía pp 185–193.

Lehane, M., & Schofield, C. (1976). Preliminary report on flight by some triatomine bugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(5-6), 526. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(76\)90143-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(76)90143-7)

Lent, H., & Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. Bulletin of the AMNH ; v. 163, article 3. Recuperado 5 febrero, 2018, de <http://digitallibrary.amnh.org/handle/2246/1282>

Lehane, M., McEwen, P., Whitaker, C., & Schofield, C. (1992). The role of temperature and nutritional status in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, 52(1), 27–38. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(92\)90004-h](https://doi.org/10.1016/0001-706x(92)90004-h)

Levy, M. Z., Barbu, C. M., Castillo-Neyra, R., Quispe-Machaca, V. R., Ancca-Juarez, J., Escalante-Mejia, P., . . . Naquira-Velarde, C. (2014). Urbanization, land tenure security and vector-borne Chagas disease. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1789), 20141003. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1003>

Lima, M. M., Jurberg, P., & Almeida, J. R. (1987). Behavior of triatomines (Hemiptera: Reduviidae) vectors of Chagas' disease: III. Influence of the number of matings on the fecundity and fertility of *Panstrongylus megistus* (Burm. 1835) in the

- laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82(1), 37–41. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761987000100006>
- Lyman, D. F., Monteiro, F. A., Escalante, A. A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D. M., Dujardin, J. P., & Beard, C. B. (1999). Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease.. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(3), 377–386. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/Mitochondrial-DNA-sequence-variation-among-vectors-Lyman-Monteiro/dee890737ed7d6d61bc73fe4e102e8c392af9df5>
- Marcilla, A., BARGUES, M. D., Ramsey, J. M., Magallon-Gastelum, E., Salazar-Schettino, P. M., Abad-Franch, F., . . . Mas-Coma, S. (2001). The ITS-2 of the Nuclear rDNA as a Molecular Marker for Populations, Species, and Phylogenetic Relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(1), 136–142. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0864>
- Márquez, Eva, Crespo, Marta, Mir, Marisa, Pérez-Sáez, María J., Quintana, Salvador, Barbosa, Francesc, & Pascual, Julio. (2013). Enfermedad de Chagas y donación renal. *Nefrología (Madrid)*, 33(1), 128-133. <https://dx.doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2012.Sep.11636>
- Medone, P., Ceccarelli, S., Parham, P. E., Figuera, A., & Rabinovich, J. E. (2015). The impact of climate change on the geographical distribution of two vectors of Chagas disease: implications for the force of infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1665), 20130560. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0560>
- Monte Gonçalves, T. C., & Costa, J. (2017, 29 junio). Portal Chagas. Recuperado 1 agosto, 2018, de <http://chagas.fiocruz.br/sessao/vetor/>
- Monteiro, F. A., Pérez, R., Panzera, F., Dujardin, J., Galvão, C., Rocha, D., . . . Beard, C. B. (1999). Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl 1), 229–238. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700037>

- Monteiro, F., Marcet, P., & Dorn, P. (2010). Population Genetics of Triatomines. *American Trypanosomiasis*, , 169–208. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384876-5.00008-3>
- Monteiro, F. (2017, 29 junio). Portal Chagas. Recuperado 3 septiembre, 2018, de <http://chagas.fiocruz.br/>
- Murcia, L., Carrilero, B., Munoz-Davila, M. J., Thomas, M. C., López, M. C., & Segovia, M. (2012). Risk Factors and Primary Prevention of Congenital Chagas Disease in a Nonendemic Country. *Clinical Infectious Diseases*, 56(4), 496–502. <https://doi.org/10.1093/cid/cis910>
- Neiva, A. (1913). Informações sôbre a biologia da vinchuca, *Triatoma infestans* Klug. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 5: 24-31.
- Noireau F. (1999) La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. In: Alfred Cassab J.R., Noireau François, Guillen G. Chagas: la enfermedad en Bolivia: conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002). La Paz (BOL); La Paz: Ministerio de Salud y Prevision Social; IRD, 17-47.
- Noireau, F. (2009). Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(suppl 1), 60–64. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900010>
- Noireau, F., Abad-Franch, F., Valente, S. A., Dias-Lima, A., Lopes, C. M., Cunha, V., . . . Jurberg, J. (2002). Trapping Triatominae in Silvatic Habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 61–63. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000100009>
- Noireau, F., Bastrenta, B., Catalá, S., Dujardin, J., Panzera, F., Torres, M., . . . Jurberg, J. (2000). Sylvatic population of *Triatoma infestans* from the Bolivian Chaco: from field collection to characterization. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(suppl 1), 119–122. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000700020>

- Noireau, F., Carbajal-de-la-Fuente, A. L., Lopes, C. M., & Diotaiuti, L. (2005). Some considerations about the ecology of Triatominae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3), 431–436. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652005000300006>
- NOIREAU, F., CORTEZ, M., MONTEIRO, F., JANSEN, A., & TORRICO, F. (2005). Can wild foci in Bolivia jeopardize Chagas disease control efforts? *Trends in Parasitology*, 21(1), 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.10.007>
- Noireau, F., & Dujardin, J. (2001). Flight and nutritional status of sylvatic *Triatoma sordida* and *Triatoma guasayana*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(3), 385–389. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000300018>
- Noireau, F., & Dujardin, J. (2010). Biology of Triatominae. *American Trypanosomiasis*, 149–168. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384876-5.00007-1>
- Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J., & Araujo, W. N. (2009). Oral Transmission of Chagas Disease by Consumption of Açaí Palm Fruit, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), 653–655. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081450>
- Oliva, M. (2015). *Péptido natriurético Nt pro BNP en la fase crónica sin patología demostrable de la Enfermedad de Chagas, utilidad y aplicabilidad clínica*. Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar>
- PAHO. (2011). Bolivia alcanza un hito clave en la lucha contra la enfermedad de Chagas. Recuperado 22 enero, 2017, de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=7753&Itemid=39693&lang=en
- Pan American Health Organization (2007) Health in the Americas 2007. Regional, scientific and technical publication 622. Washington (D.C.): Pan American Health Organization
- Pan American Health Organization. (2016). Información general: Enfermedad de Chagas. Recuperado 22 febrero, 2017, de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856

%3A2011-informacion-general-enfermedad-chagas&catid=3591%3Achagas-disease&Itemid=0&lang=es

Panzer, F., Dujardin, J. P., Nicolini, P., Caraccio, M. N., Rose, V., Tellez, T., . . . Pérez, R. (2004). Genomic Changes of Chagas Disease Vector, South America. *Emerging Infectious Diseases*, 10(3), 438–446. <https://doi.org/10.3201/eid1003.020812>

Panzer F, Ferrandis I, Calleros L, Lucero C, Ferreiro MJ, Panzer Y e Perez R (2007) Aportes recientes de la citogenetica al estudio de los vectores de la enfermedad de Chagas. In: Arias AR e Maldonado M. Taller Del Cono Sur, actualizacion de la tripanosomiasis americana. Paraguay, 233 pp;

Panzer F, Perez R, Lucero C, Ferrandis I, Ferreiro MJ, Calleros L e Romero V (2007) Cambios genomicos en la subfamilia Triatominae, com enfasis en Triatoma infestans. In: Rojas Cortez M. Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud y Deportes, Programa Nacional de Chagas, Bolivia. 352 pp;

Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31612-4)

Piccinali, R. V., Marcet, P. L., Noireau, F., Kitron, U., GÜrtler, R. E., & Dotson, E. M. (2009). Molecular Population Genetics and Phylogeography of the Chagas Disease Vector *Triatoma Infestans* in South America.. *Journal of medical entomology*, 46(4), 796–809. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2777637/>

Pita, S., Panzer, F., Vela, J., Mora, P., Palomeque, T., & Lorite, P. (2017). Complete mitochondrial genome of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae,

- Triatominae), main vector of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.003>
- Pizarro, J. C., Gilligan, L. M., & Stevens, L. (2008). Microsatellites Reveal a High Population Structure in *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(3), 202. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000202>
- Ponce, C.L. (1946). Enfermedad de Chagas en Bolivia. *Rev. Med. Chile* 74, 349.
- Portal Juridico LexiVox. (2006, 23 marzo). Bolivia: Ley N° 3374, 23 de marzo de 2006. Recuperado 22 abril, 2018, de <https://www.lexivox.org/norms/BO-L-3374.xhtml>
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(01)00065-2)
- Programa Nacional de Vigilancia y Control Integral de la Enfermedad de Chagas. (2015) Anuario Epidemiología 2015. La Paz: Ministerio de Salud Dirección General de Servicios de Salud Unidad de Epidemiología.
- Programa Nacional de Vigilancia y Control Integral de la Enfermedad de Chagas. (2017) Anuario Epidemiología 2016. La Paz: Ministerio de Salud Dirección General de Servicios de Salud - Unidad de Epidemiología - Centro Nacional de Enlace.
- Rassi, A., De Rezende, J. M., Luquetti, A. O., & Rassi, A. (2010). Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. *American Trypanosomiasis*, , 709–741. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384876-5.00027-7>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)60061-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)60061-x)
- Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., De Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A. J., . . . Muñoz, J. (2015). Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLOS*

- Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 0003540.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>
- Richer, W., Kengne, P., Cortez, M. R., Perrineau, M. M., Cohuet, A., Fontenille, D., & Noireau, F. (2007). Active dispersal by wild *Triatoma infestans* in the Bolivian Andes. *Tropical Medicine & International Health*, 12(6), 759–764.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01846.x>
- Riera, C., Fisa, R., Martin, C., Guarro, A., Castro, M., Jorba, J. M., . . . Portús, M. (2006). Congenital Transmission of *Trypanosoma Cruzi* in Europe (Spain): A Case Report. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(6), 1078–1081. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.75.1078>
- Romero Cabello, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana* (3ª ed.). México, D.F., México: Medica Panamericana.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248
- Sanchez-Camargo, C. L., Albajar-Vinas, P., Wilkins, P. P., Nieto, J., Leiby, D. A., Paris, L., . . . Flevaud, L. (2014). Comparative Evaluation of 11 Commercialized Rapid Diagnostic Tests for Detecting *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Serum Banks in Areas of Endemicity and Nonendemicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2506–2512. <https://doi.org/10.1128/jcm.00144-14>
- Schilman, P., de la Vega, G., (2015) Tolerancia térmica, vinchucas aguantadoras, <http://nexciencia.exactas.UBA.AR>
- Schmunis, G. A. (2007a). The globalization of Chagas disease. *ISBT Science Series*, 2(1), 6–11. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2007.00052.x>
- Schmunis, G. A. (2007b). Epidemiology of Chagas disease in non endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(suppl 1), 75–86. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000093>

- Schmunis, G. A., & Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1-2), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>
- Schofield, C. J. (1982). The role of blood intake in density regulation of populations of *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera: Reduviidae). *Bulletin of Entomological Research*, 72(04), 617. <https://doi.org/10.1017/s0007485300008646>
- Schofield, C.J., (1988). Biosystematics of the Triatominae. In: Sevice, M.W. (Ed.), Biosystematics of Haematophagous Insects. Clarendon Press, Oxford, pp. 287_312.
- Schofield, C., & Dias, J. (1999). The Southern Cone Initiative against Chagas Disease. *Advances in Parasitology*, , 1–27. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60147-5](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60147-5)
- Schofield, C., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110(2-3), 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>
- Shikanai-Yasuda, M., Brisola Marcondes, C., Guedes, L. A., Siqueira, G., Barone, A., Dias, J., . . . Chapadeiro, E. (1991). Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(5), 351–357. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651991000500003>
- Shikanai-Yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral Transmission of Chagas Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Sistema de Información Municipal Regionalizada del Departamento de La Paz. (s.f.). Región Metropolitana. Recuperado de <http://autonomias.gobernacionlapaz.com/sim/index.php>
- Steverding, D. (2014). The history of Chagas disease. *Parasites & Vectors*, 7(1), 317. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-317>

- Stimpert, K. K., & Montgomery, S. P. (2010). Physician Awareness of Chagas Disease, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 16(5), 871–872. <https://doi.org/10.3201/eid1605.091440>
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar (2013). "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods." *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tay J, Lara R. Velazco O, Gutiérrez M. (1991). *Parasitología Médica* 5a. ed. México; Méndez Cervantes; p.112-22.
- Telleria, J., & Tibayrenc, M. (2010). *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. London, England: EL SEVIER.
- Torrice, R.A. (1946). Primer caso agudo de forma oftalmoganglionar de enfermedad de Chagas comprobado en Bolivia. *An Lab Central I*: 1-39
- Torrice RA. Hallazgo de *Eratyrus mucronatus*, infestación natural de vinchucas de cerro y *Eutriatoma sordida* en Cochabamba. (1946). *An Lab Central Cochabamba*. 1:19–23.
- Torrice, R.A., (1949). Conocimientos anuales sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Bolivia. Primera Reunión Panamericana de la Enfermedad de Chagas, Tucumán, 67-74.
- Torrice, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E.J., Rodríguez, P.L., Torrice, M.A., Dramaix, M., Truyens, C., & Carlier, Y. (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70 2, 201-9.

- Toso M, A., Vial U, F., & Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile*, 139(2), 258–266. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872011000200017>
- Vidaurre, P. (2016). Jornadas de actualización en enfermedad de Chagas, Vigilancia Entomológica en Áreas libres de riesgo de transmisión de Chagas en el Departamento de La Paz, octubre de 2016, Sucre-Bolivia.
- Waleckx, E., Buitrago, R., Depickère, S., Aliaga, C., Calle, H., Brenière, S. F., . . . Monje, M. (2012). New Discoveries of Sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Throughout the Bolivian Chaco. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3), 455–458. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0205>
- Waleckx, E., Salas, R., Huamán, N., Buitrago, R., Bosseno, M., Aliaga, C., . . . Brenière, S. F. (2011). New insights on the Chagas disease main vector *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) brought by the genetic analysis of Bolivian sylvatic populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 1045–1057. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.03.020>
- Wendel, S., & Gonzaga, A. (1993). Chagas' Disease and Blood Transfusion: A New World Problem? *Vox Sanguinis*, 64(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1993.tb02507.x>
- World Health Organization. (1991). *Control of Chagas disease*. Geneva, Suiza: WHO.
- World Health Organization. (2002). *Control of Chagas Disease. Technical Report Series. No. 905*, Geneva.
- World Health Organization. (2018). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Recuperado 22 marzo, 2018, de [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- WHO, & Rozendaal, J. A. (1997). *Vector Control - Methods for Use by Individuals and Communities*. Inglaterra: World Health Organization.

Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., . . .
Schijman, A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific
nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do
Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000700021>

FIGURAS

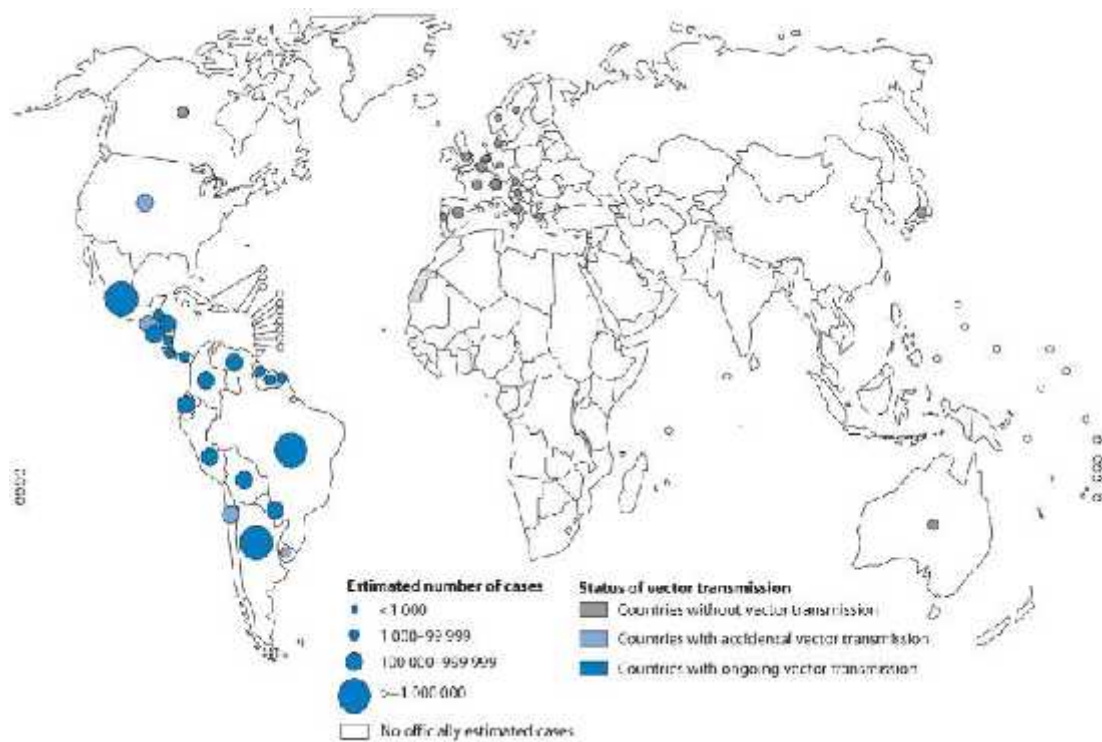


Figura 1 Distribución de la Enfermedad de Chagas. Fuente: Global Health Observatory (GHO) data, imagen obtenida de: http://www.who.int/gho/map_gallery/en/

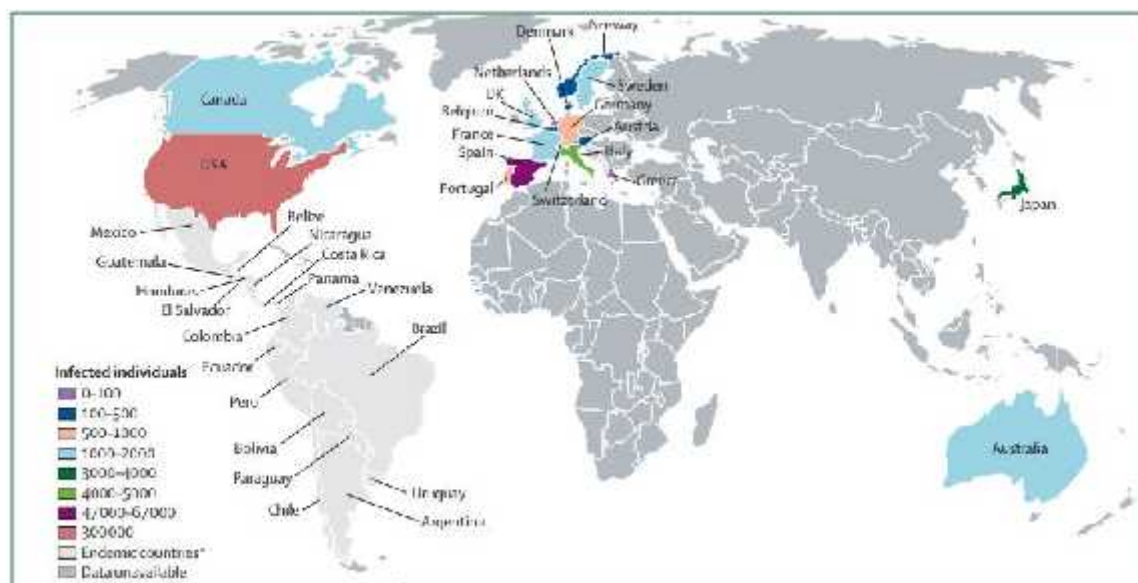


Figura 2 Número estimado de inmigrantes con infección por *Trypanosoma cruzi* que viven en países no endémicos. Fuente: Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402.

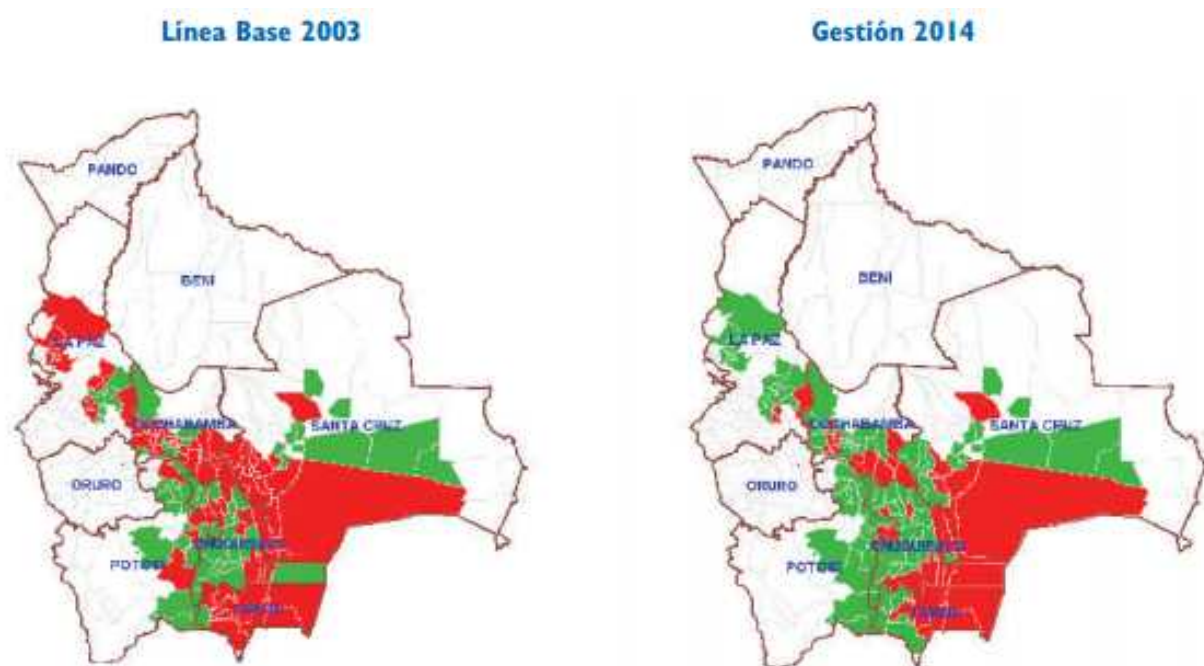


Figura 3 Control vectorial de *Triatoma infestans* en Municipios. Fuente: Programa Nacional de Chagas. Unidad de Epidemiología. 2015.

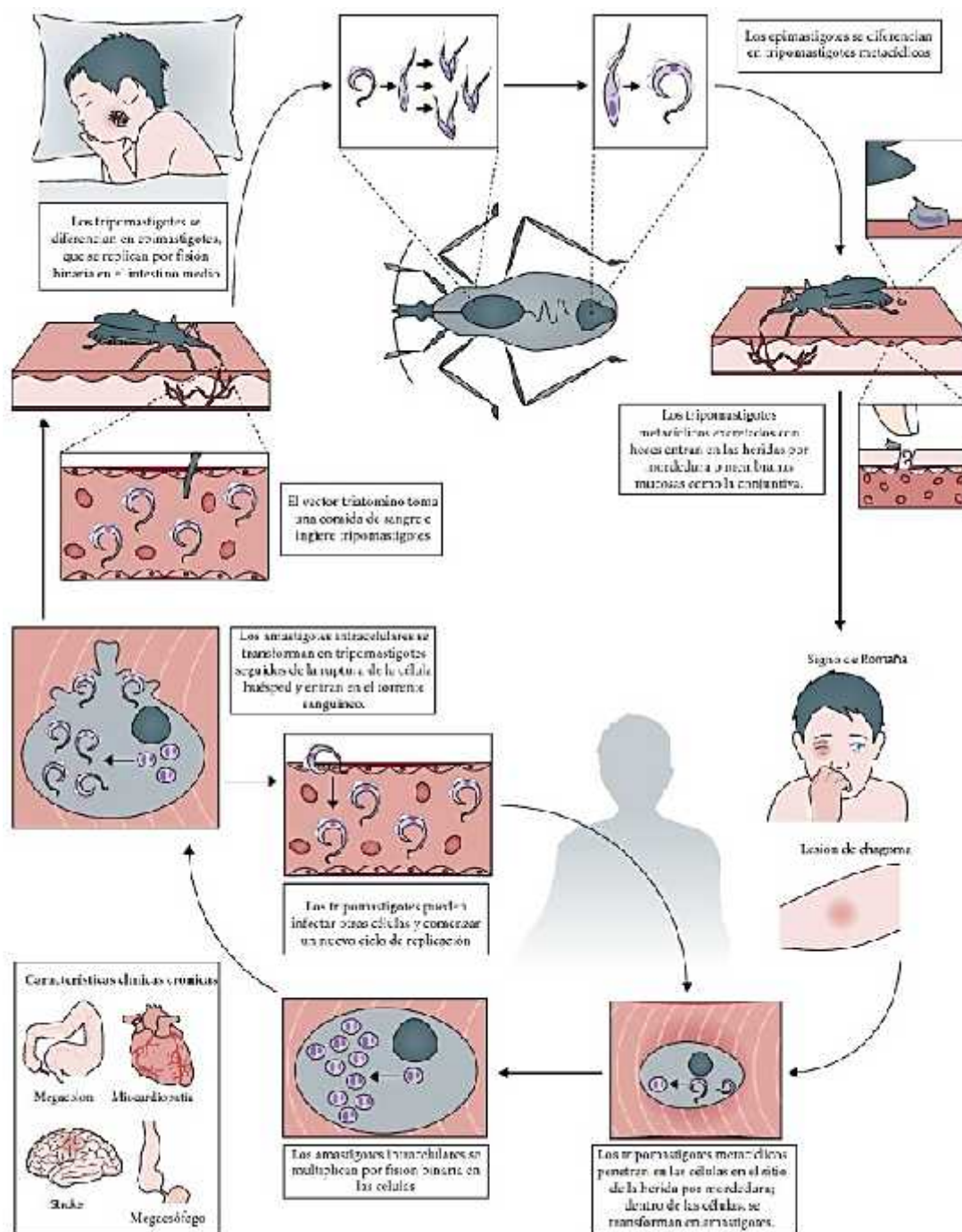


Figura 4 Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Pérez-Molina y Molina (2018).

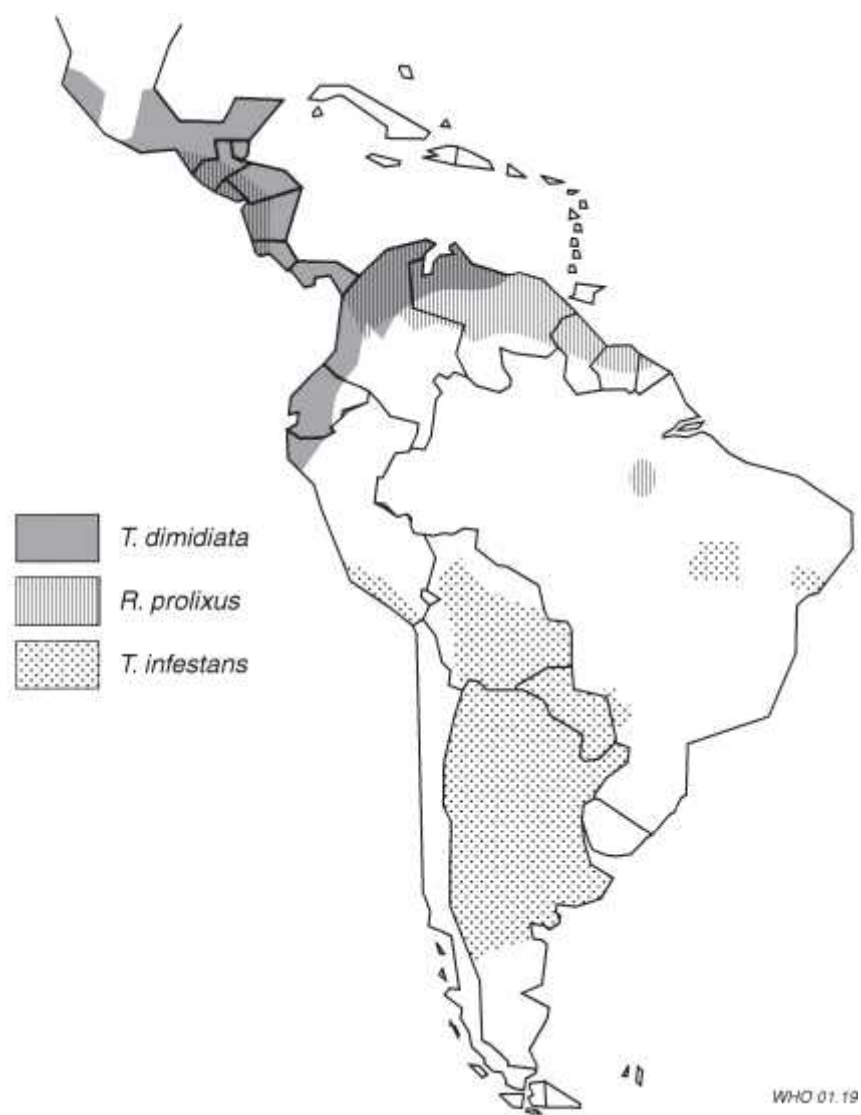


Figura 5 Distribución geográfica de los seis principales vectores triatomíneos en la Enfermedad de Chagas. Fuente: Control de la enfermedad de Chagas. OMS. Ginebra. 2002.



Figura 6 Ciclo biológico de la vinchuca (*Triatoma infestans*)

Fuente: <http://www.hablamosdechagas.com.ar>

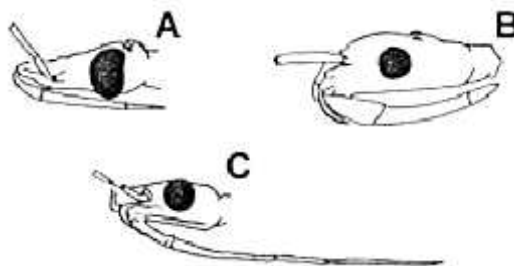


Figura 7 Tipos de dispositivo oral: A - hematófago, B depredador - C – fitófagos. Fuente: Monte y Costa (2017).

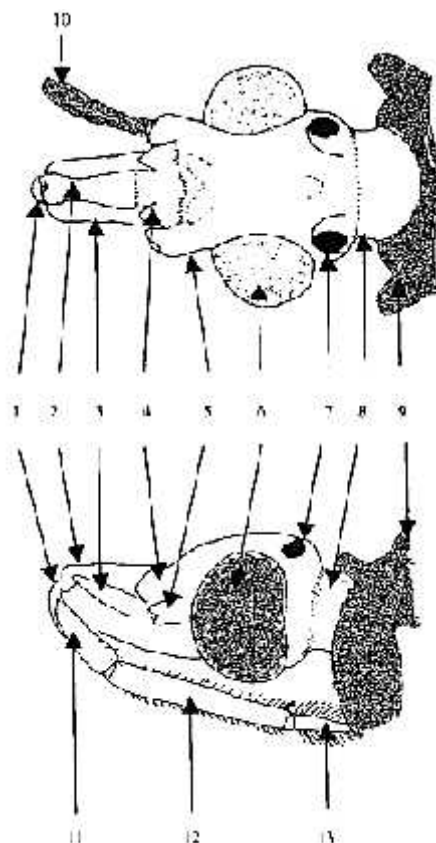


Figura 8 Cabeza de un Triatominae en vista dorsal (arriba) y lateral (abajo). 1. anteclepeo; 2. clipeo; 3. genae; 4. jugas; 5. tubérculo antenífero; 6. ojo; 7. ocelos; 8. cuello; 9. tórax; 10. primer segmento de la antena; 11, 12, 13. primer, segundo y tercer segmentos del rostro respectivamente. Fuente: Dujardin, Schofield y Panzera, (2002) Los Vectores de la Enfermedad de Chagas.

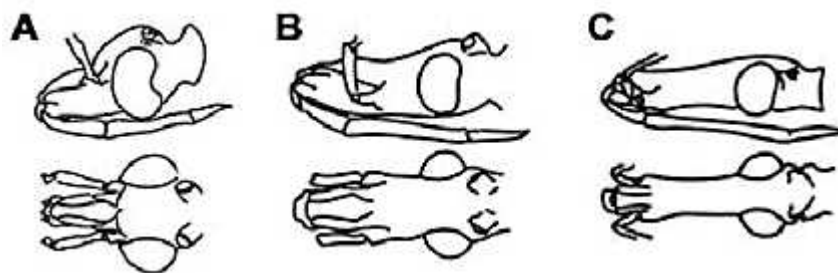


Figura 9 Comparación Posición del tubérculo antenífero. A - *Panstrongylus sp.*, B- *Triatoma sp.*, C - *Rhosmius sp.* Fuente: Monte Gonçalves y Costa (2017).

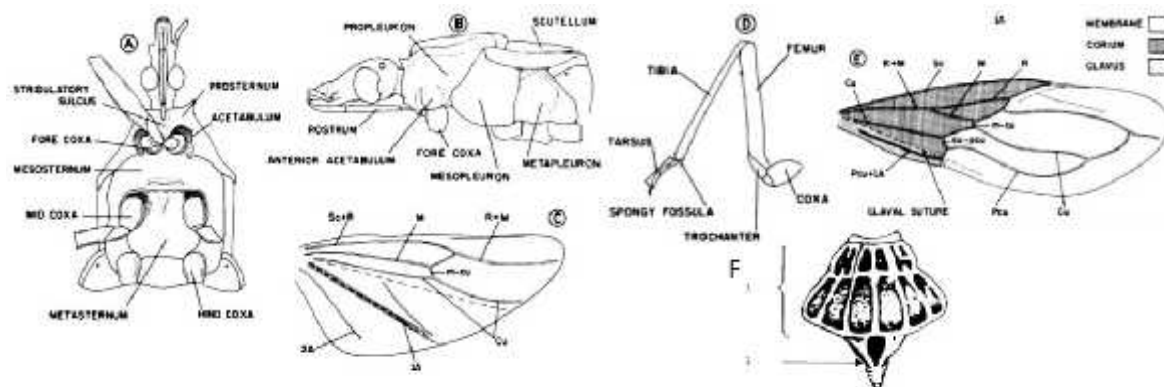


Figura 10 Tórax: A. Cabeza y tórax, vista ventral; B. Vista lateral; C, E. Alas; D. Pata; F. 1, Pronoto; 2, Escutelo. Fuente: Lent y Wygodzinsky (1979).

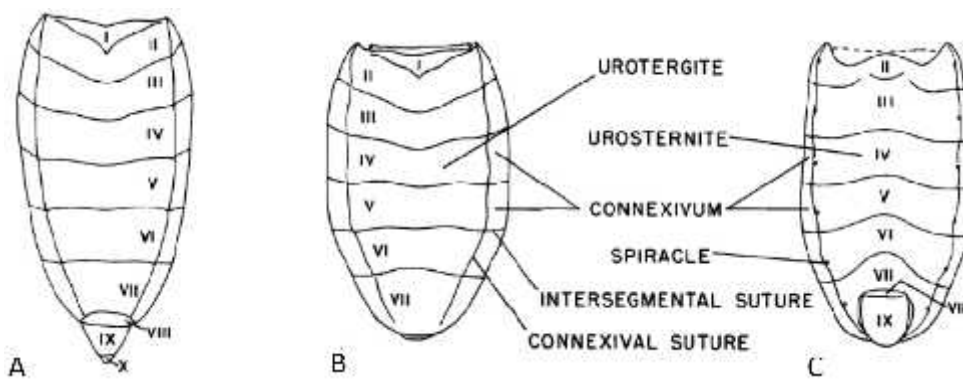


Figura 11 Abdomen de la hembra: A: dorsal; Abdomen macho: B: vista posterior, C ventral. Fuente: Lent y Wygodzinsky (1979).

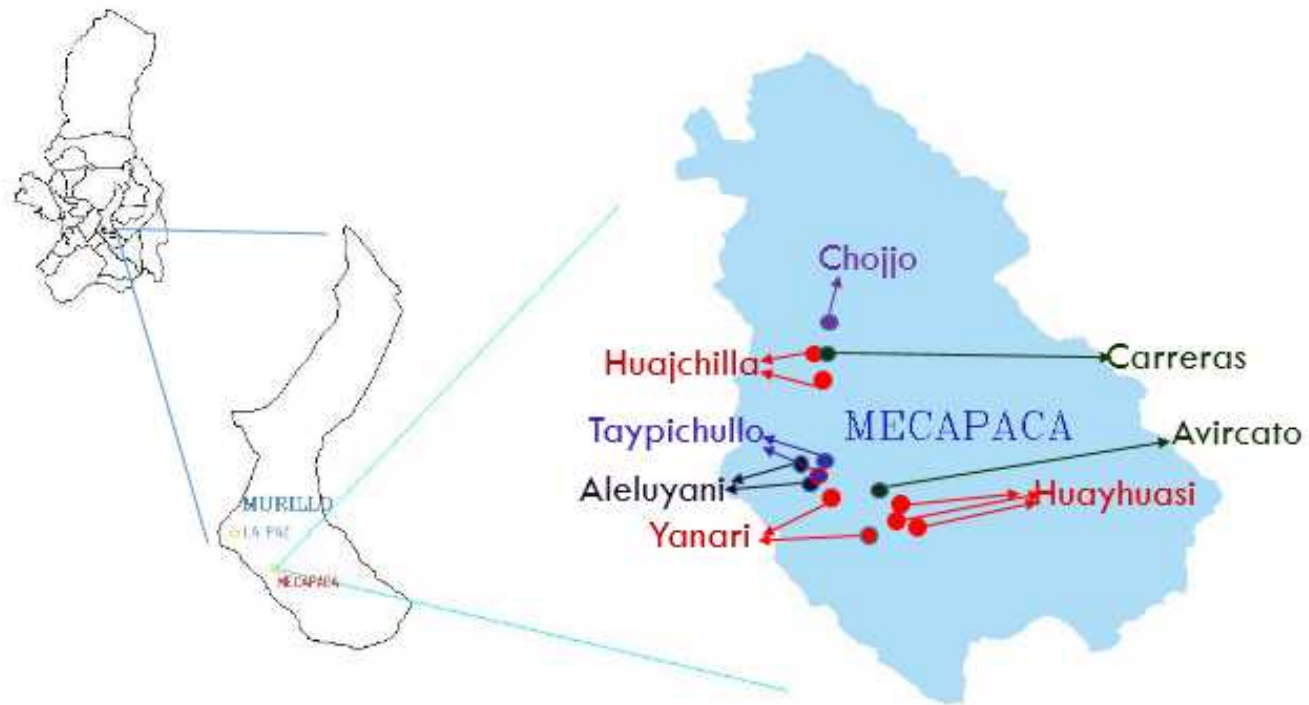


Figura 12 Ubicación del área de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia. Mapa: Arq. S. Alejandra Saavedra Del Castillo 2018



Figura 13 Trampeo y captura de triatominos, mediante trampas Noireau

Fotografía: Delma Eunice Zapata, 2017

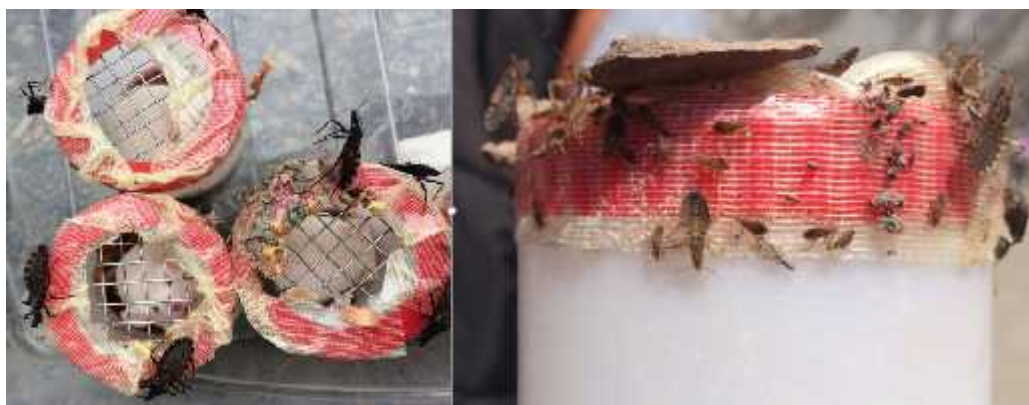


Figura 14 Triatominos capturados en: Huayhuasi, Yanari y Huajchilla. Junio a octubre de 2017 poblaciones de Mecapaca, La Paz- Bolivia

Fotografías: Delma Eunice Zapata, 2017

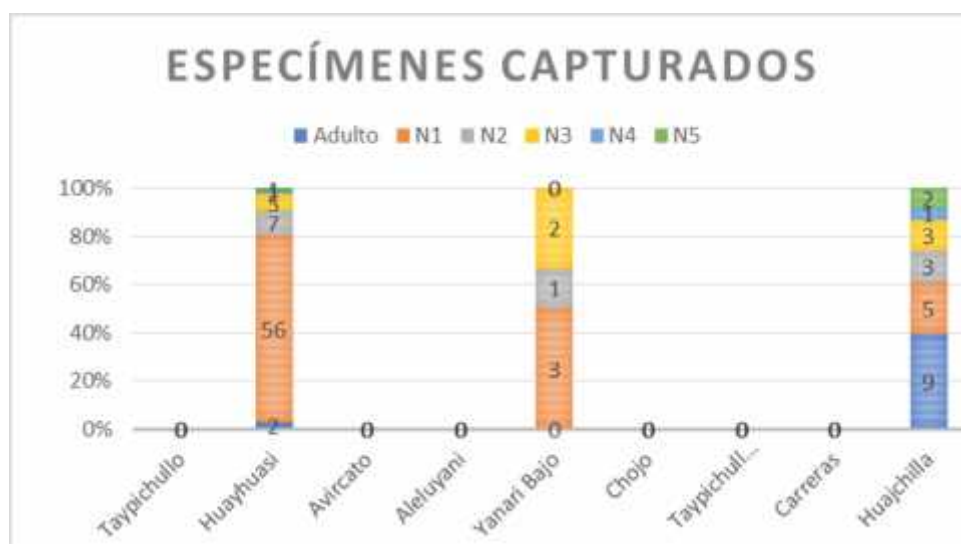


Figura 15 Especímenes capturados clasificados por estadio hallados en: Huayhuasi, Yanari y Hualchilla. Junio a octubre de 2017 en poblaciones de Mecapaca, La Paz- Bolivia. Fuente Propia.

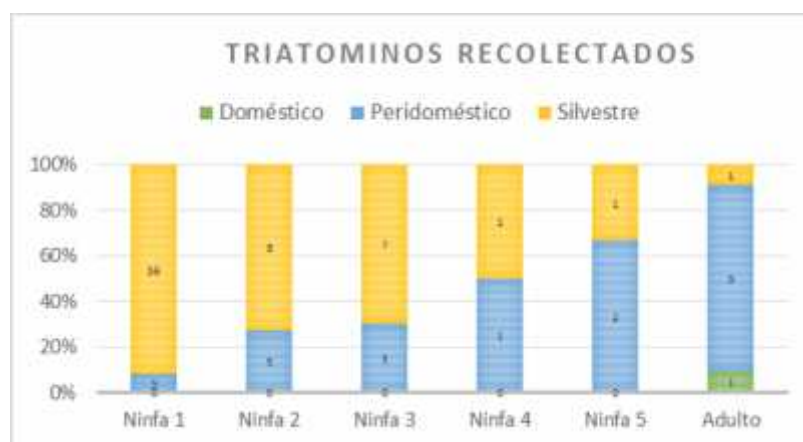


Figura 16 Triatomines recolectados en diferentes ambientes. Junio a octubre de 2017 en poblaciones de Mecapaca, La Paz- Bolivia. Fuente Propia.

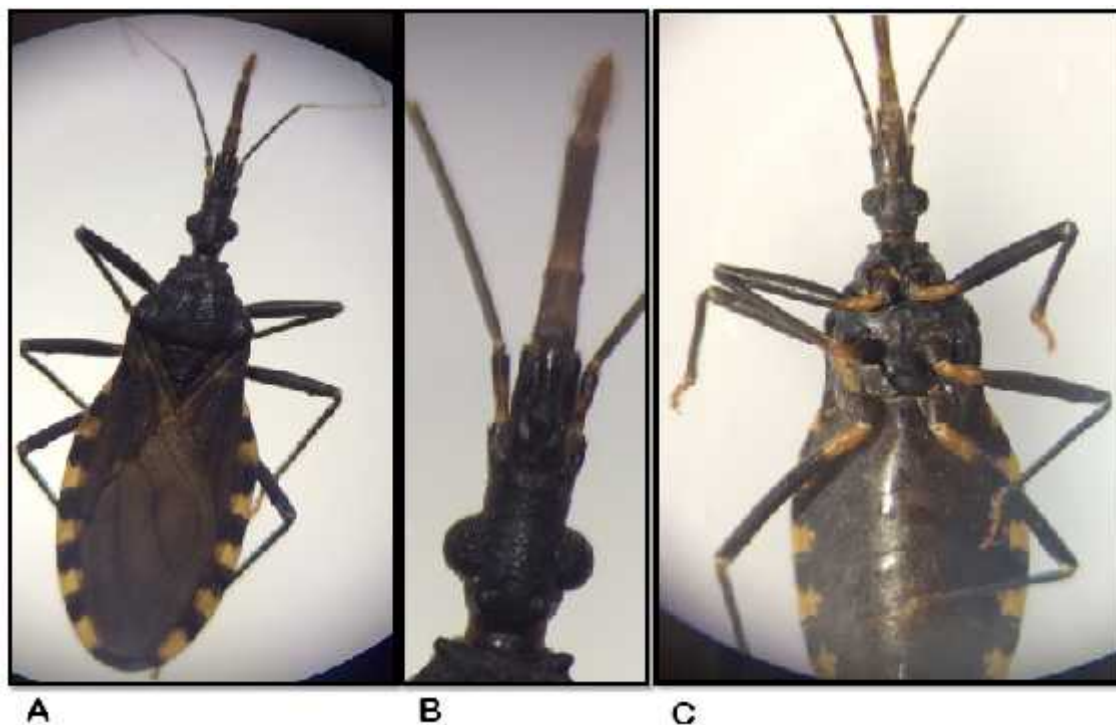


Figura 17 Morfología de triatominos en fase adulta. Vista dorsal de triatomino adulto (A), Vista dorsal de la cabeza del adulto (B), Vista ventral de triatomino adulto (C)

Fotografías: Delma Eunice Zapata, 2017



Figura 18 Comparación morfológica de estadios ninfales capturados. Vista dorsal de ninfa estadio 2 (A), Vista dorsal de ninfa morfológicamente diferente estadio 3 (B), Vista dorsal de ninfa normal estadio 3 (C)

Fotografías: Delma Eunice Zapata, 2017

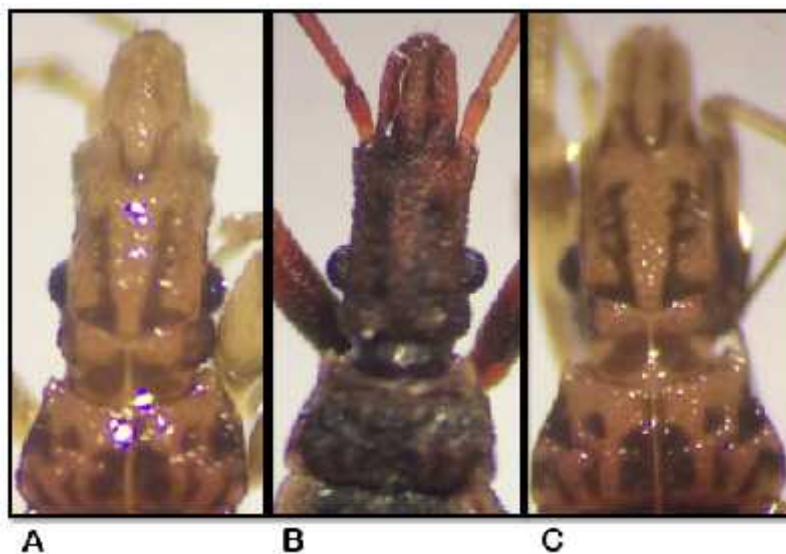


Figura 19 Comparación morfológica de cabeza de estadios ninfales capturados. Ninfa estadio 2 (A), Ninfa estadio 3 morfológicamente diferente (B), Ninfa estadio normal 3 (C)

Fotografías: Delma Eunice Zapata, 2017

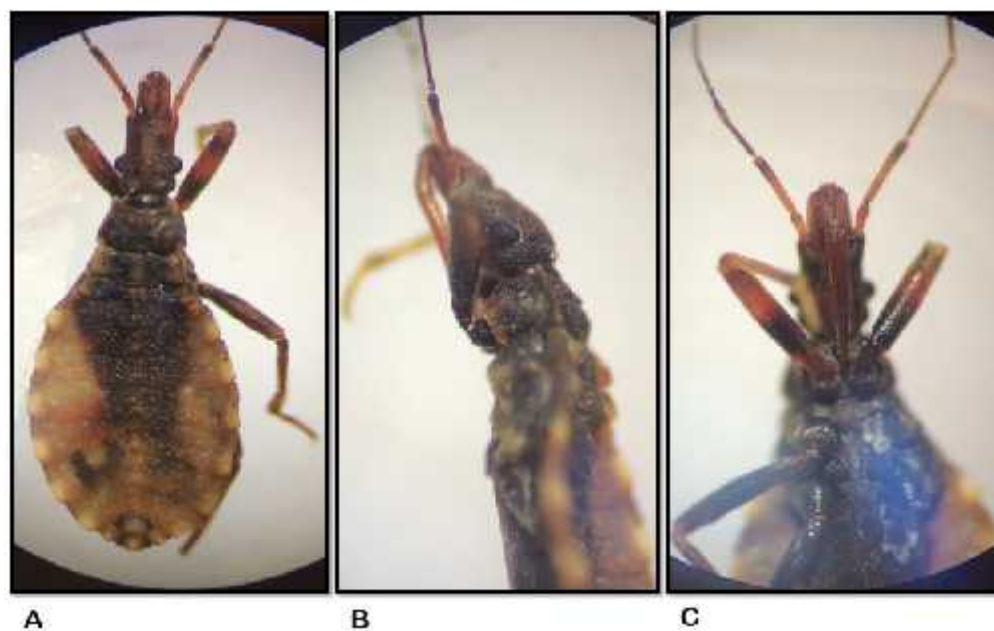
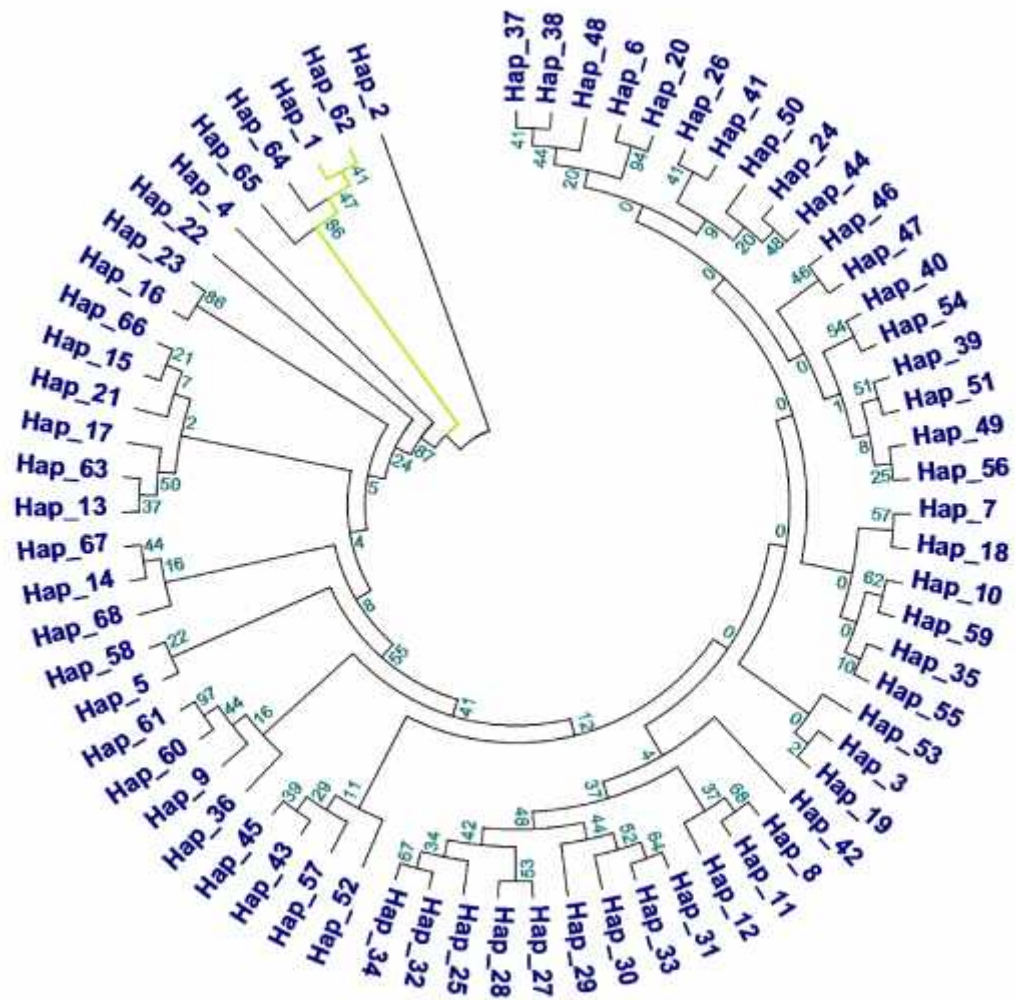


Figura 20 Morfología de triatomino hallado con diferencias externas. Vista dorsal de ninfa presentando coloración de cabeza, tórax y abdomen oscuros (A), Vista lateral de cabeza de la ninfa (B), Vista ventral de ninfa con coloración rojiza en el labio y antenas (C)

Fotografías: Delma Eunice Zapata, 2017



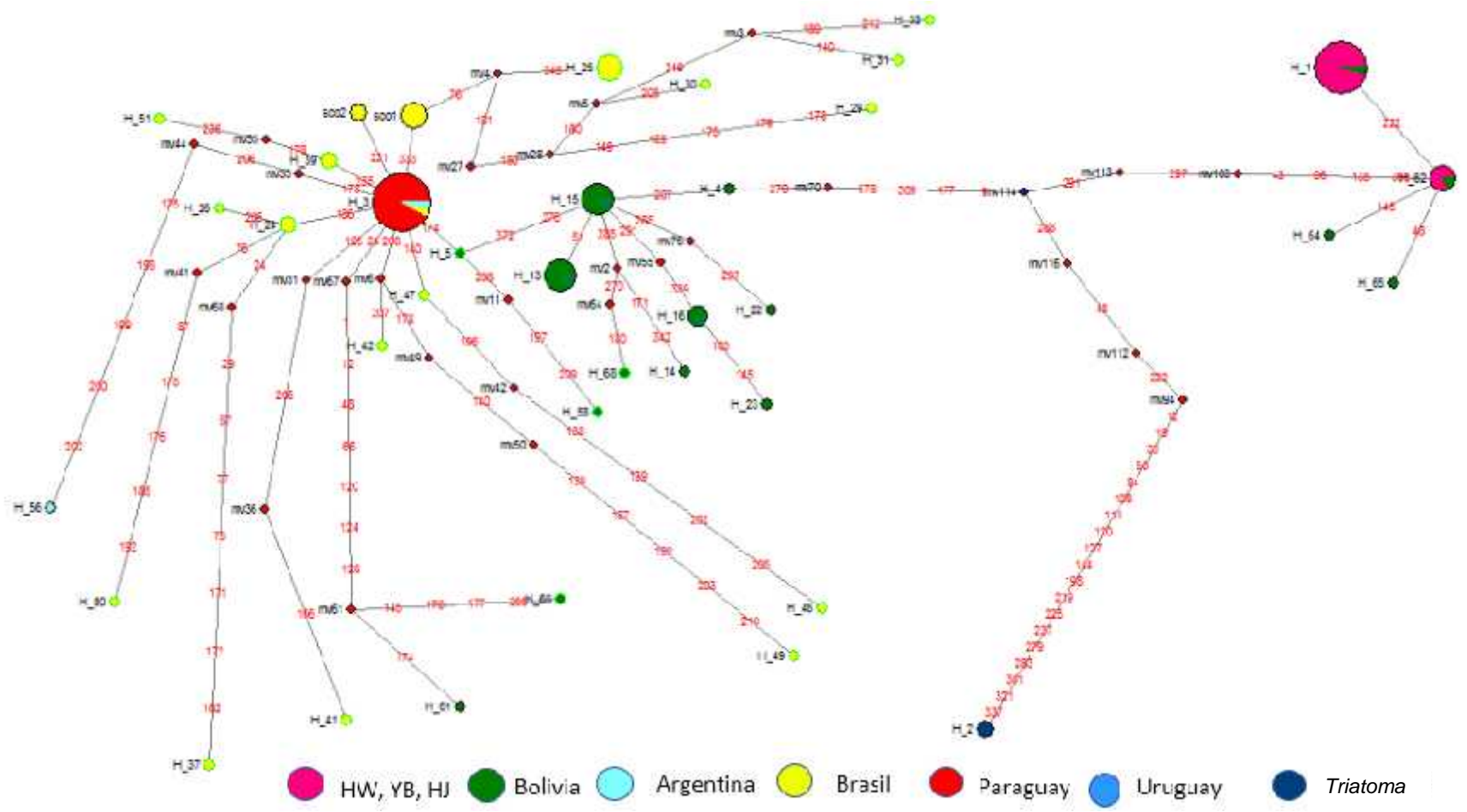


Figura 22 Red haplotípica mediante el marcador mt Cyt B

TABLAS

Tabla 2

Clasificación de Triatominae

Tribu	Género	Número de especies
Alberproseniini	<i>Alberprosenia</i>	2
Bolboderini	<i>Belminus</i>	8
	<i>Bolbodera</i>	1
	<i>Microtriatoma</i>	2
	<i>Parabelminus</i>	2
Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>	2
Rhodniini	<i>Psammolestes</i>	3
	<i>Rhodnius</i>	16
Triatomini	<i>Dipetalogaster</i>	1
	<i>Eratyrus</i>	2
	<i>Hermanlenticia</i>	1
	<i>Linshcosteus</i>	6
	<i>Panstrongylus</i>	13
	<i>Paratriatoma</i>	1
	<i>Triatoma</i>	80
Total		140

Fuente: Schofield, C., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110(2-3), 88-100.

Tabla 3**Localización geográfica e infestación en comunidades investigadas.**

Comunidad	Sitio ¹	Área de Trampeo	Latitud	Longitud	S	W	Altura (msnm)	Fecha de trampeo	No. de Trampas dejadas	No. de Trampas (+)	% de Trampas (+)	No. total de Triatominos
Taypichullo	1	Silvestre	-16.670694	-68.035922	16°40'14.5"	68°02'09.3"	3011	17/06/2017	100	0	0	0
Huaywasi	2	Silvestre	-16,713528	-67,990806	16°42'48.7"	67°59'26.9"	2777	12/08/2017	33	5	15,2	5
Huaywasi	3	Silvestre	-16,710874	-67,991112	16°42'39.2"	67°59'28.0"	2752	12/08/2017	32	0	0	0
Huaywasi	4	Silvestre	-16.713418	-67.991631	16°42'48.3"	67°59'29.9"	2803	26/08/2017	23	5	21,7	66
Avircato	5	Silvestre	-16.686000	-68.025937	16°41'09.6"	68°01'33.4"	3019	26/08/2017	27	0	0	0
Aleluyani	6	Silvestre	-16.677919	-68.034511	16°40'40.5"	68°02'04.2"	2965	01/09/2017	15	0	0	0
Yanari	7	Silvestre	-16.682102	-68.030918	16°40'55.6"	68°01'51.3"	2949	01/09/2017	10	2	20	3
Chojjo	8	Silvestre, Doméstica, Peridoméstica	-16.609722	-68.030833	16°36'35.0"	68°01'51.0"	3703	01/09/2017	25	0	0	0
Yanari	9	Silvestre	-16.682139	-68.030583	16°40'55.7"	68°01'50.1"	2944	05/09/2017	19	1	5,3	1
Taypichullo	10	Silvestre	-16,67549	-68,03	16°40'31.8"	68°01'48.0"	2964	05/09/2017	6	0	0	0
Huajchilla	11	Peridoméstica	-16,64934	-68,03356	16°38'57.6"	68°02'00.8"	2959	05/09/2017	24	1		1

4,2

Yanari	12	Silvestre	-16.682222	-68.031389	16°40'56.0"	68°01'53.0"	2955	11/09/2017	16	2	12,5	2
Aleluyani	13	Doméstica	-16.677675	-68.034315	16°40'39.6"	68°02'03.5"	2955	11/09/2017	8	0	0	0
Huajchilla	14	Peridoméstica	-16.649444	-68,033333	16°38'58.0"	68°02'00.0"	2960	11/09/2017	24	8	3,3	22
Huajchilla	15	Doméstica	-16.649722	-68.033611	16°38'59.0"	68°02'01.0"	2955	30/10/2017	25	0	0	0
Carreras	16	Peridoméstica	-16,6453	-68,0259	16°38'43.1"	68°01'33.2"	2989	30/10/2017	25	0	0	0
Huaywasi	17	Doméstica	-16.712250	-67.990139	16°42'44.1"	67°59'24.5"	2727	14/12/2017	0	0	0	1
Total												101

¹ sitio de trampeo

Tabla 4

Individuos de Triatoma infestans, según Estadio.

COMUNIDAD	Adult	N1	N2	N3	N4	N	TOT
ES	o ¹					5	AL
Taypichullo	0	0	0	0	0	0	0
Huayhuasi	2	56	7	5	1	1	72
Avircato	0	0	0	0	0	0	0
Aleluyani	0	0	0	0	0	0	0
Yanari	0	3	1	2	0	0	6
Chojjo	0	0	0	0	0	0	0
Taypichullo	0	0	0	0	0	0	0
Carreras	0	0	0	0	0	0	0
Huajchilla	9	5	3	3	1	2	23
TOTAL	11	64	11	10	2	3	101

Individuos de *Triatoma infestans* recolectados en tres comunidades del Municipio de Mecapaca, según estadio.¹ 6 5

Tabla 5

Infección en por Trypanosoma cruzi

Número	Comunidad	Código	Resultado de infección por <i>T. cruzi</i>
1	Huayhuasi	HW 62 ¹	Negativo
2	Huayhuasi	HW 63 ²	Positivo
3	Huayhuasi	HW 66 ³	Positivo
4	Huayhuasi	HW 71 ⁴	Positivo
5	Huajchilla	HJ 90 ⁵	Negativo
6	Huajchilla	HJ 91 ⁴	Negativo
7	Huajchilla	HJ 92 ⁵	Negativo
8	Huajchilla	HJ 93 ⁵	Negativo
9	Huajchilla	HJ 94 ⁵	Negativo
10	Huajchilla	HJ 96 ⁵	Negativo
11	Huajchilla	HJ 97 ⁴	Negativo
12	Huajchilla	HJ 98 ⁴	Negativo
13	Huajchilla	HJ 99 ⁵	Negativo

Resultados del análisis a insectos vectores capturados en comunidades de Mecapaca, La Paz-Bolivia. ¹ NIII ² NIV ³ NV ⁴ ⁵

Tabla 6

Número de secuencias utilizadas para cada análisis

Comunidad	ITS-2	Cyt B
Huayhuasi	1	4
Yanari	3	3
Huajchilla	6	17
Total	10	24

Secuencias utilizadas para cada análisis con cada uno de los marcadores moleculares (nuclear, mitocondrial).

Tabla 7

Índices de variabilidad de genes estudiados

	Gen Nuclear ¹		Gen Mitocondrial ²	
	ITS-2 ^a	ITS-2 ³	Cyt B ^a	Cyt B ⁴
Número de secuencias estudiadas (n)	20	35	24	112
Número de sitios nucleotídicos	593	394	683	387
Número de sitios con incertidumbres	0	0	0	0
Número de sitios polimórficos (S)	0	6	3	111
Número total de Mutaciones (Eta)	0	6	3	132
Número de sitios únicos (Singleton sites)	-	4	2	36
Número de haplotipos (Hap)	1	6	4	68
Diversidad nucleotídica (Pi)	0	0,00150	0,00067	0,02812
Diversidad haplotípica (Hd)	0	0,400	0,370	0,959

^a análisis de secuencias propias ¹ para secuencias estudiadas con gen nuclear se consideraron 2 haplotipos ² para las secuencias

estudiadas con gen mitocondrial se consideró 1 haplotipo ^{3,4} secuencias propias junto a secuencias de referencia

Tabla 8

Origen geográfico de poblaciones de Triatoma infestans estudiadas

Código	País ¹		Población
HW67	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huayhuasi
HW69	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huayhuasi
HW70	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huayhuasi
HW71	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huayhuasi
YB72	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Yanari
YB77	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Yanari
YB78	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Yanari
HJ76	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ79	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ80	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ83	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ84	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ85	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ88	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ90	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ91	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ92	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla

HJ94	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ95	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ96	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ97	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ98	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ99	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
HJ100	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca	Huajchilla
KY6540	Paragua		
77	y		Referencia
KY6540	Paragua		
78	y		Referencia
KY6540	Paragua		
76	y		Referencia
EF6390			
38	Sd. ³		Referencia
KY6403			
05	Uruguay		Referencia
KY6540			
80	Sd. ³		Referencia
KY6540			
79	Sd. ³		Referencia
HQ8486	Paragua	Presidente Hayes	Referencia

48	y		
JN0067	Argenti	Provincia de Santiago del Estero, Departamento de Moreno,	
93	na Amamá		Referencia
JN0067	Argenti	Provincia de Santiago del Estero, Departamento de Moreno,	
94	na Amamá		Referencia
JN0067	Argenti	Provincia de Santiago del Estero, Departamento de Moreno,	
95	na Amamá		Referencia
JN0067	Argenti	Provincia de Santiago del Estero, Departamento de Moreno,	
96	na Amamá		Referencia
JN0067	Argenti	Provincia de Santiago del Estero, Departamento de Moreno,	
99	na Amamá		Referencia
AY0621			
65	Brasil		Referencia
JN0067	Argenti	Provincia de Santiago del Estero, Departamento de Moreno,	
97	na Amamá		Referencia
KC2492			
57	Bolivia	Cochabamba, Mataral	Referencia
KC2492			
56	Bolivia	Cochabamba, Cotapachi	Referencia
KC2492			
54	Sd. ³		Referencia
JN0067	Argenti	Provincia de Santiago del Estero, Departamento de Moreno,	Referencia

98		na Amamá	
	KC2492		
60	Bolivia	Cochabamba, Ilicuni	Referencia
	KC2492		
55	Bolivia	Cochabamba, Chaco Tita	Referencia
	KC2492		
59	Bolivia	Cochabamba, Ilicuni	Referencia
	KC2492		
58		Sd. ³	Referencia
	KC2492		
61		Sd. ³	Referencia
	KM258		
437		Sd. ³	Referencia
	GU8075		
97	Bolivia	Tarija	Referencia
	AY7020		
22	Bolivia	Chuquisaca, Prov. Oropeza	Referencia
	GU8075		
83	Brasil	Rio Grande do Sul	Referencia
	GU8075		
78	Brasil	Rio Grande do Sul	Referencia
	GU8075	Brasil Rio Grande do Sul	Referencia

76				
	GU8075			
74	Brasil	Goiás		Referencia
	GU8075			
70	Brasil	Goiás		Referencia
	GU8075			
59	Bolivia	Tarija		Referencia
	GU8075			
58	Brasil	Rio Grande do Sul		Referencia
	AY7020			
20	Bolivia	Chuquisaca, Prov. Oropeza y Prov. Juana Azurduy		Referencia
	AY7020	Chuquisaca, Prov. Yamparáez, Prov. Jaime Zudañez y Prov.		
19	Bolivia	Tomina		Referencia
	HQ3332			
23	Bolivia	La Paz, Loayza, Luribay		Referencia
	HQ3332			
22	Bolivia	La Paz, Loayza, Luribay		Referencia
		La Paz, Murillo, Mecapaca, Huayhuasi; La Paz, Murillo, Palca,		
	HQ3332	Tahuapalca; La Paz, Loayza, Sapahaqui, Khola; La Paz, Loayza,		
16		Luribay: Lacayani, Palca y Luribay.		
				Referencia
	AY7020	Bolivia Chuquisaca		Referencia

18				
	GU8075			
95	Bolivia	Tarija		Referencia
	GU8075			
94	Bolivia	Tarija		Referencia
	GU8075			
80	Brasil	Rio Grande do Sul		Referencia
	GU8075			
79	Brasil	Rio Grande do Sul		Referencia
	GU8075			
75	Brasil	Goias		Referencia
	GU8075			
71	Brasil	Goias		Referencia
	GU8075			
61	Brasil	Rio Grande do Sul		Referencia
	KC2492			
62	Uruguay	Montevideo		Referencia
	AY7020			
24	Bolivia	Chuquisaca, Prov. Oropeza		Referencia
	GU8075	Argenti		
90	na	Salta		Referencia
	GU8075	Brasil	Rio Grande do Sul	Referencia

87				
	GU8075			
77	Brasil	Rio Grande do Sul		Referencia
	GU8075			
60	Brasil	Minas Gerais		Referencia
	GU8075			
82	Brasil	Rio Grande do Sul		Referencia
	GU8075			
69	Brasil	Minas Gerais		Referencia
	GU8075			
67	Brasil	Minas Gerais		Referencia
	GU8075			
65	Brasil	Minas Gerais		Referencia
	GU8075			
62	Brasil	Minas Gerais		Referencia
	GU8075			
73	Brasil	Goiias		Referencia
	GU8075			
66	Brasil	Minas Gerais		Referencia
	GU8075	Argenti		
92	na	Salta		Referencia
	GU8075	Brasil	Rio Grande do Sul	Referencia

81			
	GU8075		
68	Brasil	Minas Gerais	Referencia
	GU8075		
98	Bolivia	Tarija	Referencia
	GU8075		
86	Brasil	Rio Grande do Sul	Referencia
	GU8075		
64	Brasil	Minas Gerais	Referencia
	GU8075		
63	Brasil	Minas Gerais	Referencia
	GU8075		
85	Brasil	Rio Grande do Sul	Referencia
	GU8075		
72	Brasil	Goiias	Referencia
	GU8075		
96	Bolivia	Tarija	Referencia
	HQ3332		
20	Bolivia	Potosi, Sur Chichas, Tupiza, Viscachani	Referencia
	HQ3332		
19	Bolivia	Cochabamba, Campero, Aiquile, Mataral	Referencia
	HQ3332	Bolivia	Cochabamba, Quillacollo, Quillacollo 1ra seccion, Cotapachi;
			Referencia

17		Cochabamba, Cercado, Cochabamba, Alto Cara Cara	
		AF0457	
21	Bolivia		Referencia
		HQ3332	
35	Bolivia	Chuquisaca	Referencia
		HQ3332	
34	Bolivia	Santa Cruz, Izozog, Gran Chaco	Referencia
		HQ3332	
30	Bolivia	Chuquisaca, Hernando Siles, Monteagudo, Cerrillos	Referencia
		HQ3332	
24	Bolivia	Cochabamba, Quillacollo, Quillacollo 1ra seccion, Cotapachi	Referencia
		HQ3332	
15	Bolivia	La Paz, Murillo, Mecapaca: Aucani, El Palomar; La Paz, Murillo, Palca, Tahuapalca; La Paz, Loayza, Luribay; Potosí, Charcas, Toro Toro, Julo Grande; Cochabamba, Cercado y Quillacollo	Referencia
		AY7020	
21	Bolivia	Chuquisaca, Oropeza	Referencia
		AY7020	
23	Bolivia	Chuquisaca, Oropeza	Referencia
		GU8075	
84	Brasil	Rio Grande do Sul	Referencia
		GU8075	
88	Brasil	Rio Grande do Sul	Referencia

GU8075				
89	Brasil	Rio Grande do Sul		Referencia
GU8075	Argenti			
91	na	Salta		Referencia
GU8075				
93	Bolivia	Tarija		Referencia
KC2492				
74 ²	Uruguay	Montevideo		Referencia
HQ3332				
21	Bolivia	Huayhuasi		Referencia

Origen geográfico de secuencias obtenidas del Municipio de Mecapaca junto con secuencias de diferentes orígenes geográficos y previamente depositados en GenBank. ¹ País/Departamento/Provincia/Municipalidad/Población ² grupo externo ³ Sin datos

Tabla 9

Haplotipos hallados con marcador mt CytB

Código	Haplotipo	Número de secuencias
HW67 HQ333221.1_haplotype_CytBHapG HW69 HW71 YB78 HJ79 HJ80 HJ83 HJ84 HJ85 HJ88 HJ90 HJ91 HJ92 HJ94 HJ95 HJ96 HJ97 HJ98 HJ99 HJ100	HAP1	21

KC249274.1_Triatoma_platensis_isolate_96	KC249262.1_isolate_69	HAP2	2	
AY062165.1_clone_TinfcBRA	EF639038.1_clone_TI-61	JN006793.1_isolate_cyB-XXXVI	HAP3	4
KY654076.1_isolate_PY_12J-57				
AY702022.1_haplotype_E		HAP4	1	
GU807597.1_haplotype_41		HAP5	1	
HQ848648.1_haplotype_XL	KY654077.1_isolate_PY_12J-14	HAP6	2	
JN006794.1_isolate_cyB-XXXVII		HAP7	1	
JN006795.1_isolate_cyB-VIII		HAP8	1	
JN006796.1_isolate_cyB-V		HAP9	1	
JN006797.1_isolate_cyB-II	AF045721.1_gene_encoding_mitochondrial_protein_partial_cds	HAP10	3	
GU807559.1_haplotype_03				
JN006798.1_isolate_cyB-VII		HAP11	1	
JN006799.1_isolate_cyB-XIV	KY654079.1_isolate_PY_12J-501	KY654080.1_isolate_PY_CA-397	HAP12	3
KC249254.1_isolate_162	KC249256.1_isolate_58	KC249260.1_isolate_63	HAP13	5
AY702020.1_haplotype_C HQ333215.1_haplotype_CytBHapA				
KC249255.1_isolate_44		HAP14	1	
KC249257.1_isolate_60	KC249258.1_isolate_61	AY702021.1_haplotype_D	HAP15	4
HQ333219.1_haplotype_CytBHapE				
KC249259.1_isolate_62	AY702018.1_haplotype_A	HQ333217.1_haplotype_CytBHapC	HAP16	3
KC249261.1_isolate_64		HAP17	1	
KM258437.1_gene_partial_cds_		HAP18	1	
KY640305.1_mitochondrion_complete_genome		HAP19	1	

KY654078.1_isolate_PY_12Jre-872	HAP20	1
AY702019.1_haplotype_B HQ333235.1_haplotype_CytBHapU	HAP21	2
AY702023.1_haplotype_F	HAP22	1
AY702024.1_haplotype_G	HAP23	1
GU807558.1_haplotype_02	HAP24	1
GU807560.1_haplotype_04	HAP25	1
GU807561.1_haplotype_05	HAP26	1
GU807562.1_haplotype_06	HAP27	1
GU807563.1_haplotype_07	HAP28	1
GU807564.1_haplotype_08	HAP29	1
GU807565.1_haplotype_09	HAP30	1
GU807566.1_haplotype_10	HAP31	1
GU807567.1_haplotype_11	HAP32	1
GU807568.1_haplotype_12	HAP33	1
GU807569.1_haplotype_13	HAP34	1
GU807570.1_haplotype_14	HAP35	1
GU807571.1_haplotype_15	HAP36	1
GU807572.1_haplotype_16	HAP37	1
GU807573.1_haplotype_17	HAP38	1
GU807574.1_haplotype_18 GU807575.1_haplotype_19	HAP39	1
GU807576.1_haplotype_20	HAP40	2
GU807577.1_haplotype_21	HAP41	1

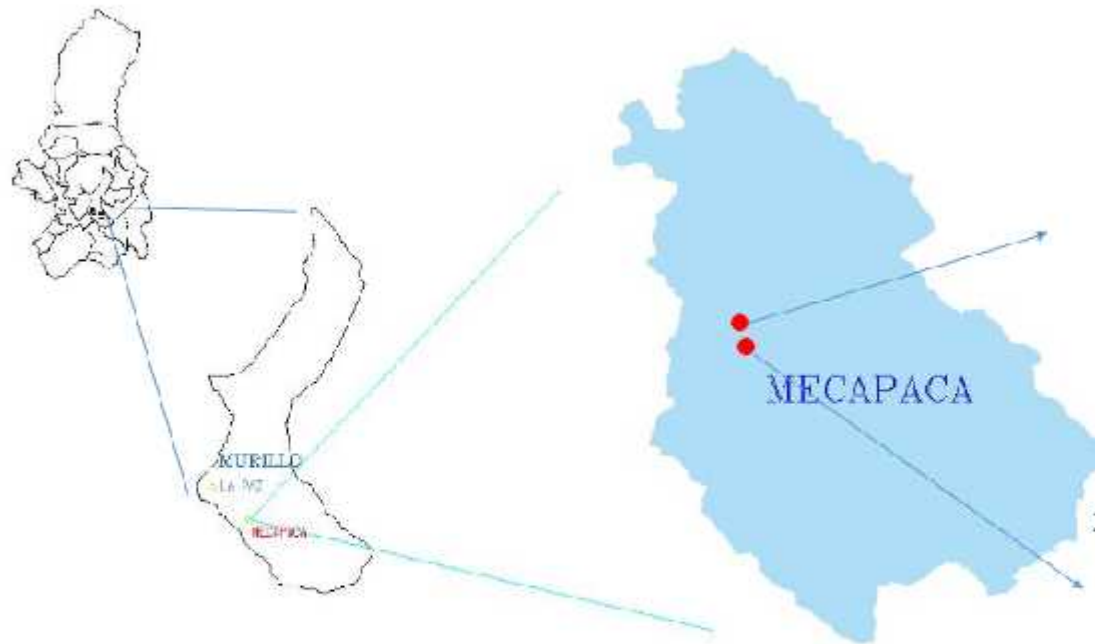
GU807578.1_haplotype_22	HAP42	1
GU807579.1_haplotype_23	HAP43	1
GU807580.1_haplotype_24	HAP44	1
GU807581.1_haplotype_25	HAP45	1
GU807582.1_haplotype_26	HAP46	1
GU807583.1_haplotype_27	HAP47	1
GU807584.1_haplotype_28	HAP48	1
GU807585.1_haplotype_29	HAP49	1
GU807586.1_haplotype_30	HAP50	1
GU807587.1_haplotype_31	HAP51	1
GU807588.1_haplotype_32	HAP52	1
GU807589.1_haplotype_33	HAP53	1
GU807590.1_haplotype_34	HAP54	1
GU807591.1_haplotype_35	HAP55	1
GU807592.1_haplotype_36	HAP56	1
GU807593.1_haplotype_37	HAP57	1
GU807594.1_haplotype_38	HAP58	1
GU807595.1_haplotype_39	HAP59	1
GU807596.1_haplotype_40	HAP60	1
GU807598.1_haplotype_42	HAP61	1
HQ333216.1_haplotype_CytBHapB HW70 YB72 HJ76 YB77	HAP62	5
HQ333220.1_haplotype_CytBHapF	HAP63	1

HQ333222.1_haplotype_CytBHapH	HAP64	1
HQ333223.1_haplotype_CytBHapI	HAP65	1
HQ333224.1_haplotype_CytBHapJ	HAP66	1
HQ333230.1_haplotype_CytBHapQ	HAP67	1
HQ333234.1_haplotype_CytBHapT	HAP68	1

Haplotipos mtCytB fueron obtenidos de Muestras de este trabajo junto a secuencias mtCytB para *Triatoma infestans* de secuencias previamente depositadas en GenBank

ANEXOS

Anexo I Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia.



1.



2.



Comunidad	Sitio	Latitud	Longitud	S	W
1. Huachilla	14	-16.649444	-68.033333	16°39'58.0"	68°02'00.0"
2. Huajchilla	15	16.619722	68.033333	16°38'59.0"	68°02'01.0"

Autor: Arq. S. Alejandra Saavedra Del Castillo

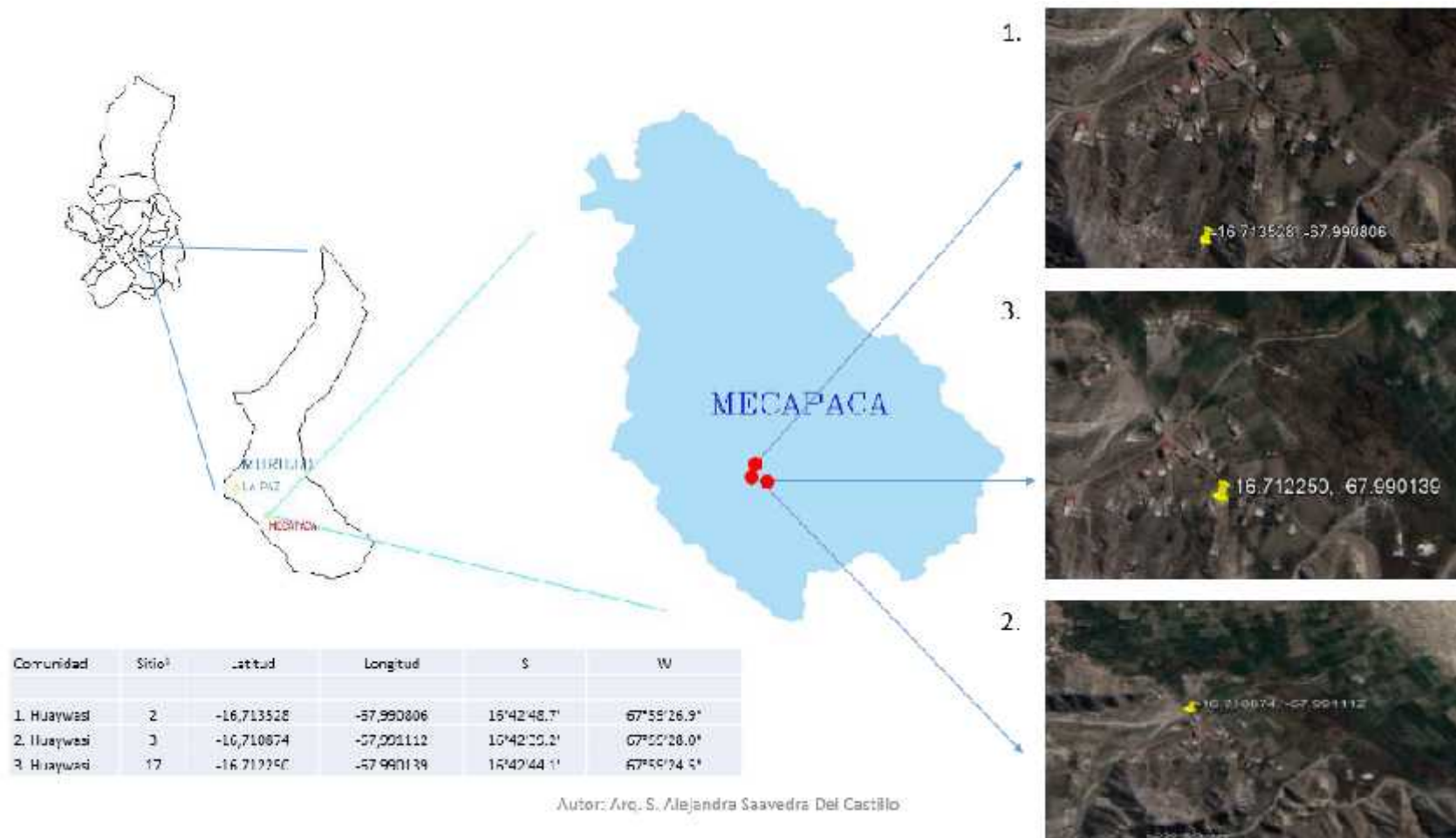
Anexo 1 Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia (continuación...)



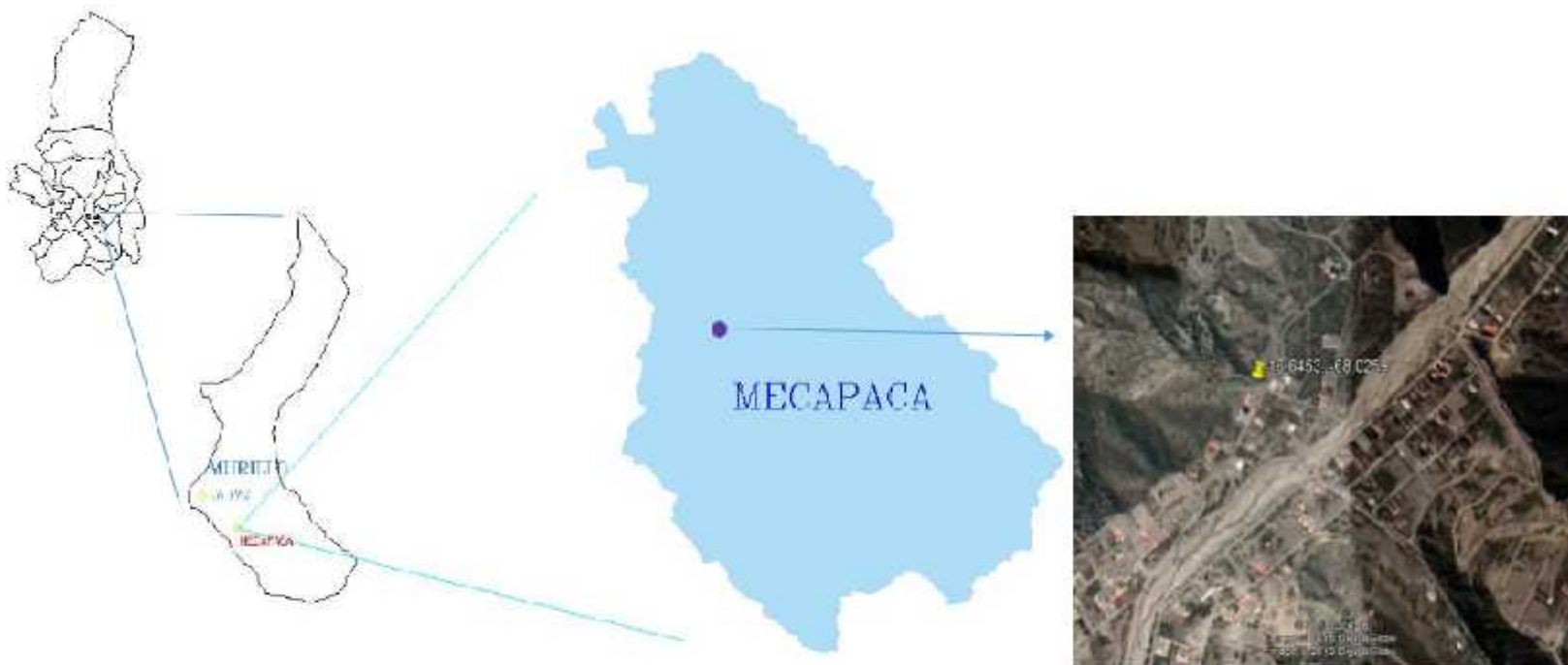
Comunidad	Sitio ¹	Latitud	Longitud	S	W
1. Yanar Eajo	7	16.682102	-68.030918	15°10'55.6"	68°01'51.3"
2. Yanar Eajo	12	-16.682222	-68.031389	15°40'56.0"	68°01'53.0"

Autor: Arq. S. Alejandra Saavedra Del Castillo

Anexo 1 Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia (continuación...)



Anexo 1 Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia (continuación...)



Comunidad	Sitio ¹	Latitud	Longitud	S	W
Carreras	1E	-16,6453	-68,0259	16°38'43.1"	68°01'33.2"

Auto.: Arc. S. Alejandra Saavedra Del Castillo

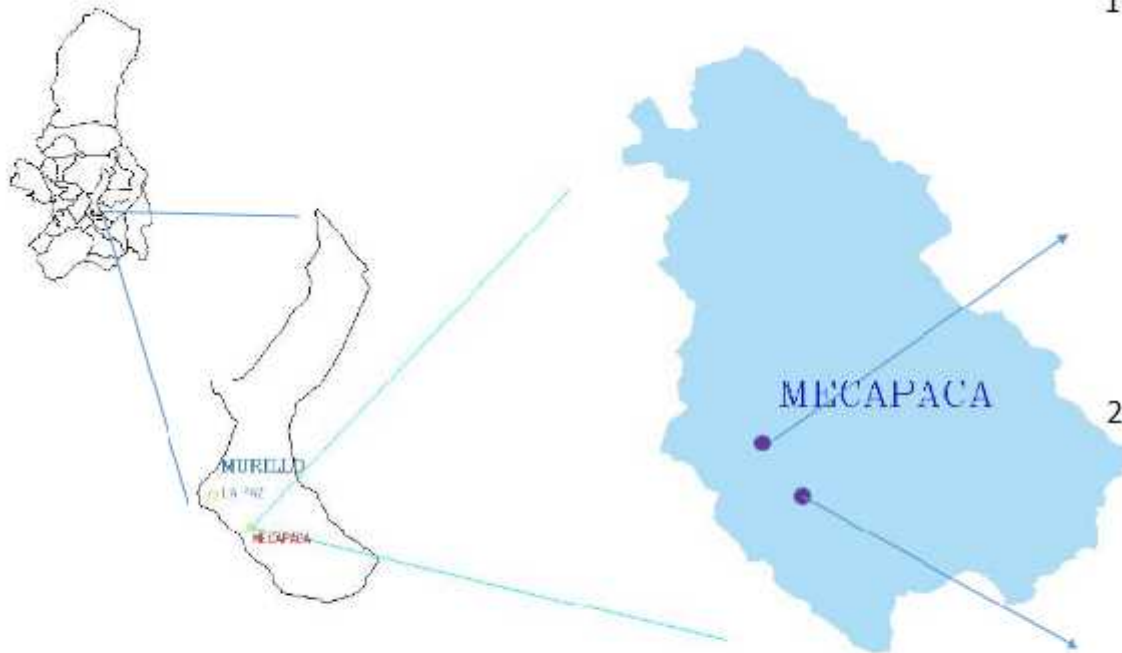
Anexo 1 Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia (continuación...)



Comunidad	Sitio ¹	Latitud	Longitud	S	W
Avircato	5	-15.636000	-68.025937	16°41'09.6"	58°01'33.4"

Autor: Arq. S. Alejandro Saavedra Del Castillo

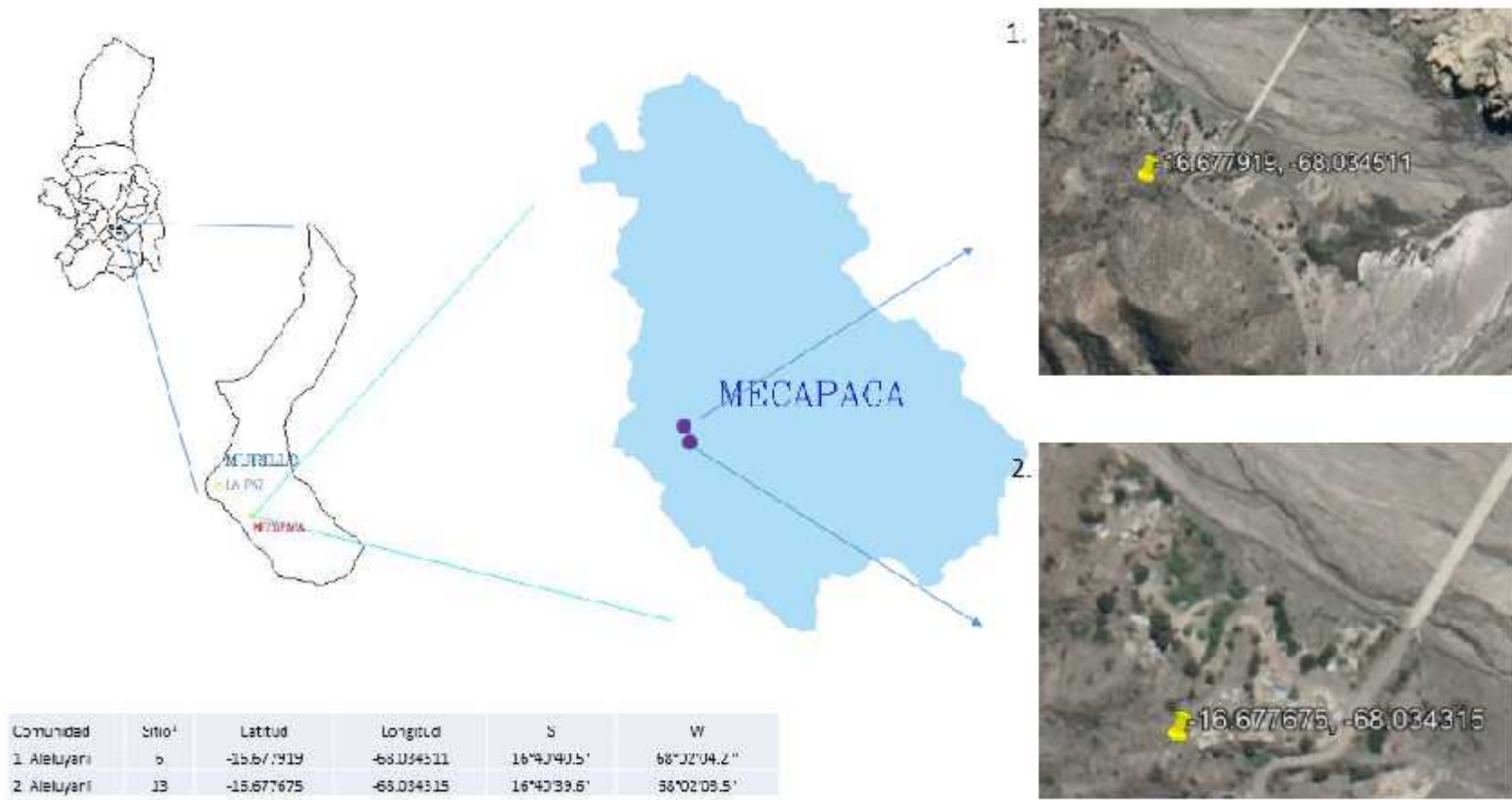
Anexo 1 Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia (continuación...)



Comunidad	Sitio ¹	Lattud	Longitud	S	W
1. Taypichullo	1	-16.670694	-68.035922	16°40'14.5"	68°02'09.3"
2. Taypichullo	10	-16.67249	-68.03	16°40'31.0"	68°01'48.0"

Autor: Arq. S. Alejandra Saavedra Del Castillo

Anexo 1 Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia (continuación...)



Autor: Arq. S. Alejandra Saavedra Del Castillo

Anexo 1 Áreas de estudio en poblaciones urbanizadas del Municipio de Mecapaca Departamento de La Paz-Bolivia (continuación...)



Comunidad	Sitio ¹	Latitud	Longitud	S	W
Chojo	8	-16.609722	-68.030833	16°36'35.0"	68°01'51.0"

Autor: Arq. S. Alejandra Saavedra Del Castillo

Anexo 3 Áreas exploradas: sitios de trampeo (silvestre, doméstico y peridoméstico)



Municipio de Mecapaca



Silvestre



Doméstico, peridoméstico y
silvestre



Doméstico y peridoméstico



Doméstico y peridoméstico
Fotografías: Delma Eunice Zapata, 2017

Anexo 4 Búsqueda de triatominos: sitios estratégicos



Fotografías: Delma Eunice Zapata, 2017

Anexo 5 Hoja de georreferenciación

N° de sitio:		Fecha:		N° trampa			
GPS	S	W		Altura:	N° Punto GPS:		
Modo de captura:		Dissección		Trampa cebo			
Localización del hábitat			Naturaleza del hábitat				
<input type="checkbox"/> Bajo el suelo <input type="checkbox"/> Sobre el suelo <input type="checkbox"/> En altura			<input type="checkbox"/> Artificial, especificar: <input type="checkbox"/> Natural				
<input type="checkbox"/> Árbol <input type="checkbox"/> Frase <input type="checkbox"/> Pared <input type="checkbox"/> Palmera: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Frondosa: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Cactus <input type="checkbox"/> Acantilado <input type="checkbox"/> Talud <input type="checkbox"/> Muro de piedra <input type="checkbox"/> otro:			De que está hecho? <input type="checkbox"/> Vegetación <input type="checkbox"/> Piedras <input type="checkbox"/> < 0,5 m <input type="checkbox"/> 0,5 - 1 m <input type="checkbox"/> > 1 m <input type="checkbox"/> Tierra Madriguera <input type="checkbox"/> Huevo <input type="checkbox"/> Grieta <input type="checkbox"/> Madera Raíces <input type="checkbox"/> Nido <input type="checkbox"/> Leña <input type="checkbox"/> Troncos muertos				
Altura		Profundidad		otro			
Entorno próximo, pastilla de 10 m de diámetro alrededor del hábitat:				Presencia de vida animal			
<input type="checkbox"/> Rocas <input type="checkbox"/> naturales <input type="checkbox"/> Artificiales: <input type="checkbox"/> < 0,5 m <input type="checkbox"/> 0,5 - 1 m <input type="checkbox"/> > 1 m		Vegetación <input type="checkbox"/> Hierbas <input type="checkbox"/> bromelia <input type="checkbox"/> Epífitos <input type="checkbox"/> Arbustos <input type="checkbox"/> Espinosa <input type="checkbox"/> Bajo <input type="checkbox"/> No espinosa <input type="checkbox"/> Alto <input type="checkbox"/> Árbol <input type="checkbox"/> Palmera <input type="checkbox"/> Frondosa		<input type="checkbox"/> Tierra <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> sí <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> Caca <input type="checkbox"/> Pelos <input type="checkbox"/> Plumas <input type="checkbox"/> Semillas <input type="checkbox"/> un animal <input type="checkbox"/> Mamífero <input type="checkbox"/> Ave			
Densidad del medio				Observaciones			
escasa							
abierta							
cerrada							
Captura de triatominos					Fotos des tri		
	N1	N2	N3	N4	N5	H	M
Triatoma infestans							
Triatoma sp							
Otro							

Anexo 6 Clasificación de insectos recolectados a través de estéreo microscopio: Estadios ninfales N1, N2, N4, N5



Fotografías: Delma Eunice Zapata, 2017

Anexo 7 Proceso de extracción de DNA de triatominos



Fotografía: Delma Eunice Zapata, 2017

Anexo 8 Protocolo de PCR y condiciones de temperatura para el marcador mt Cyt B

Componentes	Solución Inicial	Solución Final	Mix/ unidad
Buffer 10x	10X	1X	3 μ l
dNTPs	10mM	0,2mM	0,6 μ l
Primer F	10 μ M	0,4 μ M	1,2 μ l
Primer R	10 μ M	0,4 μ M	1,2 μ l
Taq 5UI/ μ l	5UI/ μ l	0,05UI	0,3 μ l
MgCl ₂	50mM	0,75mM	0,45 μ l
H ₂ O csp 13 μ l			19,25 μ l
DNA	~10ng/ μ l		4 μ l
Total			30 μl

XI		x 35 ciclos		XI	
95°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
05:00	00:30	00:30	00:30	05:00	∞

Anexo 9 Protocolo de PCR y condiciones de temperatura para el marcador ITS-2

Componentes	Solución Inicial	Solución Final	MIX por unidad
Buffer 10x	10X	1X	3 µl
dNTPs	10mM	0,2mM	0,6 µl
Primer F	10µM	0,4µM	1,2 µl
Primer R	10µM	0,4µM	1,2 µl
Taq 5UI/µl	5UI/µl	0,05UI	0,3 µl
MgCl₂	50mM	0,75mM	0,45 µl
H₂O csp 13µl			19,25 µl
DNA	~10ng/µl		4 µl
Total			30 µl

X1	x 35 ciclos			X1	
95°C	94°C	65°C	72°C	72°C	4°C
05:00	00:30	00:30	00:30	05:00	∞

Anexo 10 Protocolo de Kit de purificación de DNA

Quick Reference Protocol Card

illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit

28-9034-70 (100 purifications)

28-9034-71 (250 purifications)

B. Protocol for purification of DNA from TAE and TBE agarose gels

- Check appropriate volume of ethanol added to **Wash buffer type 1**

➕ Add ⌚ Spin ⌚ Incubate

1. Sample capture

- Weigh a DNase-free 1.5 ml microcentrifuge tube
- Excise band of interest and place in microcentrifuge tube
- Weigh microcentrifuge tube plus agarose gel band
- Calculate weight of agarose gel slice
- ➕ 10 µl Capture buffer type 3 for each 10 mg agarose gel slice
- Mix by inversion
- ⌚ 60°C until agarose is completely dissolved
- Check color of Capture buffer type 3-sample mix is yellow or pale orange



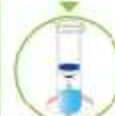
2. Sample binding

- ➕ 600 µl Capture buffer type 3-sample mix to assembled GFX MicroSpin™ column and Collection tube
- ⌚ 60 s room temperature
- ⌚ 30 s 16 000 × g. Discard flow through
- Place GFX MicroSpin column inside the same Collection tube
- Repeat Sample Binding step until all sample is loaded



3. Wash & dry

- ➕ 500 µl Wash buffer type 1
- ⌚ 30 s 15 000 × g
- Discard Collection tube. Transfer GFX MicroSpin column to a clean 1.5ml DNase-free microcentrifuge tube.



4. Elution

- ➕ 10-50 µl Elution buffer type 4 OR type 6
- ⌚ 60 s room temperature
- ⌚ 60 s 16 000 × g
- Retain flow through
- Store purified sample DNA at -20°C



imagination at work

Anexo 13 Distancia entre sitios de trampeo positivos.

Anexo 14 Distancia entre sitios de captura y la Ciudad de La Paz, Mollasa

