



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL
CITOCROMO B EN LOS VECTORES DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :
FERNANDO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

TUTOR: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ



MÉXICO, D.F.

AGOSTO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTUDIO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL CITOCROMO B EN LOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de Doctorado se realizó bajo la dirección de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez en el laboratorio de Tripanosomiasis, en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Diego González Halphen Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega Instituto de Biotecnología, UNAM

Se agradece la colaboración del Dr. Ricardo Alejandro-Aguilar de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por las donaciones de insectos, préstamo de equipo y las sugerencias y observaciones realizadas a este trabajo.

También agradezco, al Dr. Alejandro Martínez-Ibarra de la Universidad de Guadalajara campo CUSUR, por las donaciones de triatominos distribuidos en áreas simpátricas, por el trabajo realizado en las colectas de campo, así como las sugerencias y comentarios en la escritura de los artículos.

Al Dr. Juan Pedro Laclette y a la M en C. Patricia de la Torre del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por la participación en la secuenciación de todos los ejemplares analizados.

A la Dra. Ana María Cevallos-Gaos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por la colaboración en la realización de algunas técnicas moleculares.

A la Dra. Silvia Catalá del Centro Regional de Investigación Científica y Transferencia Tecnológica (CRILAR), Anillaco, La Rioja, Argentina, por la colaboración en la realización de los análisis de morfología cuantitativa.

A la Dra. Carmen Wachter de la Facultad de Química, UNAM, por su enseñanza y colaboración en los análisis de SSCP y DGGE.

Finalmente se reconoce la colaboración de la M en C. Guiehdani Villalobos Castillejos por su participación en las colectas de campo, así como en la ayuda para la identificación morfológica de los insectos analizados y por la obtención de parte de las secuencias obtenidas del ITS-2.

El presente estudio fue apoyado por PAPIT de la DGAPA con número de proyecto IN212806, así mismo, agradezco la beca que gocé durante los estudios de Doctorado otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado del examen estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Diego González Halphen
Vocal	Dra. María Teresa Tusié Luna
Secretario	Dr. Mario Enrique Zurita Ortega
Suplente	Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
Suplente	Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

DEDICATORIA

A mis padres:

Francisco y Nelba, por ser mis guías y apoyarme en todos mis proyectos, por estar siempre a mi lado y enseñarme el verdadero valor de la vida, gracias por regalarme la dicha de ser su hijo.

A mis hermanos:

Ulises, Francisco, Magdalena, Benjamín, Patricia, Nelba y Arturo, por apoyarme y darme ánimos para seguir caminando y concluir mis metas, gracias por brindarme la oportunidad de ser su hermano.

A mis sobrinos:

Héctor, Ariel, Kenia, Tania, Naha-hib, Yakin, Sebastián, Mariana, Kevin, Diego, Daira y Gieraldine, por ser mi fuente eterna de inspiración.

A mi otra familia:

Alma, Alicia, Angélica, Fabián, Francisco, José y Laura, por las risas y el apoyo que me han dado.

A mi novia:

Guiéhdani, por estar siempre a mi lado, tanto en las buenas como en las malas, por escucharme y apoyarme cuando se necesita a una amiga o una pareja, gracias por ser incondicional y regalarme todo tu amor.

A mis amigos:

Alejandra, Elizabeth, Deyanira, Gabriel, Luz y Rodrigo: Por las risas y los buenos momentos que me ayudaron a seguir adelante y no quedarme en el intento.

A mis compañeros de laboratorio:

Andrea V., Andrea J., Cenia, Ignacio, José Antonio, Natalia, Noemí y Ma. Luisa, Por las críticas y sus comentarios en la infinidad de seminarios que les presente.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
I.1. ABSTRACT	2
II. INTRODUCCIÓN	3
II.1. Enfermedad de Chagas	3
II.2. Manifestaciones y patología en la Enfermedad de Chagas	3
II.3. Transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
II.4. Enfermedad de Chagas en México	5
II.5. Triatomíneos	6
II.6. Ciclo de vida de los triatomíneos	7
II.7. Morfología	8
II.8. Distribución	9
II.9. Vectores eficientes en la transmisión de la Enfermedad de Chagas	12
II.10. Taxonomía y Problemas taxonómicos.....	14
II.11. Empleo de marcadores moleculares en triatomíneos	15
II.12. Utilidad del <i>cit b</i>	17
II.13. Análisis morfológicos cuantitativos.....	19
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	23
VI.1. Estudios genéticos.....	23
VI.1.a. Triatomíneos.....	23
VI.1.b. Secuenciación.....	25
VI.1.c. Análisis genético de las secuencias.....	27
VI.1.d. Southern blot.....	29
VI.1.e. Análisis del Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas de ADN.....	30
VI.2. Estudios morfométricos.....	30

VI.2.a. Análisis de los fenotipos antenales.....	30
VII RESULTADOS	32
VII.1. Análisis de las secuencias en especies tipo.....	32
VII.2. Análisis de las secuencias del <i>citocromo b</i> en especies simpátricas.....	39
VII.3. Análisis de secuencias altamente variables del gen del <i>citocromo b</i>	45
VIII DISCUSIÓN	57
VIII.1. Relaciones filogenéticas de los vectores de la Enfermedad de Chagas: Utilidad del <i>citocromo b</i> como marcador molecular.....	57
VIII.2. Análisis de las secuencias del citocromo b en especies simpátricas.....	60
VIII.3. Análisis de secuencias altamente variables del gen del <i>citocromo b</i>	63
IX CONCLUSIONES	66
X PERSPECTIVAS	67
XI PRODUCTIVIDAD EN EL DOCTORADO	68
XII BIBLIOGRAFÍA	71
XIII ANEXOS	83

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS

FIGURAS	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
Figura 1.	Transmisión de <i>T. cruzi</i> en el humano.....	5
Figura 2.	Estadios morfológicos durante el ciclo de vida dos especies de triatomos.....	7
Figura 3.	Características morfológicas generales de los triatomos usadas para clasificarlos.....	9
Figura 4.	Distribución de las especies de triatomos en la República Mexicana.....	11
Figura 5.	Esquema de la ubicación del <i>cit b</i> dentro del ADN mitocondrial.....	18
Figura 6.	Características morfológicas de los triatomos colectados en áreas simpátricas.....	24
Figura 7.	Receptores antenales presentes en triatomos.....	31
Figura 8.	Árboles filogenéticos empleando las secuencias del <i>cit b</i> y del ITS.2.....	36
Figura 9.	Árbol filogenético bayesiano general empleando las secuencias del <i>cit b</i>	37
Figura 10.	Árbol filogenético bayesiano usando ambas secuencias <i>cit b</i> +ITS-2.....	38
Figura 11.	Árbol filogenético bayesiano de especies de triatomos simpátricos empleando las secuencias del <i>cit b</i>	40
Figura 12.	Análisis discriminante para las poblaciones de triatomos en simpatria.....	44
Figura 13.	Presencia de inserciones y deleciones entre las secuencias de los individuos de la especie <i>T. rubida</i>	47
Figura 14.	Hibridación de ADN nuclear para 4 diferentes especies de triatomos.....	48
Figura 15.	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos para 6 clonas del individuo 26 perteneciente a la especie <i>T. longipennis</i>	50
Figura 16.	Alineamiento de la secuencia de proteínas para 3 clonas del individuo 26 de la especie <i>T. longipennis</i>	50
Figura 17.	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos para 5 clonas del individuo 91 perteneciente a la especie <i>T. rubida</i>	52
Figura 18.	Alineamiento de la secuencia de proteínas para 5 clonas del individuo 91 perteneciente a la especie <i>T. rubida</i>	52
Figura 19.	Amplificación por PCR del gen del <i>cit b</i> usando ADN y cADN de diferentes	53

	muestras de triatominos.....	
Figura 20.	Análisis de SSCP para las especies de triatominos analizadas.....	54
Figura 21.	Mutaciones puntuales en diferentes individuos de la especie <i>T. dimidiata</i>	55
Figura 22.	Modelaje molecular de la proteína del citocromo b para las diferentes secuencias de <i>T. dimidiata</i>	56
Figura 23.	Alineamiento de secuencias del citocromo b de diferentes organismos.....	56

TABLAS

Tabla 1.	Índices de infección de triatominos colectados en México.....	13
Tabla 2	Triatominos utilizados en el estudio.....	23
Tabla 3.	Procedencia de las poblaciones de triatominos tipo e híbridos.....	25
Tabla 4.	Distancias genéticas para las especies de triatominos analizados.....	35
Tabla 5.	Desviación estándar del número de receptores antenales en las diferentes especies del complejo <i>Phyllosoma</i>	42
Tabla 6.	Análisis multivariado de los fenotipos antenales de las especies pertenecientes al complejo <i>Phyllosoma</i>	43
Tabla 7.	Porcentaje de identidad del citocromo b a nivel de nucleótidos y aminoácidos.	46
Tabla 8.	Diferencias genéticas en 6 clonas del individuo 26 de la especie <i>T.</i> <i>longipennis</i>	49
Tabla 9.	Identidad genética a nivel de aminoácidos para 5 clonas del individuo 91 perteneciente a la especie <i>T. rubida</i>	51
Tabla 10.	Bandas identificadas por SSCP para los amplificadas provenientes de ADN o de cADN.....	54

I. RESUMEN

Las secuencias de nucleótidos del gen *citocromo b* (*cit b*) y del espaciador interno transcrito 2 (ITS-2) fueron analizadas para los siguientes especies de triatomíneos: *Triatoma bassolsae*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma mazzottii*, *Triatoma mexicana*, *Triatoma pallidipennis*. *Triatoma picturata* y *Triatoma phyllosoma* pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, así como *Triatoma barberi*, *Triatoma brailovskyi*, *Triatoma bolivari*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma lecticularia*, *Triatoma recurva*, *Triatoma rubida*, *Triatoma protracta*, *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, todos ellos importantes vectores transmisores de *Trypanosoma cruzi* agente causal de la enfermedad de Chagas en México, Centro y Sudamérica. Con las secuencias del *cit b* se pudo identificar a cada una de las especies de triatomíneos analizados en contraste con las secuencias del ITS-2 no identificando diferencias entre *T. longipennis* de *T. picturata*, así como *T. pallidipennis* de *T. bassolsae*. Los resultados obtenidos con ambos marcadores apoyan la inclusión de *T. brailovskyi*, *T. bolivari*, *T. dimidiata*, *T. recurva*, *T. bassolsae*, *T. gerstaeckeri* y *T. mexicana* a el complejo *Phyllosoma*. También se pudo identificar por primera vez la relación filogenética del complejo *Phyllosoma* con otros complejos de especies de importancia epidemiológica en México. El empleo de las secuencias del *cit b* con especies distribuidas en áreas simpátricas, sugiere fuertemente modificar el estatus taxonómico de algunas de las especies analizadas y considerarlas como subespecies con la posibilidad de entrecruzamiento. Estos análisis fueron corroborados con los estudios de morfología cuantitativa (receptores antenales). Finalmente, nuestros análisis detectaron la presencia de pseudogenes y heteroplasmia en el gen del *cit b* en las especies *T. longipennis*, *T. picturata*, *T. dimidiata* y *T. rubida*.

I.1 ABSTRACT

The nucleotides sequences of the *cytochrome b* gene (*cit b*) of mtADN and internal transcribed spacer 2 (ITS-2) of rADN were analyzed for the following species of triatomine: *Triatoma bassolsae*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma mazzottii*, *Triatoma mexicana*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma picturata*, and *Triatoma phyllosoma* belonging to the *Phyllosoma* complex, as well as, *Triatoma barberi*, *Triatoma brailovskyi*, *Triatoma bolivari*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma lecticularia*, *Triatoma recurva*, *Triatoma rubida*, *Triatoma protracta*, *Triatoma infestans*, and *Rhodnius prolixus*, all of them are important vectors because transmit *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease in Mexico, Central and South America. With the sequences of *cit b* it could be identified each one of the triatomines species analyzed. In contrast, with the sequences of ITS-2 it was not possible to identify *T. longipennis* of *T. picturata* and *T. pallidipennis* of *T. bassolsae* species. The results obtained with both markers support the inclusion of *T. brailovskyi*, *T. bolivari*, *T. dimidiata*, *T. recurva*, *T. bassolsae*, *T. gerstaeckeri* and *T. mexicana* to the *Phyllosoma* complex. It was also possible to identify for the first time the phylogenetic relationship of the *Phyllosoma* complex with other complexes of species of epidemiologic importance in Mexico. The use of the sequences of the *cit b* with species distributed in sympatric areas, strongly suggests to modify the taxonomic status of some these analyzed species and to consider them as subspecies with crossbreeding possibility. These results were corroborated with the studies of quantitative morphology (antennal sensillum receptor). Finally, our analyses detected pseudogenes and heteroplasmic presence of the *cit b* gene in *T. longipennis*, *T. picturata*, *T. dimidiata*, and *T. rubida* species.

II. INTRODUCCIÓN

Muchas de las enfermedades que causan grandes trastornos a la salud humana son transmitidas por insectos que conviven íntimamente con el hombre, y entre estos vectores se encuentran los triatominos (Hemiptera: Reduviidae). Estos son insectos exclusivamente hematófagos y de importancia epidemiológica por ser la principal vía de transmisión del parásito protozario *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana. Varias de estas especies de triatominos han colonizado viviendas humanas logrando transmitir este protozario tanto al hombre, como a sus animales domésticos. La enfermedad se asocia a condiciones socioeconómicas precarias principalmente a los materiales de construcción de las viviendas que pueden favorecer la permanencia de estos insectos (WHO, 2002).

II.1. Enfermedad de Chagas

En términos de salud pública e impacto económico, la Enfermedad de Chagas es la más importante infección parasitaria en Latinoamérica (Miles *et al.*, 2003). La Organización Mundial de la Salud estima que existen 18 millones de personas infectadas con el parásito en toda América y 100 millones más en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2002). Sin embargo, recientemente algunos autores calculan una reducción a 10 millones de personas infectadas, debido a las medidas de control en la transmisión del parásito en países como Brasil, Chile y Uruguay (Schofield *et al.*, 2006). Además se reportan 21 000 muertes al año por secuelas crónicas de la enfermedad de Chagas, por lo que ésta representa un serio problema de salud pública en 15 países de Latinoamérica (WHO, 2002).

II.2. Manifestaciones y patología de la Enfermedad de Chagas

Durante la enfermedad de Chagas se presentan dos fases, la primera de ellas conocida como fase aguda, caracterizada por la presencia del parásito en circulación sanguínea y por una sintomatología clínica variable, pudiendo presentarse fiebre, vómito, diarrea, náuseas, anorexia, linfadenopatías y hepatomegalia. En algunos casos, se observa

la presencia de cardiopatías y en casos extremos miocardítis chagásica y meningoencefalítis, ocasionando la muerte del individuo (Shofield, 1994; WHO, 2002).

La segunda fase de ésta enfermedad es la fase crónica, la cual a su vez se subdivide en la fase indeterminada, que se presenta de 8 – 10 semanas después de la fase aguda, caracterizada por la ausencia de manifestaciones clínicas, pero con una respuesta serológica positiva (presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*), permaneciendo el individuo sin sintomatología durante muchos años. Posteriormente el individuo infectado puede permanecer en fase indeterminada ó evolucionar a la siguiente etapa de la enfermedad (WHO, 2002). La segunda etapa de la fase crónica se conoce como fase crónica sintomática, desarrollada aproximadamente por el 30% de las personas en fase crónica indeterminada. La fase crónica sintomática presenta patologías severas, como trastornos cardíacos (degeneración del miocardio, presencia de arritmias, defectos en la conducción ventricular) y gastrointestinales (disturbios en la dilatación del sistema digestivo, así como, la alteración de los movimientos peristálticos). Principalmente hay una dilatación progresiva del corazón y el tubo digestivo, asociada a la colonización del parásito, produciéndose los mega-órganos que causan la muerte en los individuo que los presentan (Shofield, 1994; WHO, 2002).

II.3. Transmisión de *Trypanosoma cruzi*

La principal vía para adquirir la infección con *T. cruzi*, es la transmisión a través del triatomino infectado. La transmisión por el triatomino es una infección de tipo estercolaria, es decir, cuando se alimenta el insecto, se liberan parásitos en las heces y en la orina, los cuales se introducen a los individuos por el sitio de picadura. De esta manera, se infectan a más de 100 diferentes especies de animales silvestres y domésticos, incluyendo el humano (WHO, 2002). El parásito *T. cruzi* (Figura 1) puede invadir cualquier tipo celular, donde se multiplica hasta llegar a lizarlos, liberándose al torrente sanguíneo e invadiendo de nuevo otras células, y el ciclo de transmisión de *T. cruzi* se cierra cuando un nuevo triatomino se infecta al alimentarse de la sangre contaminada del individuo (Tyler y Ehgman, 2001; WHO, 2002).

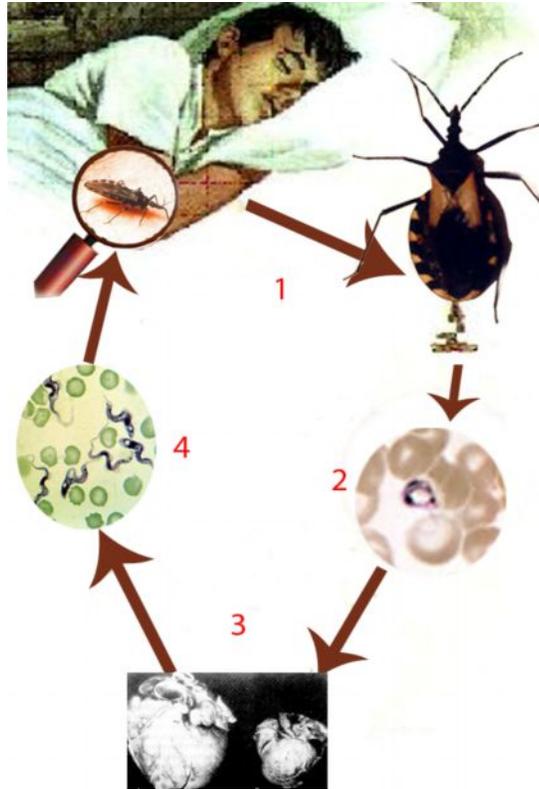


Figura 1. Transmisión de *T. cruzi* en el humano. 1) El triatominos se alimenta y al mismo tiempo defeca, depositando en las heces a los parásitos; 2) los parásitos entran al organismo a través del sitio de picadura o por acción mecánica; 3) dentro del organismo pueden invadir cualquier tipo celular, principalmente células cardíacas, en donde se replican; 4) al romper las células, los parásitos son liberados de nuevo al torrente sanguíneo o pueden invadir otras células. 1) Nuevas chinches pueden alimentarse del individuo, siguiendo la transmisión a otros animales. Tomado de www.google.com y modificado por Martínez Fernando.

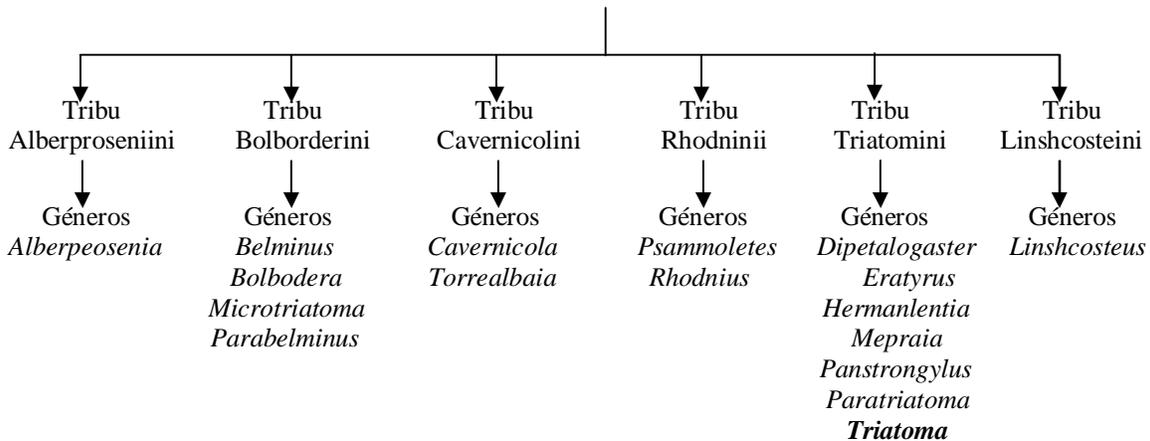
II.4. Enfermedad de Chagas en México

En México se han realizado varios estudios serológicos que detectan la presencia de individuos infectados con *T. cruzi* reportando aproximadamente 14,500 casos hasta el 2004 en todo el país (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2007). Sin embargo, los estudios de seroprevalencia en el país son muy variables, por ejemplo, se ha reportado un 17.8% de seropositividad para el estado de Jalisco (Trujillo *et al.*, 2000), 20% para Morelos (Rangel-Flores *et al.*, 2001) y 50% para Oaxaca (Goldsmith *et al.*, 1978). Por otro lado, también se realizó una encuesta serológica nacional entre 1987 y 1989, para detectar anticuerpos específicos para *T. cruzi*, en el cual se reportó un 1.6% de positividad, siendo los estados de Chiapas (2%) y Oaxaca (2%) los que mostraban los más altos porcentajes (Velasco-Castrejón *et al.*, 1992).

II.5. Triatominos

Aunque se han infectado experimentalmente una variedad de insectos con *T. cruzi*, solo los triatominos son epidemiológicamente importantes en la transmisión de la Enfermedad de Chagas (Lent y Wygodzinsky, 1979). Para el género *Triatoma*, Lent & Wygodzinsky en 1979 postularon los siguientes taxa:

Reino: Animalia; **Phyllum:** Arthropoda; **Subphyllum:** Mandibulata; **Clase:** Insecta;
Subclase: Pterygota; **Orden:** Hemiptera; **Suborden:** Heteroptera; **Familia:** Reduviidae
Subfamilia: Triatominae



La subfamilia Triatominae contiene numerosas especies que debido a su comportamiento y fisiología similares, pueden actuar como vectores reales o potenciales de la enfermedad (Schofield, 1994). La principal característica biológica de los triatominos, es su obligada hematofagía, este tipo de alimentación incluye a los estadios ninfales y a los adultos (Figura 2). Entre sus fuentes de alimento se pueden mencionar a mamíferos silvestres, tanto terrestres como arborícolas, especialmente didélfidos¹, xenarthra² y roedores, y algunos se han encontrado asociados con aves, reptiles y murciélagos (Lent & Wygodzinsky, 1979, WHO, 2002; Moffitt *et al.*, 2003).

¹ Orden de mamíferos cuyas hembras tienen una bolsa donde se encuentran las madres y donde permanecen encerradas las crías durante parte de su desarrollo (sinónimo de marsupiales).

² Superorden Xenarthra conformado por mamíferos placentarios que incluyen a los osos hormigueros, armadillos y perezosos.

II.6. Ciclo de vida de los Triatominos

Los triatominos son ovíparos, estos insectos presentan un ciclo vital con metamorfosis incompleta, pasando por el huevo y por cinco estadios ninfales hasta desarrollar el estadio adulto (Figura 2). La ovoposición generalmente empieza de 10 a 30 días después de la copulación. Las hembras pueden ovopositar de 100 a 600 huevos a lo largo de su vida; los tiempos de eclosión de cada huevo pueden variar de 10 hasta 40 días. Sin embargo, el número de huevos, el tiempo de eclosión y en general el ciclo de desarrollo de los triatominos varía de acuerdo a la especie, a las condiciones ambientales específicas y su capacidad para alimentarse (Schofield, 1984; Schofield, 1994, Guarneri *et al.*, 2000, Martínez-Ibarra *et al.*, 2003a, b).

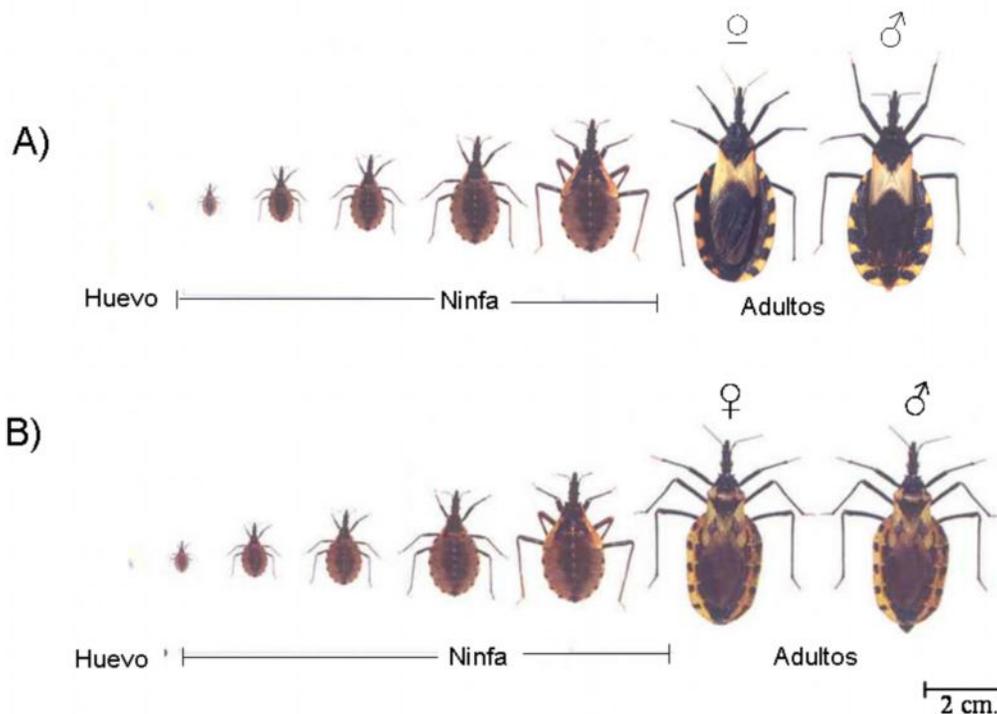


Figura 2. Estadios morfológicos durante el ciclo de vida de dos especies de triatominos. A) *Triatoma pallidipennis*; B) *T. picturata*. Se muestran las similitudes entre los estadios ninfales de ambas especies y la morfología de los adultos tanto hembras como machos. Tomado de folletos realizados por la Secretaría de Salud.

II.7. Morfología

La estructura general de los triatominos no difiere significativamente de otros redúvidos. Son artrópodos aplanados dorsoventralmente, presentan una cabeza pequeña generalmente cilíndrica y alargada, poseen ojos compuestos, antenas divididas en cuatro artejos insertadas lateralmente, articulaciones membranosas entre el segundo y tercer artejo del rostro y la ausencia de glándulas de esencia en el lado dorsal del abdomen (Figura 3) (De La Merced, 1987). Los adultos se diferencian de las ninfas por la presencia de ocelos³, genitales externos bien desarrollados y en la mayoría de los casos la presencia de alas anteriores y posteriores bien desarrolladas (Lent y Wygodzinsky, 1979). Las hembras pueden ser reconocidas por el ápice abdominal truncado, en tanto que en los machos es redondeado y generalmente existe dimorfismo sexual, siendo las hembras más grandes que los machos. Entre las estructuras que se utilizan para clasificarlos morfológicamente se encuentran: la estructura general del cuerpo y su coloración, tamaño y posición de las antenas, las alas, la cabeza y los genitales, entre otros. El tamaño del insecto así como la coloración del cuerpo y el conxivo son las características más usadas para la identificación. Las coloraciones van desde amarillas hasta negras, con manchas de diferentes tonalidades, como son naranjas, cafés, amarillas, blancas o rojas (Lent y Wygodzinsky, 1979).

³ Tipo de órgano fotorreceptor localizado en la cabeza de los insectos.

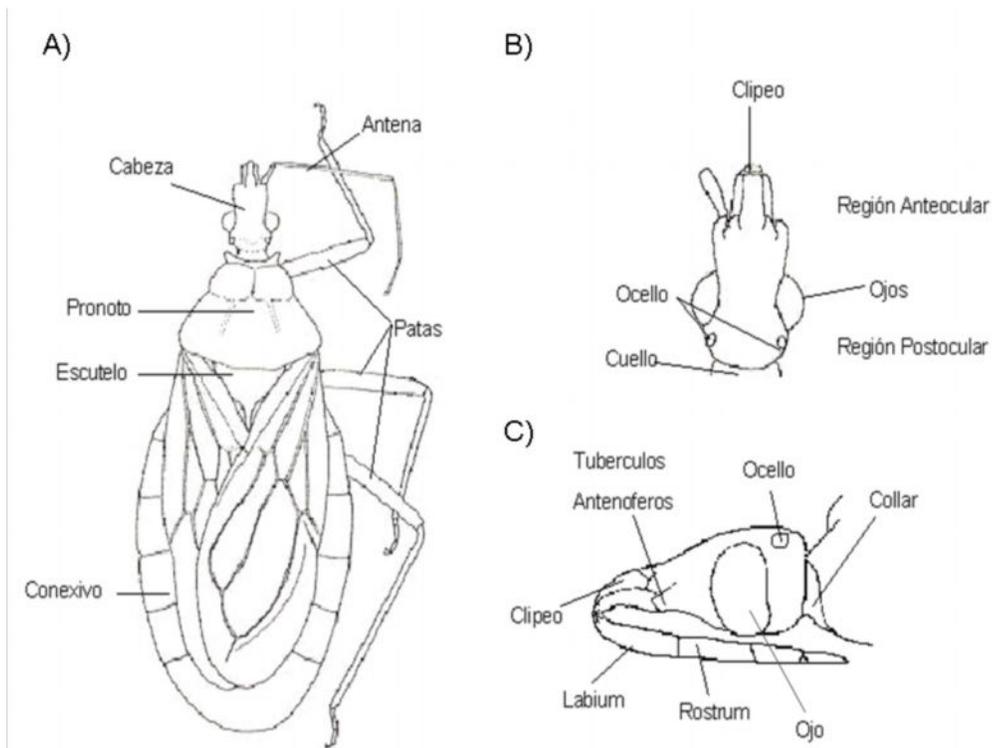


Figura 3. Características morfológicas generales de los triatominos usadas para clasificarlos. A) Vista superior cuerpo completo, B) vista dorsal de la cabeza y C) Vista lateral de la cabeza. Tomado del Lent y Wygodzinsky, 1979.

II.8. Distribución

El área de distribución de los triatominos se encuentra limitada a las regiones neotropicales y neoárticas, reportándose especies desde Salt Lake City en Estados Unidos a 41° latitud norte hasta la Patagonia en Argentina a 46° latitud sur, además se han reportando en la India y en Asia (De La Merced, 1987; Carcavallo *et al.*, 2000; WHO, 2002). Estos insectos se llegan a establecer a altitudes entre 200 y 1500 m.s.n.m., aunque también se han reportado triatominos a 4100 m.s.n.m. en algunas regiones de Bolivia (WHO, 2002). México se encuentra entre la altitud y la latitud propicia para el establecimiento de los triatominos, reportándose éstos en la mayoría del territorio nacional. Debido a que los estudios de distribución de los insectos en el país no han sido minuciosos, no se descarta la posibilidad de encontrar nuevos lugares de establecimiento, además de nuevas especies u otras especies no reportadas. En México se reportan hasta el momento 33 especies de triatominos distribuidas en siete géneros: *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Belminus*, *Triatoma* y *Rhodnius* (Zárate y Zárate, 1985; Galvão *et al.*, 2003), de las cuales, 28 especies son endémicas y más de la mitad se

han reportado infectadas con *T. cruzi* (Zárate y Zárate, 1985; Vidal-Acosta *et al.*, 2000) (Figura 4).

Entre las especies reportadas endémicas de México, se encuentran aquellas pertenecientes al complejo *Phyllosoma* el cual está conformado por las especies: *T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. mexicana* y *T. bassolsae* (Martínez *et al.*, 2005, 2006). Estas se encuentran distribuidas principalmente en el centro del país y representan especies de importancia epidemiológica debida principalmente a sus porcentajes de infección con *T. cruzi* y sus índices de colonización. En cuanto a su distribución, *T. pallidipennis* es la especie del complejo *Phyllosoma* más ampliamente distribuida en el país, reportándose en 13 estados (Guerrero, Morelos, Guanajuato, Jalisco, Puebla, Querétaro, Estado de México, Colima, Michoacán, Oaxaca, Zacatecas, Nayarit y Veracruz), seguida de *T. longipennis*, la cual se distribuye en seis (Jalisco, Nayarit, Guanajuato, Colima, Aguascalientes y Zacatecas); en tanto que *T. bassolsae* y *T. phyllosoma* se encuentran sólo en un estado (Puebla y Oaxaca respectivamente). *T. mazzottii* y *T. picturata* se distribuyen en estados de la costa del pacífico y *T. mexicana* se encuentra en estados del centro del país (Galvão *et al.*, 2003; López-Cárdenas *et al.*, 2005; Villalobos, 2005; Cohen *et al.*, 2006; Becerril-Flores *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2007).



Figura 4. Distribución de las especies de triatominos reportadas en México. Revisión 1979-2008. Fuente Martínez, 2003 y Villalobos, 2005.

II.9. Vectores eficientes en la transmisión de la Enfermedad de Chagas

Entre los criterios que se toman en cuenta para poder definir si una especie es un vector eficiente en la transmisión de la enfermedad de Chagas están: altos porcentajes de infección⁴, capacidad de domiciliación⁵, hábito alimenticio y el tiempo corto de defecación después de alimentarse (WHO, 2002). Dentro de los vectores que cumplen éstas características están: *T. dimidiata* que es el vector mas importante de la enfermedad de Chagas en la península de Yucatán y en otros estados de la República (Veracruz, Hidalgo, Oaxaca y San Luis Potosí) reportándose índices de infección de 4.1 a 14%, además de encontrarse asociado al domicilio y al peridomicilio (Guzmán-Marín *et al.*, 1990, 1992). *Dipetalogaster maximus* es el vector más frecuentemente colectado en la región de Baja California Sur, encontrándose tasas de infección con *T. cruzi* de 7.0% (Jiménez *et al.*, 2003). *T. rubida* en el estado de Sonora con un 90% de infección (Paredes *et al.*, 2001) y *T. barberi* especie ampliamente distribuida y con índices de al menos 70% de infección con *T. cruzi* (Cortés-Jiménez *et al.*, 1996; Magallón-Gastélum *et al.*, 1998; Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Flores, 2001) (Tabla 1).

En cuanto a las especies del complejo *Phyllosoma*, *T. longipennis* es uno de los vectores más importantes de la enfermedad de Chagas en el occidente del país, reportándose en los estados de Jalisco y Nayarit con índices de infección de 50 y 55% respectivamente, (Magallón-Gastélum *et al.* 1998, Martínez-Ibarra *et al.*, 2001, 2003b; Walter *et al.*, 2007); *T. picturata* se ha reportado en localidades de Nayarit con índices de infección de hasta 52% (Flores, 2001; Martínez-Ibarra *et al.*, 2001); *T. pallidipennis*, es también un vector ampliamente distribuido en el país y presenta altos porcentajes de infección, por ejemplo en Michoacán se ha reportado un 36.4% mientras que en Morelos el índice de infección es de hasta 88% (Cortés-Jiménez *et al.*, 1996); para *T. phyllosoma* se han reportado del 9.1 al 66.7% de infección en el estado de Oaxaca (Ramsey *et al.*, 2000; Vidal-Acosta *et al.*, 2000) y finalmente para *T. bassolsae* no se tiene información acerca de porcentajes de infección en campo (Tabla 1).

⁴ Numero de insectos colectados en un área y que presentan en sus heces al parásito *T. cruzi*.

⁵ Presencia de los 6 estadios de desarrollo de los triatomíneos en un domicilio, indicativo del establecimiento del ciclo de vida del insecto en el área de estudio.

Tabla 1. Índices de infección de triatominos colectados en México.

Especies	Porcentaje de infección	# de vectores colectados	Localidad	Hábitat ¹	Fuentes alimenticias ¹	Referencias
<i>D. maximus</i>	7	245	B.C.S.	Doméstico y peridoméstico	Lagarto, roedores, gallinas y palomas	Jiménez <i>et al.</i> , 2003.
<i>T. barberi</i>	70	25	Morelos		Gallinas, perros, conejos	Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Flores, 2001; Cortéz-Jiménez <i>et al.</i> , 1996; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998.
	33.3	57	Jalisco	Doméstico y peridoméstico		
	4.8 a 66.7	18 a 21	Oaxaca			
<i>T. dimidiata</i>	9.52	189	Hidalgo	Doméstico, peridoméstico y silvestre	Roedor y hombre	Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000.
	4.1	195	Oaxaca			
	5.2	58	S.L.P.			
	14	1934	Veracruz			
<i>T. gerstaeckeri</i>	28	192	Nuevo León	Doméstico y peridoméstico	Roedores, pajaros y serpientes	Martínez-Ibarra <i>et al.</i> , 1992.
<i>T. lenticularia</i>	33	9	Nuevo León	Doméstico y peridoméstico	Roedores	Martínez-Ibarra <i>et al.</i> , 1992.
<i>T. longipennis</i>	18.4 a 50	164 a 412	Jalisco	Doméstico y peridoméstico	Murciélagos y mamíferos.	Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Martínez-Ibarra <i>et al.</i> , 2001; Flores, 2001.
	33.5 a 55	24 a 170	Nayarit			
	29.5	47	Zacatecas			
<i>T. mazzottii</i>	50	4	Jalisco	Doméstico y peridoméstico	Roedores, armadillos, hombre, perros y palomas.	Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000.
	7	15	Oaxaca			
<i>T. mexicana</i>	0.29	342	Guanajuato			Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000.
<i>T. pallidipennis</i>	14	228	Jalisco	Doméstico y peridoméstico	Roedores, armadillos, gallinas, hombre, perros y palomas.	Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Bautista <i>et al.</i> , 1999; Flores, 2001; Cortéz-Jiménez <i>et al.</i> , 1996.
	36.4	22	Michoacán			
	25 a 88	41 a 906	Morelos			Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000.
<i>T. phyllosoma</i>	9.1	33	Oaxaca	Doméstico y peridoméstico	Roedores, armadillos, conejos, ovejas, gallinas, hombre, perros, cabras y palomas.	
<i>T. picturata</i>	0 a 7.4	12 a 27	Jalisco	Doméstico y peridoméstico	Palomas y hombre	Martínez-Ibarra <i>et al.</i> , 2001; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Flores, 2001.
	34 a 52	23 a 50.	Nayarit			
<i>T. rubida</i> y <i>T. recurva</i>	90	279	Sonora	Doméstico y peridoméstico	Lagartos, roedores y murciélagos.	Paredes <i>et al.</i> , 2001.
Sin clasificar	10.2	293	Jalisco	Doméstico y peridoméstico		Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998.
Sin clasificar	7.1	2488	Varios estados	Doméstico y peridoméstico		Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000.
Sin clasificar	42	507	Varios estados	Doméstico y peridoméstico		Flores, 2001.

¹Fuente: de la Merced, 1987.

II.10. Taxonomía y problemáticas taxonómicas

Se han descrito 137 especies de triatominos en el mundo distribuidos en 18 géneros formando 6 tribus: 1) Alberproseniini: *Alberprosenia*; 2) Bolboderini: *Bolboderia*, *Belminus*, *Parabelminus*, *Microtriatoma*; 3) Cavernicolini: *Torrealbaia*, *Cavernicola*; 4) Linshcosteini: *Linshcosteus*; 5) Rhodniini: *Rhodnius*, *Psammolestes* y 6) Triatomini: *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Mepraia*, *Eratyrus*, *Panstrongylus*, *Hermanlenticia*, *Paratriatoma* (Carcavallo *et al.*, 2000; Hypsa *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003).

Dado que la mayoría de las especies de la subfamilia Triatominae son morfológicamente muy similares, se presentan con frecuencia problemas de clasificación. Por ejemplo, la clasificación propuesta para el género *Triatoma* incluye grupos, subgrupos y complejos, dificultado en muchas ocasiones la asignación de las especies dentro de algunas de estas categorías. Además, la mayoría de las especies de la subfamilia Triatominae que se colectan se encuentran en estadios ninfales, los cuales no son identificables ya que no existen claves taxonómicas para hacerlo debido a su alta similitud morfológica (Figura 2), por lo que es difícil tratar de establecer cuales son los vectores de importancia epidemiológica en el país (Tabla 1). Por otro lado, se ha reportado la existencia de individuos híbridos producto de cruces en el laboratorio entre algunas especies de triatominos, especialmente dentro de los complejo *Infestans* y *Phyllosoma* (Mazzotti y Osorio, 1942; Ryckman, 1962; Pérez *et al.*, 2005). En este último complejo se han observado individuos híbridos en áreas simpátrica⁶, pero no se ha estudiado su posición taxonómica ni epidemiológica (Brenier *et al.*, 2007; Martínez-Ibarra *et al.*, 2008).

En particular el caso del complejo *Phyllosoma*, es uno de los complejos que presenta más controversias en cuanto a las especies que lo integran, por ejemplo, *T. mexicana* y *T. dimidiata* fueron tentativamente incluidas a este complejo (Lent y Wygodzinsky, 1979). En 1994, Schofield propuso la inclusión de *T. dimidiata* al complejo *Phyllosoma*, denominando a este nuevo grupo como complejo *Dimidiata*, aunque esto no ha sido aceptado todavía. Adicionalmente, se ha reportado la cercanía morfológica de *T. brailovskyi* con las especies *T. dimidiata*, *T. hegneri* (Mazzotti, 1940) y *T. gomeznunezi* (Martínez *et al.*, 1994), incluyéndolas dentro de un nuevo complejo

⁶ Poblaciones de especies que coexisten un mismo espacio geográfico. Tipo de especiación que implica la divergencia de algunas poblaciones hasta conseguir independencia evolutiva dentro de un mismo espacio geográfico

llamado complejo *Dimidiata* (Carcavallo *et al.*, 2000). En el 2001 Guzmán-Bracho incluyó *T. mexicana* en el complejo *Phyllosoma*. En 1999, Alejandre-Aguilar y colaboradores describieron una nueva especie *T. bassolsae*, la cual, por características morfológicas e isoenzimáticas se agrupó dentro del complejo *Phyllosoma* (Alejandre-Aguilar *et al.* 1999; Martínez *et al.*, 2005). Más recientemente, con el uso de sistemas isoenzimáticos y de marcadores nucleares (ITS-2), se corroboró la clasificación morfológica realizada por Lent y Wygodzinsky en el 1979 para las especies del complejo *Phyllosoma* (*T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. mexicana* y *T. bassolsae*), así como la exclusión de *T. dimidiata* de éste complejo (Flores *et al.*, 2001; Marcilla *et al.*, 2001, Martínez *et al.*, 2006).

II.11. Empleo de marcadores moleculares en triatominos

A pesar que existe estudios sobre análisis genéticos de los triatominos desde principios de los 90's (análisis citogenético), esta área se encuentra apenas en sus inicios comparada con los análisis relacionados con otros grupos de vectores. El empleo de estas técnicas ha sido de gran utilidad en diversos análisis, por ejemplo, a nivel de géneros, los estudios con amplificaciones al azar de ADN's polimórficos (RAPD's por sus siglas en inglés) han demostrado gran eficacia, logrando diferenciar a los géneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*, además de poder diferenciar a especies cercanamente relacionadas del género *Rhodnius* (*R. pictipes*, *R. ecuadorensis*, *R. neglectus*, *R. nasutus*, *R. robustus* y *R. prolixus*) (García *et al.*, 1998). Sin embargo, en el caso de algunas especies del complejo *Phyllosoma*, que al igual que las del género *Rhodnius* son muy cercanas morfológicamente y genéticamente, no se encontraron perfiles de bandeado que pudieran diferenciar a la especie *T. longipennis* de *T. picturata*, en tanto que se observaron pocas bandas para diferenciarlas de *T. pallidipennis* (Brenière *et al.*, 2003). Por otro lado, analizando la variación genética de distintas especies representativas de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* empleando polimorfismo en las cadenas sencillas de ADN polimórfico (SSCP sus siglas en inglés), se observó su utilidad para determinar variaciones inter e intraespecíficos. En este análisis, los géneros *Triatoma* y *Panstrongylus* estuvieron cercanamente relacionados, comparadas con el género *Rhodnius* (Stothard *et al.*, 1998).

Con el método de análisis de isoenzimas se determinó la inclusión de *T. bassolsae* dentro del complejo *Phyllosoma* y la exclusión de *T. dimidiata* del mismo

complejo (empleando 10 sistemas isoenzimáticos que correspondieron a 14 loci). También se observó que las especies *T. barberi*, *T. lecticularia*, *T. rubida* y *T. infestans* fueron las especies más polimórficas con valores entre los rangos de 36 a 53%. Con estos marcadores se pudo diferenciar a las especies *T. longipennis*, *T. pallidipennis* y *T. picturata* (complejo *Phyllosoma*), *T. barberi* (complejo *Protracta*), *T. lecticularia* (complejo *Lecticularia*), *T. rubida* (complejo *Rubrofasciata*) y *T. dimidiata* (complejo *Dimidiata*). Sin embargo, no se pudieron identificar loci⁷ especie-específicos que pudieran distinguir a las especies del complejo *Phyllosoma* (Flores *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2005).

Los análisis empleando secuencias totales o parciales de ADN también han sido muy útiles; empleando tanto genes mitocondriales como nucleares: en el caso de secuencias mitocondriales, se ha empleado los genes del RNA ribosomal mitocondrial (*12S* y *16S*), citocromo oxidasa I (*coI*) y el *citocromo b* (*cit b*) principalmente. Diferentes especies de triatomíneos han sido analizados con estos marcadores, por ejemplo, algunas especies del género *Rhodnius* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. pictipes*, entre otros), *Panstrongylus* (*P. megistus*) y diferentes complejos de especies del género *Triatoma* (*T. infestans*, *T. protracta*, *T. dimidiata*, y otros), en el que solo se han trabajado con dos especies del complejo *Phyllosoma*, *T. mazzottii* (*12S* y *16S*) (García *et al.*, 2001) y *T. pallidipennis* (*cit b*) (Lyman *et al.*, 1999). Los genes *12S*, *16S* y el *coI*, fueron utilizados para analizar relaciones filogenéticas entre diferentes especies de complejos de triatomíneos; los dos primeros marcadores presentaron un porcentaje de 32.7 y 32.2 % de sitios variables respectivamente, lo que nos indica que son buenos marcadores para distinguir a nivel de complejos, sin embargo, no se analizaron especies de complejos estrechamente relacionados como los complejos *Phyllosoma* y *Rhodnius* (García *et al.*, 2001). En los análisis de las secuencias del ADN de origen nuclear, también se han empleado diferentes tipos de marcadores. Los más empleados corresponden a marcadores del ADN ribosomal (rADN), como la subunidad *18S*, con la que se pudo identificar una temprana divergencia entre las tribus Triatomini y Rhodnini, mostrando ser un buen marcador a nivel de tribus. Sin embargo, a nivel de géneros y de especies estrechamente relacionadas, fue incapaz de resolver las caracterizaciones genéticas (no pudiendo distinguir entre los géneros *Panstrongylus* y *Dipetalogaster* del género *Triatoma* y las especies del complejo *Phyllosoma*) (Bargues *et al.*, 2002). El

⁷ Un locus (del latín *locus*, lugar; plural *loci*) es una posición fija sobre un cromosoma.

ITS-2, perteneciente al nrADN ha sido de gran utilidad para el estudio de distintas especies del género *Triatoma* y *Rhodnius* resolviendo relaciones supraespecíficas, específicas, subespecíficas y algunas veces a nivel de población entre una misma especie. En el caso particular de las especies pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, el ITS-2 pudo diferenciar a *T. pallidipennis*, *T. mazzottii* y *T. phyllosoma*, sin embargo, se observó una politomía entre *T. longipennis* y *T. picturata* debida a la escasa diferencia genética entre sus secuencias (Marcilla *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2006). En el caso de *T. dimidiata*, se observó una variación entre los individuos de diferente procedencia (Marcilla *et al.*, 2001; Dorn, Monroy y Curtis, 2006; Tamay-Segovia *et al.*, 2008), indicando que este marcador puede diferenciar entre poblaciones de especies de lugares diferentes. Por otro lado, en el género *Panstrongylus*, se analizaron diferentes especies, utilizando este mismo marcador, logrando resolver problemas de ancestría, sugiriendo que este género es polifilético (Marcilla *et al.*, 2002).

II.12. Utilidad del *cit b*.

A pesar que se han analizado diferentes tipos de marcadores moleculares, solo el *cit b* de origen mitocondrial y ITS-2 de origen nuclear, han resuelto problemáticas en diferentes estatus taxonómicos, ayudando a resolver relaciones filogenéticas y taxonómicas en especies de triatomíneos principalmente sudamericanos con escasa aplicación en especies mexicanas.

El ADN mitocondrial presenta ciertas características que lo hacen especialmente útil para estudios de evolución molecular y taxonómicos, debido a que presenta numerosas copias dentro de cada individuo, existiendo hasta 1000 mitocondrias por célula (Ingman & Gyllensten, 2001). Su transmisión es por vía materna por lo que no hay recombinación (Sutovsky *et al.*, 1999), además presenta una rápida tasa de evolución de 5-10 veces más que el ADN nuclear (Brown *et al.* 1982), y numerosos polimorfismos e inclusive la inserción ancestral de fragmentos de mtADN en el genoma nuclear. En el caso de triatomíneos se cuenta con la caracterización del genoma completo para la especie *T. dimidiata*, con 17,019 pares de bases (Dotson y Beard, 2001),

El *cit b* es una proteína mitocondrial, flanqueado entre el gen que codifica la proteína *nd6* y por el gen que codifica para RNA de transferencia; su tamaño es de 1132 pares de bases que codifican una proteína de 377 residuos de aminoácidos, tiene un

anillo nitrogenado llamado porfirina que encierra un átomo metálico de hierro. Esta molécula desempeña una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas (Dotson y Beard, 2001) (Figura 5).



Figura 5. Esquema de la ubicación del *cit b* dentro del ADN mitocondrial. Las letras S, P, T y H corresponden a RNA de transferencia; el signo de interrogación señala la presencia de una secuencia de una proteína hipotética.

Los estudios realizados con este marcador en triatomíneos han generado resultados consistentes con la taxonomía aceptada de la subfamilia Triatominae, analizando y distinguiendo a las especies de la tribu Rhodniini y Triatomini. Se han estudiado además especies del género *Rhodnius* que presentan problemas de identificación, logrando separarlas y confirmando la taxonomía de este grupo (Lyman *et al.*, 1999). En especies mexicanas, se ha empleado este marcador para analizar el complejo *Phyllosoma* y su relación con otros complejos de especies, logrando identificar los integrantes de éste complejos (*T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. mexicana* y *T. bassolsae*) y separarlas claramente de otros complejos de triatomíneos presentes en México (Martínez *et al.*, 2006).

Además el *cit b* presenta bajos niveles de homoplasia⁸, detectando grupos monofiléticos⁹ y polifiléticos¹⁰. Las tasas de mutaciones de estas secuencias son constantes, por lo que se ha podido inferir el reloj molecular entre las especies *R. prolixus*, *R. neglectus* y *R. robustus*, relacionando la divergencia de estas taxas en un tiempo relativamente cercano de menos de 3.5 millones de años (Monteiro *et al.*, 2003).

II.13. Análisis morfológicos cuantitativos

Otras técnicas importantes en el estudio de los triatomíneos son los análisis de los fenotipos antenales, estos han resultado muy útiles, en la identificación de géneros,

⁸ Similitud de las secuencias debidas a convergencia y reversiones genéticas en las diferentes especies.

⁹ Grupo que comparte el mismo taxón ancestral.

¹⁰ Grupo que comprende taxones derivados de dos a más ancestros diferentes.

especies y poblaciones (Esteban *et al.*, 2005; Carbajal de la Fuente y Catalá, 2002). Recientemente, un estudio de diversas poblaciones de *Triatoma infestans*, principal vector sudamericano de *T. cruzi*, permitió correlacionar poblaciones geográficas con caracteres cromosómicos y genómicos de la especie, brindando además, aportes significativos para esclarecer el flujo de individuos entre poblaciones distantes (Catalá *et al.*, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN

Si bien los estudios morfológicos cualitativos han sido importantes para dilucidar ciertas relaciones de parentesco y clasificaciones taxonómicas entre algunos grupos de especies, estos métodos han mostrado limitaciones para la clasificación de la subfamilia Triatominae, especialmente con especies estrechamente relacionadas, en individuos con morfotipos mezclados y en estadios ninfales.

Entas limitaciones evidencian la necesidad de utilizar marcadores morfológicos y moleculares adecuados que pudiesen aclarar y eliminar la problemática actual de clasificación para cada uno de los complejos de especies de triatominos mexicanos, estableciendo identidades o distancias genéticas que aclaren la taxonomía del grupo y que corroboren o modifiquen las claves morfológicas. Además, como ya se mencionó, México es uno de los países con mayor diversidad biológica reportándose 33 especies, de las cuales solo se han analizado aproximadamente el 30% de éstas con marcadores moleculares, por lo que también es necesario establecer las relaciones filogenéticas y el estatus taxonómico de estos grupos encaminada al control del insecto, así como la reducción ó eliminación de infección con *T. cruzi* y por ende de la enfermedad de Chagas.

IV. HIPÓTESIS

La variabilidad genética reportada en las secuencias del *citocromo b*, así como estudios morfológicos cuantitativos, han sido importantes para resolver los problemas de clasificación taxonómicos en especies de triatomíneos sudamericanos, por lo que se piensa que estos estudios pudieran ser una herramienta que ayude a resolver problemáticas similares de clasificación como las que presenta el complejo *Phyllosoma*.

V. OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar variabilidad genética del gen del *citocromo b*, para realizar un análisis morfológico cuantitativo en las especies del género *Triatoma* y determinar la posible utilidad de estos análisis para estudios taxonómicos y filogenéticos.

Objetivos Específicos:

- Evaluar la utilidad del *citocromo b* como herramienta para estudios taxonómicos y filogenéticos, tanto en especies tipo como en especies simpátricas.

- Realizar análisis morfológicos cuantitativos en especies del complejo *Phyllosoma*.

- Estudiar la presencia de pseudogenes y heteroplasmia del gen del *citocromo b* en las especies de triatominos analizados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Estudios genéticos.

VI.1.a. Triatominos.

Para estos análisis se utilizó individuos adultos hembras y machos de 18 especies de triatominos. Estos insectos fueron separados en dos grupos: 1) considerados como especies tipo¹ y 2) especies que se encuentran en áreas simpátricas.

Especies tipo.- Estas especies fueron clasificadas como tipo debido a estudios detallados de identificación morfológica, con la ayuda de las claves de Lent y Wygodzinsky (1979), además su estatus taxonómico fue corroborado por el entomólogo especialista del grupo en México, el Dr. Ricardo Alejandr  de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Adicionalmente, se verificó esta clasificación utilizando análisis isoenzimáticos para determinar la identidad genética para la mayoría de estas especies (Tabla 2) (Martínez *et al.*, 2005). Para determinar los niveles de variación intraespecífica de esta población se secuenciaron de 3 a 5 especímenes por especie.

Tabla 2. Triatominos utilizados en el estudio.

Especie	Complejo	Localidad de colecta
<i>T. bassolsae</i>	<i>Phyllosoma</i>	Puebla
<i>T. bolivari</i>	<i>Dimidiata</i>	Jalisco
<i>T. brailovskyi</i>	<i>Dimidiata</i>	Jalisco
<i>T. dimidiata</i>	<i>Dimidiata</i>	Campeche
<i>T. infestans</i>	<i>Infestans</i>	Brasil
<i>T. gerstaeckeri</i>	<i>Phyllosoma</i>	Chihuahua
<i>T. mazzottii</i>	<i>Phyllosoma</i>	Guerrero
<i>T. mexicana</i>	<i>Phyllosoma</i>	Hidalgo, Guanajuato
<i>T. lecticularia</i>	<i>Phyllosoma</i>	Nuevo Le�n
<i>T. longipennis</i>	<i>Phyllosoma</i>	Nayarit
<i>T. pallidipennis</i>	<i>Phyllosoma</i>	Morelos
<i>T. phyllosoma</i>	<i>Phyllosoma</i>	Oaxaca
<i>T. picturata</i>	<i>Phyllosoma</i>	Nayarit
<i>T. protracta</i>	<i>Protracta</i>	Sonora
<i>T. rubida</i>	<i>Rubrofasciata</i>	Sonora
<i>T. recurva</i>	<i>Rubrofasciata</i>	Sonora
<i>R. prolixus</i>	<i>Prolixus</i>	Chiapas

¹ Especies identificadas utilizando al menos 3 marcadores moleculares y análisis morfologicos detallado.

Especies en áreas simpátricas

Se colectaron triatominos en tres comunidades del estado de Jalisco: Talpa de Allende, (20°22' N, 104°54' O) con una altitud de 1,134 msnm; Autlán de Navarro (19° 46'N, 104° 22' O) con una altitud de 900 msnm y finalmente Teocuitatlán de Corona (20° 01' N, 103° 11' O) con una altitud de 1,375 msnm, con un promedio anual de temperatura en los rangos de 21.3°C a 23.5°C y con una precipitación anual de 719.8 a 1,029.7 mm. Los individuos colectados se clasificaron taxonómicamente empleando caracteres morfológicos establecidos por Lent y Wygodzinsky (1979) para su identificación: *T. picturata* caracterizada por corio generalmente negro-café con manchas amarillo-naranja basales y subapicales de forma subtriangular, pronoto² extensamente amarillo-naranja y conexivo³ amarillo con manchas subrectangular negras (Figura 6A); *T. pallidipennis* presentó el corio⁴ extensivamente blanco-amarillento, y conexivo negro con manchas naranjas (Figura 6B); *T. longipennis* con el corio extensamente negro, con manchas basales y subapicales amarillas o rojo-naranjas, pronoto con lobulos posterior⁵ enteramente negros (Figura 6.C). Otros especímenes identificados presentaron características morfológicas con fenotipos intermedios entre *T. picturata* y *T. pallidipennis*: estos individuos presentan el corio extensamente blanco amarillento como *T. pallidipennis* y pronoto extensamente amarillo-naranja como *T. picturata*; estos especímenes se designaron *Triatoma sp* (Figura 6D). El lugar de procedencia de estas especies de triatominos se encuentra descrito en la Tabla 3.

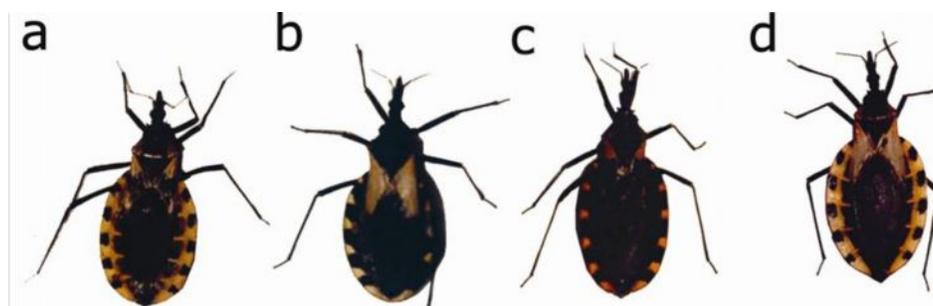


Figura 6. Características morfológicas de los triatominos colectados en áreas simpátricas: A) *Triatoma picturata*; B) *Triatoma pallidipennis*; C) *Triatoma longipennis* y D) *Triatoma sp.*

² Parte dorsal del segmento torácico anterior.

³ Pate lateral del abdomen de los insectos, caracterizado en los triatominos por presentar manchas de color amarillas, naranjas o rojas.

⁴ Primer segmento esclerosado del hemelitra (alas) de los insectos.

⁵ Extremos sobresalientes laterales del pronoto.

Tabla 3. Procedencia de las poblaciones de triatominos tipo e híbridos.

Especies colectadas ^a	Localidad de origen
<i>Triatoma pallidipennis</i> ^a	Morelos, México.
<i>T. picturata</i> ^a	Nayarit, México.
<i>T. longipennis</i> ^a	Teocuitatlán de Corona, Jalisco, México.
<i>T. picturata</i> , <i>T. pallidipennis</i> y <i>Triatoma sp</i> ^b	Talpa de Allende, Jalisco, México.
<i>T. longipennis</i> y <i>T. pallidipennis</i> ^b	Autlán de Navarro, Jalisco, México.

^aEspecies consideradas tipo debido a sus características morfológicas (Lent y Wygodzinsky, 1979) y a la ausencia de simpatria con otras especies.

^bEspecies colectadas en áreas simpátricas.

VI.1.b. Secuenciación

Se secuenció un fragmento del gen del *cit b* así como el ITS-2 para corroborar nuestros resultados. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

Extracción de ADN

Se emplearon dos patas del insecto, las cuales se congelaron en un tubo de 1.5 mL usando nitrógeno líquido, e inmediatamente se maceraron con ayuda de un micropistilo hasta pulverizarlas. Éstas se resuspendieron en 1 mL de solución de extracción (50 mM de Tris-Cl (pH 8.0), 50 mM de EDTA (pH 8.0), 50 mM de NaCl, 20 µg/mL de RNAsa y 1% de SDS), se dejaron incubando a 55°C por una hora. Al término, se agregó 150 µL de proteinasa K (30 mg/mL) (Martínez *et al.*, 2006), se agitaron cuidadosamente y se incubaron a 37°C toda la noche. La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de fenol-cloroformo descrita por Sambrook *et al.*, (1989), al finalizar la extracción, el ADN se resuspendió en 50 µL de agua previamente esterilizada, filtrada e irradiada. La concentración de ADN se cuantificó mediante el espectrofotómetro de capilares (Gene Quant pro, Amersham Pharmacia Biotech), considerando una unidad de absorbancia a 260 nm correspondiente a 50 µg/mL de ADN.

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un volumen de reacción de 25 µL, el cual contenía 200 ng de ADN, 2.5 µL de solución para PCR 1X (Invitrogen), 0.25 µL de dNTPs a una concentración de 50 mM, 1 µL de 0.10 µM de oligonucleótidos, 1 µL *Taq* polimerasa (*Taq* platinum ADN polimerasa, Invitrogen), 2.5 µL a 50 mM de MgCl₂ y 18.5 µL de agua desionizada estéril. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la

amplificación del ITS-2 fueron sintetizados tomados de Marcilla *et al.* (2001), en el caso del *cit b* fueron diseñados por nosotros (Anexo 1) (Martínez *et al.*, 2006). Las secuencias de los oligonucleótidos para el ITS-2 fueron: directo 5'-CTAAGCGGTGGATCACTCGG-3' y reversa 5'-GCACTATCAAGCAACACGACTC-3' y para el *cit b*: directo 5'CGAATTA GTTAAATGATTRTGRGG-3' y reversa 5'-TATGCRAATAGGAARTATCATTC-3'.

La PCR consistió en un paso inicial a 95°C por 10 minutos, un segundo paso de desnaturalización a 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de amplificación, las cuales incluyen un minuto a 94°C (desnaturalización de las hebras de ADN), un minuto a 55°C (alineamiento de los oligonucleótidos) y un minuto a 72°C (elongación); y un paso final de elongación por 7 minutos a 72°C (modificado de Lyman *et al.*, 1999). Los fragmentos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1.5% en solución de electroforesis TAE 1X, corridos a 120 volts por 90 minutos aproximadamente en una cámara de electroforesis horizontal; el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador.

Clonación

El producto de PCR se inserto en el vector de clonación pCR[®] 2.1 y se transformaron células de *Escherichia coli* genotipo TOP10 químicamente competentes, utilizando el kit de clonación TA Cloning kit (Invitrogen, No. Cat. K2040), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Extracción del plásmido de interés

Después de la clonación, se verificó la presencia del inserto deseado (*cit b* y el ITS-2), para ello se extrajo el ADN de plásmido, mediante la técnica de lisis alcalina, brevemente, se centrifugó el cultivo bacteriano en un tubo de 1.5 mL a 25 000 g por un minuto, obteniendo la pastilla de células bacterianas. A esta pastilla, se le agregó 150 µL de solución I (500 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0), se agitó fuertemente; se agregaron 200 µL de solución II recién preparada (0.2 N NaOH, 1 % SDS), se mezcló por inversión de 4 a 6 veces; se agregaron 100 µL de solución III (5 M de acetato de potasio, 11.5 mL de ácido acético glacial 99.7% de pureza, agua desionizada estéril) y se mezcló por inversión de 4-6 veces. Se centrifugó a 25 000 g por 10 minutos (4°C). Se extrajo todo el sobrenadante, se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25/24/1 y se centrifugó a 25 000

g por 5 minutos; se recuperó la fase superior (o fase acuosa) y se transfirió a otro tubo de 1.5 mL, se le agregaron 500 μ L de cloroformo y se centrifugó a 25 000 g por 5 minutos. Se recuperó la fase superior y se pasó a otro tubo de 1.5 mL, al cual se le agregó 1 mL de etanol frío y se dejó a -70°C por una hora. Se centrifugó a 25 000 g por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se recuperó la pastilla, la cual se lavó con etanol al 75%. Finalmente, se resuspendió la pastilla de ADN en 30 μ L de solución TE con RNAsa (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Digestión del ADN del plásmido

El ADN del plásmido se digirió con la enzima EcoRI. La digestión se realizó en un volumen de 20 μ L, el cual contenía 2 μ L de ADN del plásmido (no cuantificado), 2 μ L de solución de ligación 10X, 0.5 μ L de EcoRI (2.5 U) y 15 μ L de agua estéril. Los controles de la digestión sólo contenían 2 μ L del ADN del plásmido y 18 μ L de agua estéril. Estas reacciones se dejaron incubando 3 horas a 37°C . Para verificar cuales clonas poseen el inserto esperado, se corrió un gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TAE 1X a 120V por 90 minutos; el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en el transiluminador. Las clonas que tuvieron el inserto deseado se volvieron a sembrar en medio LB líquido con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C toda la noche, para de nuevo ser extraído el plásmido, con el QIAprep® Miniprep Kit (QIAGEN, No. Catálogo 27104), esto con el fin de tener ADN del plásmido con una mejor pureza y concentración, necesario para su secuenciación. El ADN se cuantificó en el espectrofotómetro de capilares (Gene Quant pro, Amersham Pharmacia Biotech).

Secuenciación

Las clonas que contenían los insertos de interés fueron secuenciados en el secuenciador automático Abi Prism 310 (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos utilizados fueron el M13 Reverse y el T7 promotor, los cuales se encuentran dentro del vector de clonación.

VI.1.c. Análisis genético de las secuencias

Las secuencias obtenidas se procesaron usando el programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) para verificar que no existieran errores en el proceso de la secuenciación y para obtener las secuencias consenso. Las secuencias fueron alineadas usando el programa Clustal W (www.ebi.ac.uk). Los parámetros utilizados para este alineamiento fueron los predeterminados por el programa, además se revisó manualmente el alineamiento. Para determinar las regiones del *cit b* y del ITS-2, se alinearon las secuencias obtenidas en este trabajo con aquellas secuencias del *cit b* y del ITS-2 para especies de triatomíneos reportados en el GenBank, de esta manera por homología, se establecieron las secuencias. Finalmente, se determinaron los sitios variables de cada secuencia comparada con la del GenBank. Las siguientes secuencias del *cit b* fueron obtenidas del GenBank: *Dipetalogaster maximus* [AF045728](#); *Triatoma brasiliensis* [AY336527](#); *T. dimidiata* [AF301594](#), [AY062152](#); *T. infestans* [AF045721](#); *T. nitida* [AF045723](#); *T. pallidipennis* [AF045724](#); *T. protracta* [AF045727](#); *T. sanguisuga* [AF045725](#); *T. sordida* [AF045730](#); *Panstrongylus megistus* [AF045722](#); *Psammolestes coreodes* [AF045719](#); *Rhodnius brethesi* [AF045714](#); *R. ecuadoriensis* [AF045715](#); *R. neglectus* [AF045716](#); *R. pallescens* [AF045720](#); *R. pictipes* [AF045713](#); *R. prolixus* [AF421339](#), *R. robustus* [AF045717](#), *Philaenus spumarius* [AY630340](#) y *Arilus cristatus* [AF045729](#). En el caso del ITS-2 se utilizaron las siguientes secuencias: *T. barberi* [AJ293590](#); *T. dimidiata* [AJ286877](#), [AJ286879](#) y *T. phyllosoma* [AJ286881](#).

Se utilizó el programa Modeltest (<http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>, Posada & Crandall, 1998) para determinar el mejor modelo de evolución que se ajusta a los datos analizados. Los modelos de sustitución de nucleótidos escogidos fueron: Tiempo General Reversible con distribución gamma y sitios invariables (GTR+G+I) para las secuencias del *cit b* y Tiempo General Reversible con distribución gamma (GTR+G) para las secuencias del ITS-2 y para alineamiento de ambos marcadores (*cit b*+ ITS-2). Con estos modelos de evolución se corrieron árboles filogenéticos en el programa Mr. Bayes versión 3.1.2 (<http://mrbayes.csit.fsu.edu/>, Holder & Lewis, 2003; Huelsenbeck *et al.*, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Para la reconstrucción filogenética, se realizó el análisis para diez millones de generaciones, recolectando los árboles mejores soportados (valores de verosimilitud bajos) cada 100 generaciones, los árboles con soportes estadísticos bajos fueron descartados y con los demás se realizó un árbol de consenso de

mayoría. Para la visualización gráfica de los árboles obtenidos se utilizó el programa TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, Page, 1996). La especie *R. prolixus* fue empleada como grupo externo, por tratarse de un género cercano evolutivamente al grupo de estudio (Genero *Triatoma*). Para determinar las diferencias genéticas entre especies se construyó una matriz de distancias de Kimura dos parámetros con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, <http://www.megasoftware.net/>) versión 3.0 (Kumar *et al.*, 2004).

VI.1.d. Southern blot

Para esta técnica se utilizó el ADN total extraído del músculo torácico y las patas de los triatominos, éste se digirió con las enzimas XbaI, Hind III y ClaI a 37°C toda la noche. El ADN digerido se corrió en un gel de agarosa al 0.8% con amortiguador TAE 1X por 4 horas a 75V, después se tiñó el gel con bromuro de etidio para documentarlo. Posteriormente el ADN en la matriz de agarosa se desnaturalizó con el amortiguador del mismo nombre (1.5 M NaOH y 0.5 M NaOH) por 45 min, después se lavó el gel dos veces con agua bidestilada, se depurinó (cortes entre purinas para mejorar la transferencia del ADN) por 15 min en 0.25 M de HCl y se neutralizó por 30 min con buffer de neutralización (1.5 M NaOH; 0.5 M Tris-HCl, pH 7.5), pasado este tiempo se transfirió el ADN a membranas de nitrocelulosa. Por último, la membrana con el ADN transferido se lavó con agua destilada, se dejó secar por 5 minutos a temperatura ambiente y se fijó con luz UV por 1 minuto a 1200 joules.

La membrana de nitrocelulosa se dejó prehibridando por 2 horas a 42°C con 40mL de amortiguador de hibridación, posteriormente se le adicionó como sonda el amplificado por PCR del *cit b* (extraído del gel de agarosa con el kit QIAEX II, QIAGEN, número de catálogo 20021) marcado radiactivamente con P³² Random Primer ADN labeling System (como lo indica el proveedor Invitrogen, número de catalogo 18187-013), se dejó incubando toda la noche a 42°C, pasado éste tiempo se transfirió la sonda radiactiva a un tubo falcon para posteriores hibridaciones y la membrana se lavó 3 veces con amortiguador de lavado (0.2 X de SSC y 0.2 % de SDS), cada lavado por 1 hora a 42°C. La membrana se dejó 24 horas en cassette Kodak (Exposure Cassette-K, BioRad, numero de catalogo 170-7861) para radiactividad, por último se registraron los resultados con el analizador de imágenes Fx (FX Molecular Imager System, BioRad) (Sambrook *et al.*, 1989).

VI.1.e. Análisis del Polimorfismo Conformacional de las Cadenas Sencillas de ADN (SSCP)

Para esta técnica se empleó los amplificadores del PCR del *cit b* de los diferentes individuos analizados. Los amplificadores fueron corridos en geles de agarosa al 1% y se extrajeron de la agarosa mediante el kit QIAEX II gel (QIAGEN, número de catálogo 20021). Del ADN extraído se utilizaron 10 µL y se les adicionó 10 µL de amortiguador de carga (800 µL formamida o sacarosa al 10%, 100 µL azul de bromofenol al 1%, 100 µL de xileno cianol al 1%, 2 µL de EDTA 0.5 M, 1 µL de NaOH 10 M). Posteriormente el ADN se desnaturalizó a 95°C por 10 minutos e inmediatamente después se depositó en hielo por 5 min. La mezcla se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (acrilamida y bisacrilamida en una proporción 49:1) con buffer TBE (1.34 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.749 mM ácido bórico, 25.5 mM EDTA) a 40V por 18 horas a 4°C. Finalmente, el gel se tiñó con nitrato de plata y se analizó con un fotodocumentador FX (FX Molecular Imager System, BioRad) (Stothard *et al.*, 1998).

VI.2. Estudio morfométrico

VI.2.a. Análisis de los fenotipos antenales

Se emplearon las antenas de adultos hembras de especies tipo y de especies que habitaban áreas simpátricas (ver sección VI.1.a.). Las antenas fueron cortadas de la cabeza de cada uno de los especímenes al nivel del escapo⁶ (Figura 7A), aclaradas con 4% KOH por 5 horas a 55°C y neutralizadas con 5% de ácido acético por 30 minutos a temperatura ambiente. Sólo se analizó una antena de cada espécimen. Las preparaciones individuales se montaron en portaobjetos con PBS 1X para su observación en microscopio a 400X. Utilizando cámara clara se contaron las sensilla de la cara ventral en cada segmento antenal. Posteriormente, cada tipo de sensillum se contó por separado. Los receptores fueron clasificados de acuerdo a Catalá y Schofield (1994) y contados a lo largo del pedicelo (P) y segmentos flagelares (F1 y F2) (Figura 7A). Cuatro tipos de receptores fueron usados para este análisis: Bristles (br), Basicónicos (ba), Tricoides de Pared Fina (th) y Tricoides de Pared Gruesa (tk) (Figura 7B).

⁶ Primer segmento de la antena.

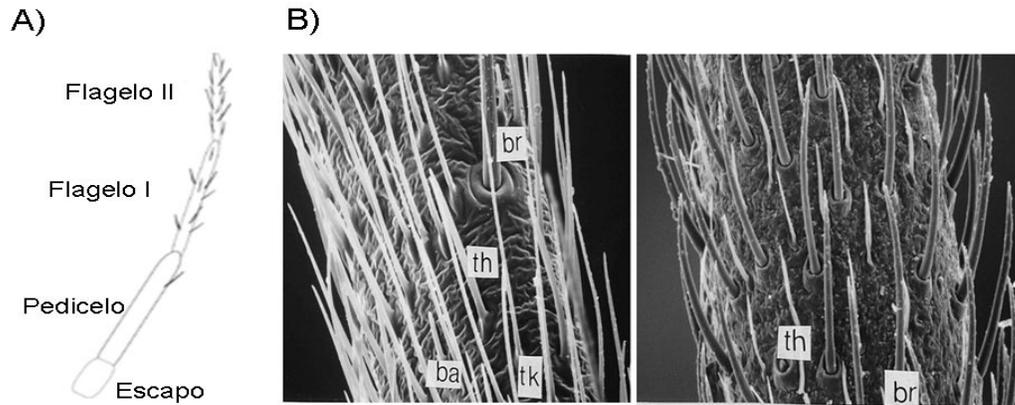


Figura 7. Receptores antenales presentes en triatomíneos. A) Segmentos de las antenas, B) Tipos de receptores en las antenas, br= Bristles, th= Tricoides de pared fina, tk= Tricoides de pared gruesa y ba= Basicónicos.

Análisis de los datos morfológicos cuantitativos

Un total de 54 individuos fueron analizados. Los individuos estudiados fueron analizados considerando tres diferentes situaciones: 1.- como especie, 2.- por localidad de captura y 3.- por población (especie/localidad). Para cada población se obtuvo la media (\pm Ds) y desviación estándar de la densidad de cada receptor por cada uno de los segmentos antenales. La prueba de Levene fue usada para determinar homoscedasticidad. Las variables con varianzas homogéneas fueron analizadas con ANOVA (prueba de análisis de varianzas) con significancia de diferentes estimados por mínima diferencia significativa (LSD) usando el programa STATISTICA v8 (<http://www.statsoft.com/>). Las variables que mostraron heteroscedasticidad (varianzas heterogéneas) fueron analizadas usando la prueba U de Mann-Whitney para datos no-paramétricos (Statistica, StatSoft, Inc. 2000). Para los análisis multivariados se utilizó el programa PADWIN v65 (www.mpl.ird.fr/morphometrics) que permite realizar un análisis discriminante de datos métricos⁷, comparando las distancias de Mahalanobis (distancias entre los centros de los grupos poblacionales) mediante 3 tipos de prueba no-paramétricas.

⁷ Referente a variables numéricas discontinuas.

VII. RESULTADOS

VII.1. Análisis de las secuencias en especies tipo

Análisis de las secuencias

Para establecer las relaciones filogenéticas entre especies del complejo *Phyllosoma* y especies de otros complejos de importancia epidemiológica en México, se analizaron 18 especies de triatomíneos, empleando las secuencias de los marcadores moleculares del *cit b* y del ITS-2. Las siguientes especies no habían sido analizadas para el *cit b*: *T. barberi*, *T. bassolsae*, *T. bolivari*, *T. brailovskyi*, *T. longipennis*, *T. lecticularia*, *T. gerstaeckeri*, *T. mazzottii*, *T. mexicana*, *T. picturata*, *T. phyllosoma* y *T. rubida*, en tanto que, *T. bassolsae*, *T. bolivari*, *T. brailovskyi*, *T. recurva*, *T. lecticularia*, *T. gerstaeckeri* y *T. mexicana* no habían sido estudiados con el ITS-2.

Se analizaron de 3 a 5 individuos de las 18 especies estudiadas, obteniendo una secuencia de 313 pb para el gen del *cit b* mientras que para el ITS-2 fue de 478 pb. Algunas de las secuencias del *cit b* mostraron valores de identidad genética inferiores a los esperados para individuos de la misma especie, estas secuencias se describen más adelante (secciones VII.3). Sólo las secuencias que presentaban variación de identidad genética esperada ($\geq 98\%$) fueron analizadas en este apartado. Los análisis de variación genética revelan que el *cit b* presenta un 44% de sitios variables y 30.7% de sitios filogenéticamente informativos⁸, mientras que el ITS-2 presentó el 35.7% y 17.4% respectivamente. Además, estas secuencias mostraron un gran contenido de A+T, siendo para el *cit b* de 64% y de 77% para el ITS-2.

Análisis de las distancias genéticas

Las distancias genéticas fueron calculadas con el método de Kimura de dos parámetros⁹. Las especies del complejo *Phyllosoma* mostraron distancias menores o iguales entre ellas, de 0.17 en el caso del *cit b* y de 0.05 en el caso del ITS-2. Para las especies incluidas tentativamente en este complejo de acuerdo a los caracteres morfológicos, se observó que *T. bassolsae*, presentaba una distancia de 0.15 con el *cit b* y de 0.01 con el

⁸ Sitios en las secuencias de ADN que son útiles para realizar los árboles filogenéticos, debido a su moderada variación genética.

⁹ Modelo de evolución que considera tasa de mutaciones diferentes para transiciones (α) y tranversiones (β).

ITS-2; *T. mexicana*, de 0.19 con el *cit b* y de 0.05 con el ITS-2 y *T. gerstaeckeri* de 0.18 con el *cit b* y de 0.04 con el ITS-2. En el caso de las especies controversialmente incluidas en este complejo *T. dimidiata*, *T. bolivari*, *T. brailovskyi* y *T. recurva*, mostraron distancias, mayores a 0.020 con *cit b* y 0.005 con ITS-2 con respecto a las especies del complejo *Phyllosoma*. Como era de esperarse, las especies de otros complejos de importancia en México mostraron grandes distancias con respecto al complejo *Phyllosoma* (Tabla 4).

Análisis filogenético

Para los análisis filogenéticos se empleó el método probabilístico Bayesiano¹⁰. El árbol generado con las secuencias del *cit b*, mostró un clado¹¹ en el que se agrupan a las especies incluidas en el complejo *Phyllosoma* (*T. pallidipennis*, *T. phyllosoma*, *T. mexicana*, *T. bassolsae*, *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. picturata*), con las especies *T. gerstaeckeri*, *T. recurva*, *T. dimidiata* y *T. brailovskyi*; éste clado presentó un soporte estadístico de 95% de probabilidad posterior. Las especies *T. bolivari*, *T. lecticularia*, *T. rubida* y *T. protracta* se agruparon en clados alejados al complejo *Phyllosoma*. En el caso del árbol generado con las secuencias del ITS-2, se encontró un clado en el que se agruparon todas las especies incluidas dentro del complejo *Phyllosoma*, y muy cercanos a este clado a las especies *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. recurva* y *T. brailovskyi*. Al igual que el árbol obtenido con las secuencias del *cit b* las especies *T. bolivari*, *T. lecticularia*, *T. rubida* y *T. protracta*, se agruparon en clados alejados del complejo *Phyllosoma*. En el caso del árbol filogenético elaborado con las secuencias del *cit b* se pudo identificar a cada una de las especies analizadas observando clados específicos, a diferencia del árbol generado con las secuencias del ITS-2 en donde se observa las siguientes politomias¹²: *T. bassolsae* con *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma* con *T. mazzottii* y *T. longipennis* con *T. picturata* (Figura 8). Se observó una estrecha relación filogenética entre *T. recurva*, *T. dimidiata*, *T. brailovskyi*, *T. bassolsae* y *T. gerstaeckeri* con las especies del complejo *Phyllosoma*. Topologías similares fueron observadas con los dos marcadores (Figura 8).

¹⁰ Método matemático basado en el teorema de Bayes y utilizado para calcular la verosimilitud de una hipótesis teniendo en cuenta información condicional. Calcula la probabilidad posterior partiendo de su probabilidad previa y multiplicándola por la probabilidad condicional, para dar una probabilidad conjunta.

¹¹ Ramas del árbol filogenético propuesto para agrupar a un conjunto de especies con un antepasado común.

¹² Colapso de las ramas de un árbol filogenético debido a el gran parentesco entre las especies analizadas.

Un tercer árbol fue generado sólo con las secuencias del *cit b* dado que mostraron una mejor resolución en el árbol con las especies analizadas. En este árbol además se utilizó las secuencias generadas del *cit b* que se encuentran en el Genbank. En este análisis se observó dentro del género *Triatoma* un grupo que estaba conformado por aquellas especies de triatomíneos que corresponden a triatomíneos de Norte y Centro América incluyendo los complejos: *Protracta*, *Lecticularia*, *Phyllosoma*, *Rubrofasciata*, y el género *Dipetalogaster maximus*. Se observó un segundo grupo en el árbol, este incluyó triatomíneos que se distribuyen en el sur de América (complejo *Infestans*: *T. infestans* y *T. brasiliensis*) (Figura 9). De nueva cuenta se observó en este árbol una estrecha relación filogenética entre *T. recurva*, *T. dimidiata*, *T. brailovskyi* y *T. gerstaeckeri* con las especies del complejo *Phyllosoma*. Además *T. lecticularia*, y *T. nitida* fueron localizadas en clados independientes y no agrupadas con las especies de sus mismos complejos, es decir, *T. lecticularia* con *T. sangisuga* y *T. nitida* con las especies *T. barberi* y *T. protracta*. *T. bolivari* se observó muy cercana a las especies del complejo *Rubrofasciata* (*T. rubida*).

Como la información con respecto al complejo *Phyllosoma* y especies cercanas no concordaba para los diferentes marcadores moleculares (*cit b* e ITS-2), se decidió realizar un cuarto árbol filogenético, el cual fue generado alineando ambos marcadores para cada una de las especies (*cit b*+ITS-2) resultando un total de 883 caracteres, de los cuales, aproximadamente el 50% representan sitios filogenéticamente informativos. Este árbol apoyó con un 90% de probabilidad posterior la inclusión de *T. bassolsae* al complejo *Phyllosoma*, sin embargo, especies tentativamente incluidas a éste complejo como las especies *T. recurva*, *T. dimidiata*, *T. brailovskyi*, *T. gerstaeckeri* y *T. mexicana* se agruparon en clados diferentes con bajos porcentajes de soporte estadístico (Figura 10).

Tabla 4. Distancias genéticas para las especies de triatomos analizados.

	T. bolivari	T. brailovskyi	T. mexicana	T. gerstaeckeri	T. recurva	T. bassolsae	T. longipennis	T. pallidipennis	T. picturata	T. phyllosoma	T. mazzottii	T. dimidiata	T. protracta	T. lecticularia	T. rubida
T. bolivari		0.13	0.15	0.14	0.13	0.13	0.14	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.15	0.09
T. brailovskyi	0.26		0.07	0.06	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.09	0.07	0.16
T. mexicana	0.26	0.16		0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.07	0.11	0.1	0.19
T. gerstaeckeri	0.25	0.2	0.12		0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.11	0.09	0.17
T. recurva	0.25	0.17	0.15	0.17		0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.04	0.1	0.08	0.16
T. bassolsae	0.24	0.19	0.17	0.16	0.14		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.04	0.1	0.09	0.15
T. longipennis	0.22	0.12	0.13	0.17	0.13	0.14		0.01	0	0	0.02	0.04	0.1	0.08	0.15
T. pallidipennis	0.23	0.18	0.16	0.14	0.13	0.04	0.17		0	0.01	0.01	0.04	0.1	0.08	0.15
T. picturata	0.2	0.17	0.13	0.18	0.16	0.15	0.13	0.16		0.02	0.02	0.04	0.1	0.08	0.15
T. phyllosoma	0.24	0.19	0.14	0.16	0.17	0.12	0.15	0.13	0.15		0.02	0.04	0.1	0.09	0.16
T. mazzottii	0.22	0.17	0.11	0.12	0.14	0.15	0.15	0.13	0.13	0.12		0.05	0.11	0.1	0.17
T. dimidiata	0.24	0.19	0.15	0.15	0.15	0.12	0.17	0.13	0.13	0.14	0.16		0.1	0.08	0.15
T. protracta	0.24	0.23	0.22	0.23	0.19	0.21	0.22	0.19	0.21	0.2	0.22	0.21		0.07	0.17
T. lecticularia	0.26	0.22	0.24	0.28	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.22	0.25	0.24	0.22		0.18
T. rubida	0.18	0.27	0.23	0.26	0.22	0.19	0.19	0.2	0.18	0.22	0.23	0.19	0.18	0.22	

Distancias genéticas empleando el modelo de Kimura de 2 parámetros. Arriba de la diagonal distancias calculadas con las secuencias del ITS-2 y debajo de la diagonal distancias calculadas con las secuencias del *cit b*.

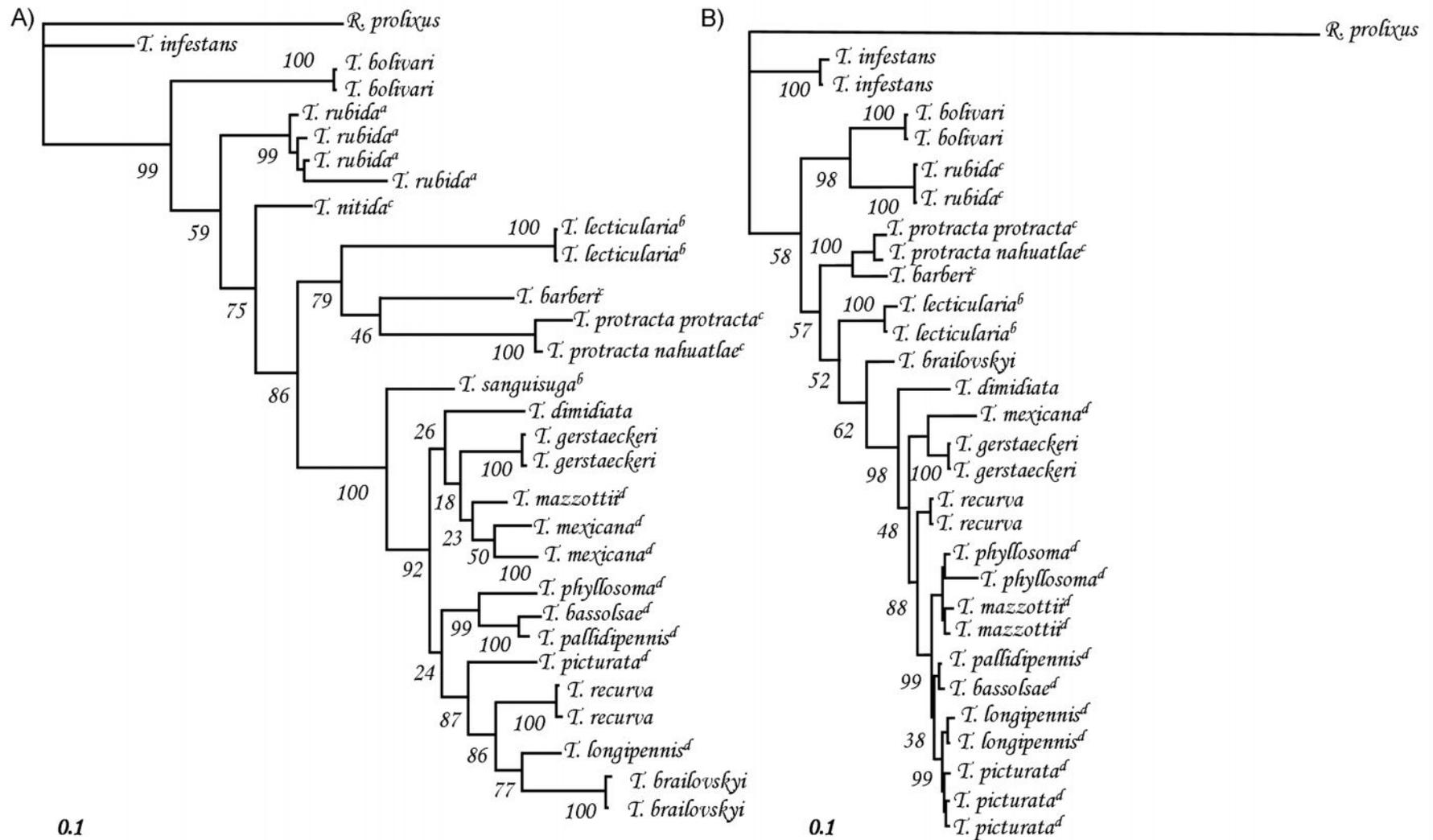
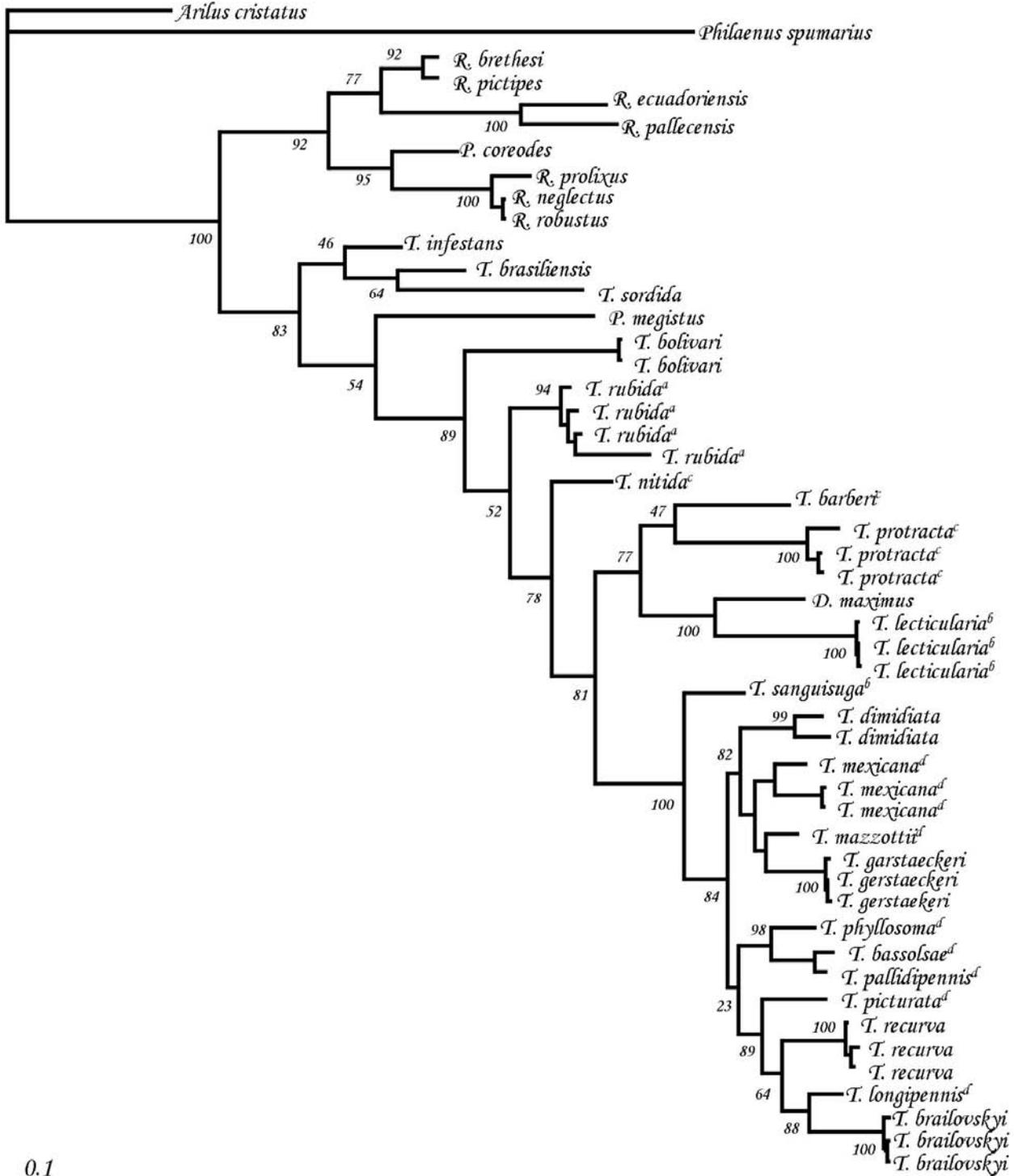


Figura 8. Árboles filogenéticos empleando las secuencias del *cit b* (A) y del ITS.2 (B). Análisis filogenético de insectos triatominos empleando el método Bayesiano. ^acomplejo *Rubrofasciata*; ^b*Lecticularia*; ^c*Protracta*; ^d*Phyllosoma*. Los valores de los nodos indican la probabilidad posterior a partir empleando 10,000,000 de generaciones con un modelo de sustitución GTR+G+I para el *cit b* y GTR+G para el ITS-2.



0.1

Figura 9. Árbol filogenético bayesiano general empleando las secuencias del *cit b*. El árbol se generó usando las secuencias del *cit b* obtenidas en este trabajo y las reportadas en el GenBank. ^aComplejo *Rubrofasciata*; ^b*Lecticularia*; ^c*Protracta*; ^d*Phyllosoma*. Los valores de los nodos indican la probabilidad posterior, empleando 10,000,000 de generaciones empleando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+G+I.

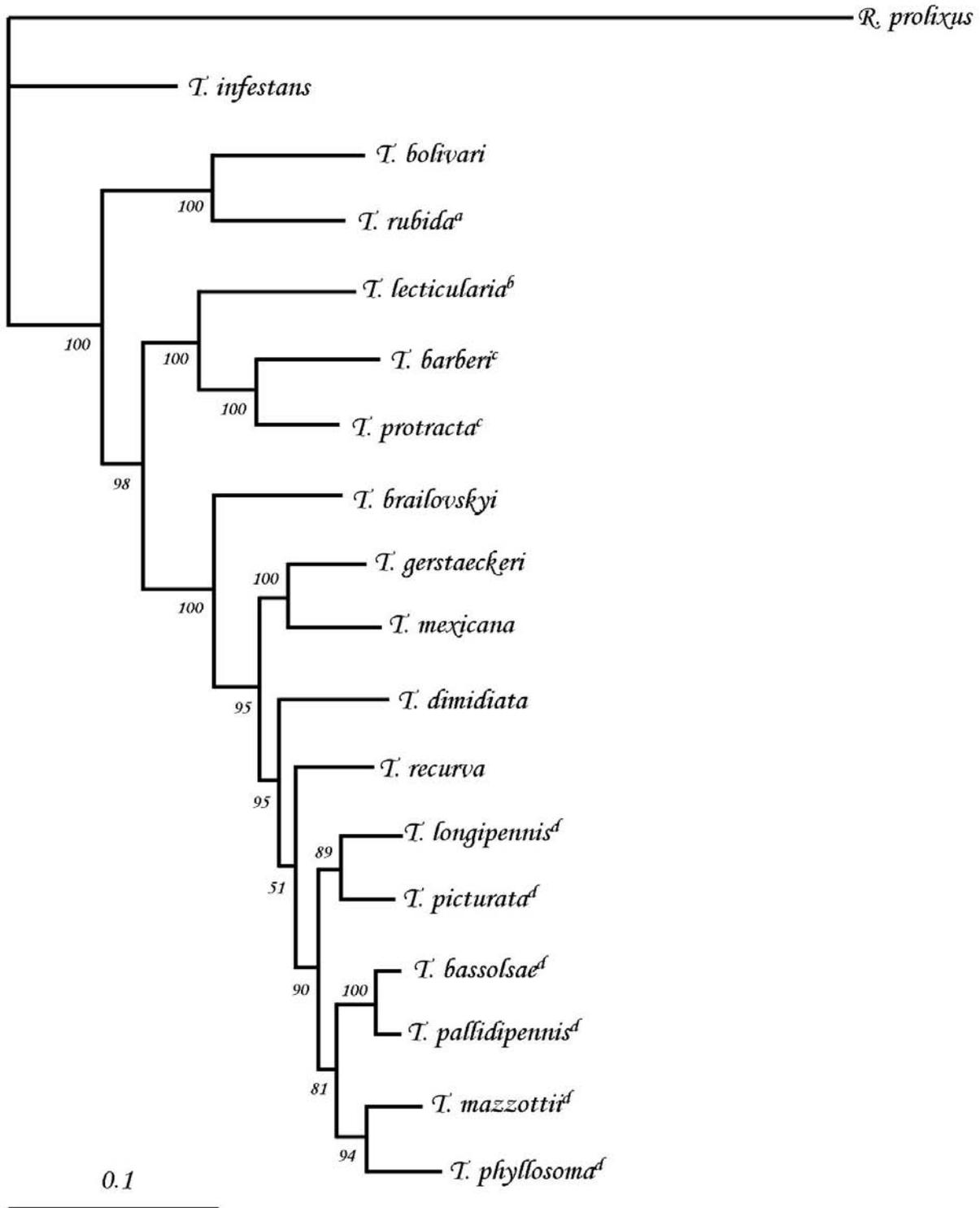


Figura 10. Árbol filogenético bayesiano para los insectos triatominos usando ambas secuencias *cit b*+IST-2. ^acomplejo *Rubrofasciata*; ^b*Lecticularia*; ^c*Protracta*; ^d*Phyllosoma*. Los valores de los nodos indican la probabilidad posterior, empleando 10000000 de generaciones empleando el modelo de sustitución de nucleótidos GTR+G.

VII.2. Análisis de las secuencias del citocromo b en especies simpátricas

Análisis Genéticos

Se analizaron 28 secuencias de los ejemplares de campo que corresponden a especies que habitan en simpatría, algunos de estos individuos presentaron caracteres morfológicos de dos especies. Para los análisis de identificación genética se emplearon las secuencias del *cit b* y sólo en algunos individuos se utilizaron las secuencias del ITS-2.

Se realizó un análisis filogenético empleando las secuencias de especímenes denominados tipo (especies clasificadas como tipo debido a estudios detallados de identificación morfológica e isoenzimática; ver sección VI.1.a) como controles de identificación genética y comparando con las secuencias de organismos del complejo *Phyllosoma* provenientes de áreas simpátricas.

El árbol filogenético muestra incongruencia genética y morfológica cualitativa para las especies simpátricas. Especímenes clasificados morfológicamente como *T. pallidipennis* (individuos con las claves EU790619, EU790621, EU790631 y EU790632) y *T. longipennis* (individuo EU790618 y EU790624) fueron agrupados genéticamente en los clados de la especie *T. picturata* representados por las secuencias de los organismos tipo AY859413, 08 y 184. Este clado también agrupó a la mayoría de los individuos con caracteres mezclados previamente designados como *T. sp* (Individuos EU790628, EU790633, EU790634, EU790635, EU790636 y EU790637; *cit b* con un 96% de identidad. En el clado de las especies tipo *T. pallidipennis*, representado por los individuos AY859419, AY859420, AF045724 y DQ198814, se situaron las secuencias de individuos morfológicamente *T. longipennis* (individuos con las claves EU790616, EU790617, EU790625 y EU790640) y *T. picturata* (individuos EU790627 y DQ198817). El espécimen EU790630 designado morfológicamente como *T. sp* se localizó en el clado de los individuos tipo pertenecientes a la especie *T. phyllosoma*, y finalmente, en el clado *T. mazzottii* se situó el individuo EU790629 morfológicamente clasificado como *T. pallidipennis* (Figura 11). Estos datos indican el posible proceso de hibridación en las especies del complejo *Phyllosoma* que viven en simpatría. Las ramas del árbol filogenético muestran arriba del 43% de probabilidad posterior (Bayesianos).

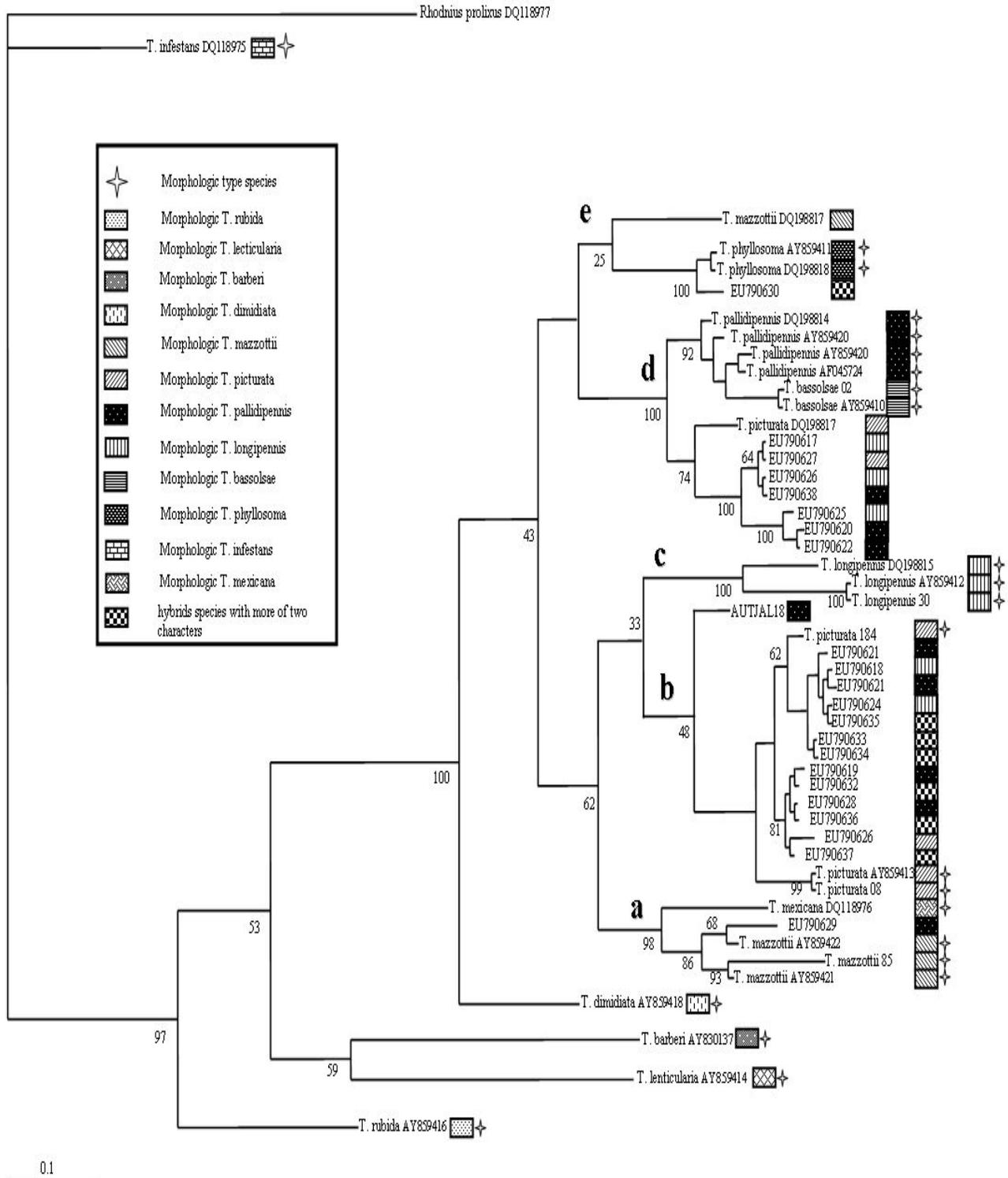


Figura 11. Árbol filogenético bayesiano de especies de triatominos simpátricos empleando las secuencias del *cit b*. Árbol de consenso de mayoría elaborado con el modelo de evolución HKY+G. Los valores de los nodos indican el porcentaje de la probabilidad posterior; la información contenida en el recuadro significa la clasificación morfológica de cada uno de los individuos de acuerdo a las claves taxonómicas de Lent y Wygodzinsky (1979). Los símbolos al final de las ramas representan su identidad morfológica, las claves con una estrella representan organismos tipos y los demás individuos representan individuos en poblaciones simpátricas.

Análisis Morfométricos

Para correlacionar los hallazgos genéticos en aquellas especies de áreas simpátricas, se realizaron análisis detallados de morfología cuantitativa, empleando los receptores antenales. Los individuos estudiados fueron analizados considerando tres diferentes situaciones: 1.- como especie, 2.- por localidad de captura y 3.- por población (especie/localidad).

El análisis univariado muestra pocas diferencias significativas entre los grupos estudiados, solo los receptores br y th en pedicelo, tk en flagelo I y ba y tk en flagelo II, mostraron altas diferencias en los números de receptores, separando a la especie *T. pallidipennis* (especie tipo) de las demás especies analizadas, estas últimas con similar números de receptores (Tabla 5). De forma similar los análisis multivariados mostraron poca significancia estadística entre los tres grupos estudiados, es decir, los análisis por localidad y por especie/localidad mostraron 7 y 8 receptores con diferencias significativas encontramos que los individuos analizados del estado de Morelos son los que presentaron mayores diferencias significativas con los receptores: br y th en el pedicelo, th y tk en el flagelo I, tk y ba en el flagelo II. Las poblaciones de Talpa de Allende sólo difirieron en un receptor th del pedicelo de las poblaciones de Tecomatlan. Para las demás localidades no se observaron diferencias en algún tipo de receptor (Tabla 6).

Tabla 5. Desviación estándar del número de receptores antenales en las diferentes especies del complejo *Phyllosoma*.

Especie	Localidad	Segmentos											
		Pedicelo				Flagelo I				Flagelo II			
		br	th	tk	ba	br	th	tk	ba	br	th	tk	ba
<i>T. longipennis</i>	Tecomatlán, Autlán de Navarro, Jalisco, México	92.75	108	36.25	4.25	15.75	73.75	198.8	19.5	9.75	26.75	129.5	23
		25.8	23.05	25.89	2.217	2.63	13.28	59.67	2.646	3.5	6.702	53.83	12.54
<i>T. longipennis</i>	Teocuitatlan, Jalisco, México	105.4	175.9	25.25	2.75	16	83.13	247.3	29.63	11.88	39.25	200.5	31
		23.49	49.59	19.99	2.252	5.632	28.27	64.18	13.04	3.643	12.35	60.29	8.194
<i>T. pallidipennis</i>	Tecomatlan, Autlán de Navarro, Jalisco, México	109.3	135.8	34.13	3.875	16.25	68.63	228.1	32.63	11.88	36.25	169.5	27.75
		20.97	25.01	14.59	1.885	4.528	10.21	50.53	8.28	2.475	7.517	24.29	5.523
<i>T. pallidipennis</i>	Cuernavaca, Morelos, México	141	271.2	48	5.2	18.8	111.2	362.6	28.4	13.2	42	260.4	41.4
		25.97	46.72	20.84	3.493	5.02	36.09	62.64	13.01	2.683	13.8	42.38	14.62
<i>T. pallidipennis</i>	Talpa de Allende, Jalisco, México	125	163.5	17.33	3.333	21.33	82.5	243.7	24	15.67	44	222	37.33
		10.24	27.38	10.5	0.816	1.966	20.53	13.72	4.817	3.933	5.727	35.4	7.633
<i>T. picturata</i>	Nayarit, México	134.3	149.4	26.43	3.143	25.14	86.14	233.9	22	12.71	32.86	198.7	32.86
		17.52	27.99	8.522	1.345	2.193	20.76	21.47	7.832	2.289	8.133	43.72	10.54
<i>T. picturata</i>	Talpa de Allende, Jalisco, México	94.17	161.7	44	2.833	15.33	77	220.3	21.83	10.33	38	178.3	26
		27.63	24.34	15.23	1.722	4.59	10.26	35	7.627	1.862	6.229	42.46	8.672
<i>Triatoma sp</i>	Talpa de Allende, Jalisco, México	90.44	158.4	29.33	3.889	15.78	80.33	211.9	24.22	11	34.11	184.9	33.44
		17.58	51.91	13.22	1.167	2.587	13.5	31.91	8.8	2.828	11.04	30.98	7.435

br, bristle; th, tricoides de pared fina; tk, tricoides de pared gruesa; ba, basiconicos. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar

Tabla 6. Análisis multivariado de los fenotipos antenales de las especies pertenecientes al complejo *Phyllosoma*.

ANOVA	Segmentos											
	Pedicelo				Flagelo I				Flagelo II			
	br	th	tk	ba	br	th	tk	ba	br	th	tk	ba
Como especie	0.000 ^a	0.454	0.557	0.389	0.103	0.772	0.054	0.315	0.006 ^a	0.622	0.138	0.151
Como localidad	0.000 ^a	0.000 ^a	0.233	0.021 ^a	0.121	0.001 ^a	0.000 ^a	0.624	0.282	0.333	0.000 ^a	0.039 ^a
Como población (especie / localidad)	0.000 ^a	0.000 ^a	0.383	0.022 ^a	0.183	0.007 ^a	0.000 ^a	0.277	0.089	0.025 ^a	0.000 ^a	0.020 ^a

Estos especímenes están agrupados de acuerdo a especies, localidad y población (especie/localidad).

^a Valores con significancia estadística de $p > 0.05$.

Análisis Discriminante

Con los datos obtenidos de las sensillas antenales, se realizaron análisis multivariados discriminantes, empleando las 12 variables morfológicas cuantitativas. Estos análisis mostraron, principalmente 3 agrupaciones, 1.- Individuos de *T. longipennis* colectados en Autlán de Navarro, *T. pallidipennis* de Autlán de Navarro, *T. longipennis* de Teocuitatlán, *T. pallidipennis*, *T. picturata* y *Triatoam sp* de Talpa de Allende; 2.-*T. picturata* de Nayarit y 3.-*T. pallidipennis* de Morelos. Siendo los grupos 2 y 3 los únicos que se pudieron separar con los análisis discriminantes, los demás ejemplares formaron un grupo compacto (Figura 12).

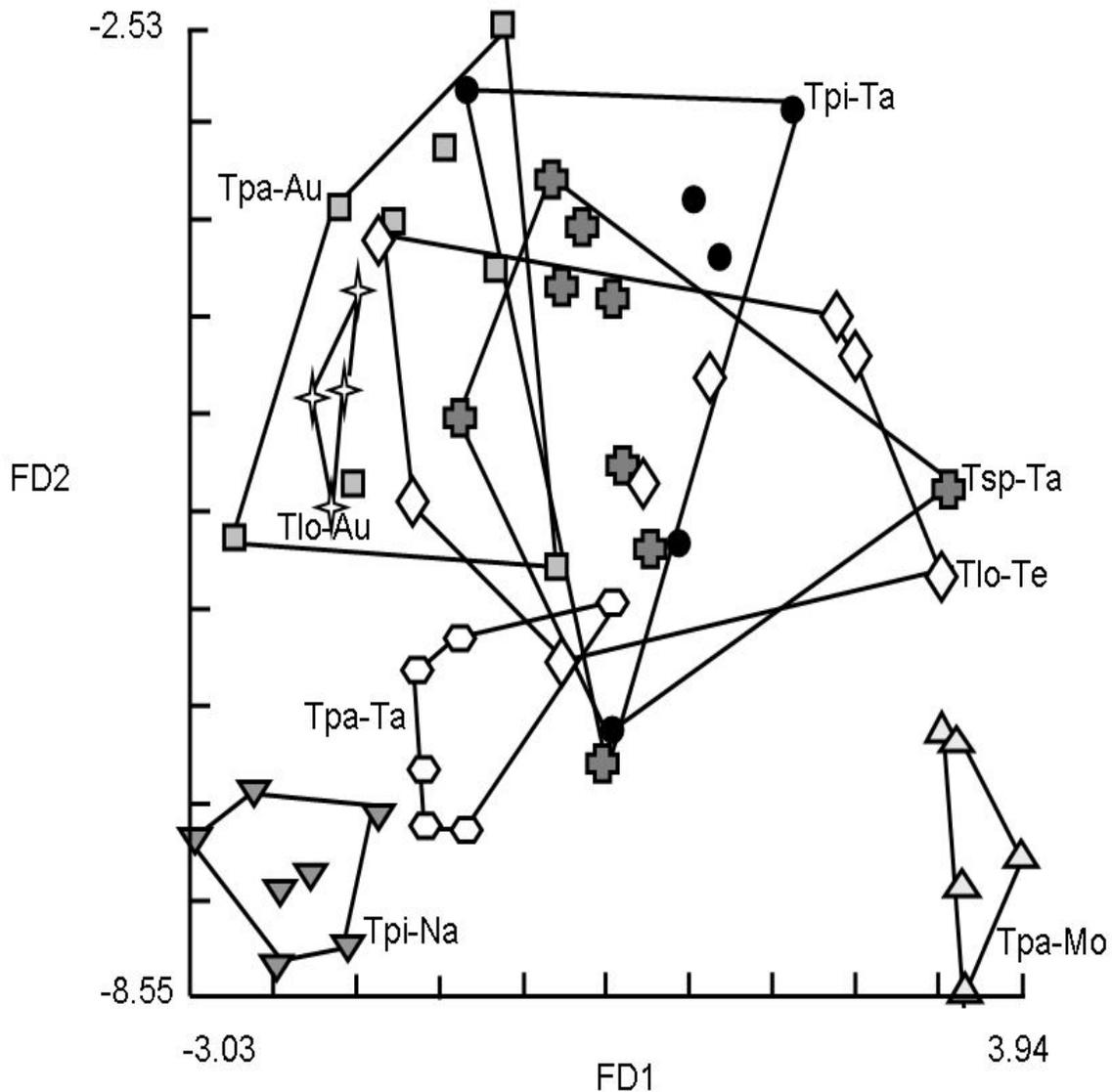


Figura 12. Análisis discriminante para las poblaciones de triatomos en simpatria. Cada punto significa un individuo en los ejes canónicos (FD1 y FD2), con agrupamientos poligonales, Tlon-Au=*T. longipennis* Autlán de Navarro, Tlon-Te=*T. longipennis* Teocuitatlán de Corona, Tpal-Au=*T. pallidipennis* Autlán de Navarro, Tpal-Mo=*T. pallidipennis* Morelos, Tpal-Ta=*T. pallidipennis* Talpa de Allende, Tpic-Na=*T. picturata* Nayarit, Tpic-Ta=*T. picturata* Talpa de Allende, y Tsp-Ta=*Triatoma sp* de Talpa de Allende.

VII.3. Análisis de secuencias altamente variables del gen del citocromo b

En el apartado VII.1 mencionamos la presencia de secuencias del *cit b* que presentaban valores de identidad intraespecífica de alrededor del 78.9% a los esperados, estos datos no correlacionan con lo reportado en la literatura en donde se ha visto para individuos de la misma especie variabilidad de 96 a 100% (Tabla 7).

Por otro lado, también detectamos algunas secuencias para la especie *T. rubida* con deleciones e inserciones de nucleótidos; las inserciones se observaron al inicio y a 108 pb de la secuencia, mientras que la deleción en el sitio 176. Para esta especie, se secuenciaron 4 individuos de los cuales dos de ellos presentaron estas deleciones e inserciones. Estas modificaciones en la secuencia interrumpen el marco de lectura para la traducción deducida de las proteínas. Sin embargo, las secuencias de los otros 2 ejemplares analizados no presentan estas modificaciones en la secuencia, concordando con el alineamiento a nivel de nucleótidos y de aminoácidos para la secuencia funcional de la proteína en otras especies (Figura 13).

Tabla 7. Porcentaje de identidad del citocromo b a nivel de nucleótidos y aminoácidos.

Especies	Clave	Identidad a nivel de nucleótidos	Identidad a nivel de aminoácidos	
1	<i>T. barberi</i>	JVA 5 JVA 4 JVA 11	80% con JVA5 88% con JVA5 y 79% con JVA11 80% con JVA5	99% con JVA4 y 89% con JVA11 99% con JVA5 y 90% con JVA11 89% con JVA5 y 90% con JVA4
2	<i>T. rubida</i>	RAA092 RAA142	100% con RAA142 y 86% con RAA091 y RAA141 100% con RAA092 y 86% con RAA091 y RAA141	no codificante ^A no codificante ^A
3	<i>T. bassolsae</i>	RAA002 RAA004 RAA136	100% con RAA136 79% con RAA136 y RAA002 100% con RAA002	100% con RAA136 87% con RAA136 y RAA002 100% con RAA002
4	<i>T. pallidipennis</i>	RAA023	79% con RAA021 y 84% con genbank <i>D. maximus</i>	91% con RAA021 y 96% con genbank <i>D. maximus</i>
5	<i>T. mazzottii</i>	RAA037 RAA038 RAA085	87% con RAA038 y 90% con RAA085 87% con RAA037 y 95% con RAA085 95% con RAA038 y 90% con RAA037	98% con RAA085 y 98% con RAA038 98% con RAA085 y 98% con RAA037 98% con RAA038 y 98% con RAA037
6	<i>T. longipennis</i>	CUX33 RAA174	87% con RAA030 y RAA029 88% con RAA029 ó RAA030 ó CUX33	98% con RAA029 y RAA030
7	<i>T. picturata</i>	RAA007 RAA184	79.2% con RAA006 y RAA008 96% con RAA006 ó RAA008 y 80% con RAA007	91.3% con RAA006 y RAA008

Ejemplos de individuos con secuencias altamente variabilidad identificadas en este trabajo

^ASecuencias que presentan deleciones inserciones y que por las mismas no pueden ser deducidos la proteína.

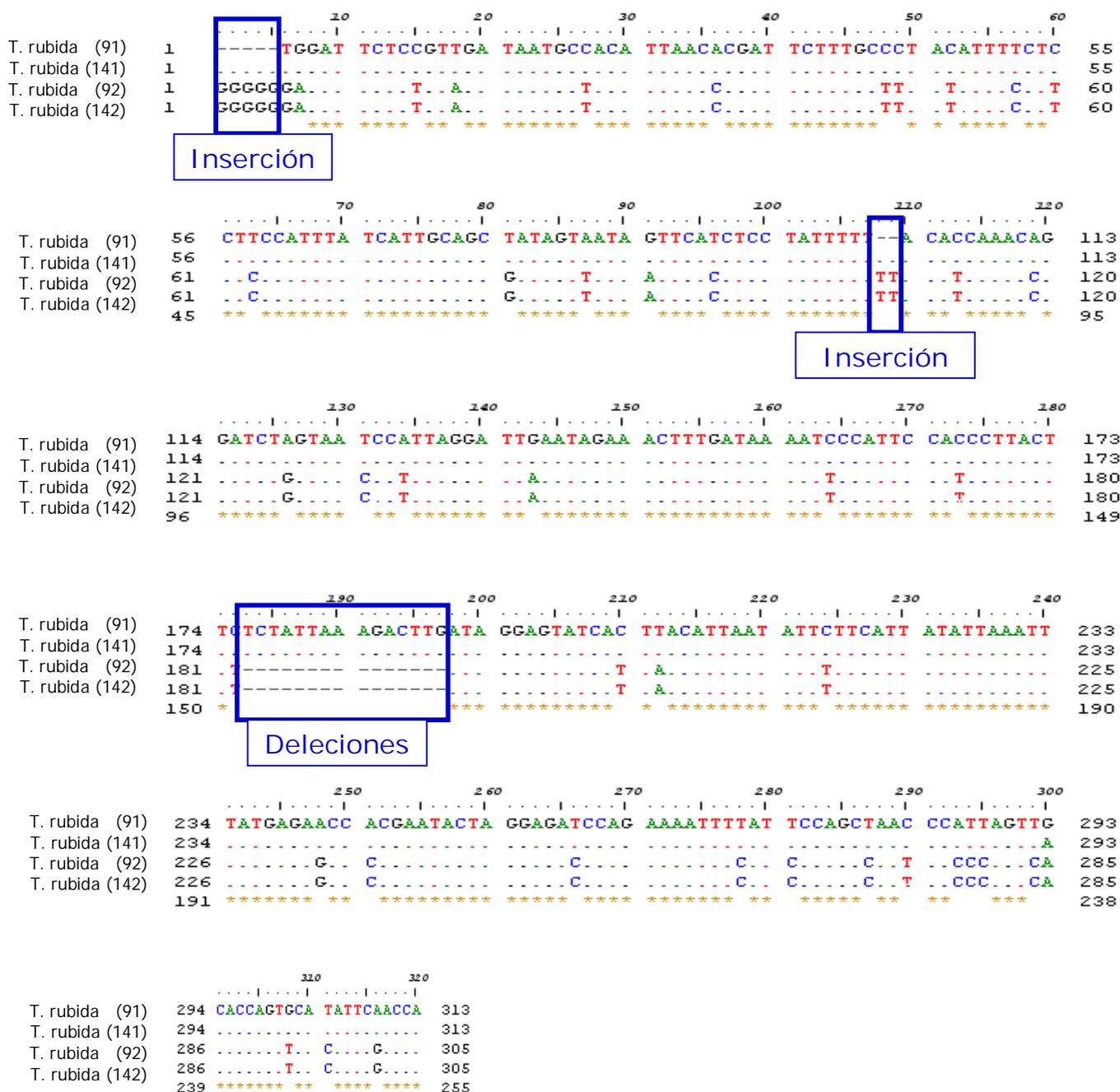


Figura 13. Presencia de inserciones y deleciones entre las secuencias de los individuos de la especie *T. rubida*. Los recuadros en la figura muestran 15 deleciones de nucleótidos y 8 inserciones a lo largo de las secuencias de los individuos 92 y 142, en contraste las secuencias de los individuos 91 y 141 representan individuos codificantes.

Identificación de múltiples copia del gen citocromo b

Para analizar si las variaciones intraindividuales como las observadas para la especie *T. rubida* (arriba mencionada), se relacionaba con la existencia de más de una

copia del gen del *cit b* (heteroplásmia¹³ y/o pseudogenes¹⁴) se empleó la técnica de Southern blot. El genoma mitocondrial es haploide y presenta varias copias de mtADN iguales entre sí. Al realizar un experimento de hibridación de ADN sólo se espera observar la señal de una banda que corresponde al gen de interés (en este caso el *cit b*), bajo este principio se realizó un experimento de hibridación de ADN total. Para ello, se usó ADN digerido con las enzimas XbaI, HindIII y ClaI. Se usaron estas enzimas porque no digieren el segmento del gen del *cit b* amplificado, y como se cuenta con el genoma mitocondrial de la especie *T. dimidiata* en el Genbank, se realizó un análisis de digestión para predecir el tamaño esperado para cada fragmento hibridado que corresponda al genoma mitocondrial. Por lo tanto, la digestión con la enzima XbaI sólo debería mostrar un fragmento de 8,715 pb, en el caso de la digestión con HindIII de 6,829 pb y para ClaI de 5,425 pb, (Figura 14). Como se puede ver, algunas especies mostraron más de una banda de hibridación, sugiriendo la presencia de más de una copia del gen del *cit b*, en donde posiblemente las bandas que muestran mayor intensidad pudieran corresponder al mtADN, mientras que las bandas más tenues al posible pseudogen o secuencias heteroplásmicas. Este experimento se realizó por duplicado con los mismos resultados, sugiriendo la existencia de múltiples copias del gen del *cit b*.

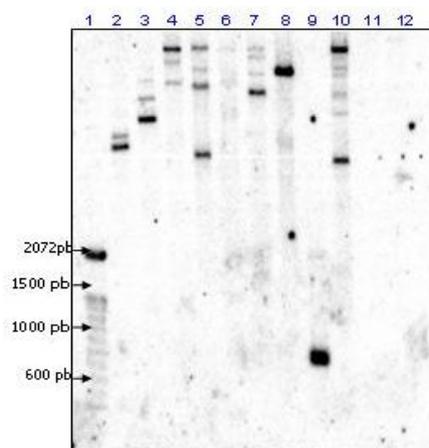


Figura 14. Hibridación de ADN nuclear para 4 diferentes especies de triatominos. Se usó 5.3 µg de ADN para todas las especies. 1.- Marcadores moleculares, 2.- *T. dimidiata* digerido con Xba I, 3.- *T. dimidiata* con Hind III, 4.- *T. dimidiata* con Cla I, 5.- *T. pallidipennis* con Xba I, 6.- *T. pallidipennis* con Hind III, 7.- *T. pallidipennis* con Cla I, 8.- *T. mazzottii* con Xba I, 9.- *T. mazzottii* con Hind III, 10.- *T. mazzottii* con Cla I, 11.-*T. rubida* con Xba I, 12.-*T. rubida* con Hind III.

Secuenciación múltiple para el gen del citocromo b en un solo individuo

¹³ Existencia de más de una variante genética de los genes mitocondriales que coexisten en un mismo individuo.

¹⁴ Secuencia nucleotídica similar a un gen pero la cual no da como resultado un producto funcional, es decir, no se expresa.

Con los resultados anteriores se concluyó que existe más de una copia del gen del *cit b* en el genoma total de los individuos analizados. Sin embargo, para poder determinar cómo son estas diferentes copias y determinar la presencia de pseudogenes y de heteroplasma, se secuenciaron seis clonas de algunos individuos de los ocho complejos que integran el género *Triatoma* presentes en México.

Para el individuo 26 de la especie *T. longipennis* se secuenciaron 6 clonas, de estas tres de ellas (clona 2, 3 y 6) presentaron una inserción de nucleótidos en la posición 134 y una delección de 13 nucleótidos en la posición 182 del fragmento del gen *cit b* secuenciado, de estas tres clonas no se pudo deducir la secuencia de proteínas ya que estas mutaciones corren el marco de lectura y se generan codones de paro. Estas secuencias son la evidencia de que al menos dos pseudogenes se encuentran presentes en este individuo, ya que la secuencia de la clona 2 y 6 son 100% idénticas, por lo que se piensa que se trata del mismo pseudogen, mientras que la clona 3 presentó 3 nucleótidos diferentes con una identidad de 99% con respecto a las clonas 2 y 6 (Tabla 8, Figura 15 y 16).

Las otras tres secuencias, clonas 1, 4 y 5 son codificantes y no presentan ni delecciones ni inserciones, la comparación entre estas tres secuencias muestran identidades de 98 y 99% indicando pocas variaciones entre ellas y sugiriendo que estas secuencias son las funcionales. La traducción a aminoácidos revela una proteína altamente conservada, con solo un cambio de residuos de aminoácidos en la clona 4, una isoleucina por una treonina (Figura 16). Las secuencias de las clonas 1, 4 y 5 sugieren la existencia de heteroplasma, ya que las tres secuencias a nivel de nucleótidos son diferentes y al menos dos de ellas (la clona 1 y 5) codifican para una proteína 100% idéntica. En conclusión, el individuo 26 de la especie *T. longipennis* presenta tanto pseudogenes como secuencias heteroplásmicas.

Tabla 8. Diferencias genéticas en 6 clonas del individuo 26 de la especie *T. longipennis*.

	1	2	3	4	5
[1] 26-1 ^a					
[2] 26-2	89				
[3] 26-3	90	99			
[4] 26-4 ^a	98 ^a	90	90		
[5] 26-5 ^a	99 ^a	89	90	99 ^a	
[6] 26-6	89	100	99	90	89

^aSecuencias no deducibles a proteínas debido a mutaciones en la molécula.

```

T. longipennis (26-2) AGGCTTTTCT GTAGATAAAG CTACTTTAAC TCGATTITTT GCCCTTCACT TCCTCTTACC
T. longipennis (26-6) .....
T. longipennis (26-3) .....
T. longipennis (26-1) ..A..C..C.....T.....C.....T.....T.....
T. longipennis (26-5) ..A..C..C.....T.....C.....T.....T.....
T. longipennis (26-4) ..A..C..C.....T.....C.....T.....T.....

T. longipennis (26-2) CTTCATTATT GCAGCCATAG TAATAATTCA CCTTTTATTC CTACATCAA CAGGATCAAG
T. longipennis (26-6) .....
T. longipennis (26-3) .....
T. longipennis (26-1) ..T.....T.....T.....
T. longipennis (26-5) ..T.....T.....T.....
T. longipennis (26-4) ..T.....C.....T.....

T. longipennis (26-2) AAACCGTTA GGATTTAAAT AGAACTTTG ATAAAATTC ATTCCACCCA TATTTTCCCA
T. longipennis (26-6) .....
T. longipennis (26-3) .....GA.....C.....
T. longipennis (26-1) ..T..CC..G.....C..C..G.....C.....
T. longipennis (26-5) ..T..CC..G.....C..C..G.....C.....
T. longipennis (26-4) ..T..TC..-.....C..C.....

T. longipennis (26-2) TT-----SAGTT TCCCTGACCT TAATATT TT TATCCTTTTA AGTTTATGGG
T. longipennis (26-6) .....
T. longipennis (26-3) .....
T. longipennis (26-1) ..AAAGACTT AATAG..A.....A..T.....C.....T..A.....C.....
T. longipennis (26-5) ..AAAGACTT AATAG..A.....A..T.....C.....T..A.....C.....
T. longipennis (26-4) ..AAAGACTT AATAG..G.....A..T.....C.....T..A.....C.....

T. longipennis (26-2) AAGCCCAAT TCTAATAGAC CCAGAAAAC TTATCCCGC AAACCCACTA GTTACACCAG
T. longipennis (26-6) .....
T. longipennis (26-3) .....
T. longipennis (26-1) ..A.....T.....T.....T.....T.....T.....C.....
T. longipennis (26-5) ..A.....T.....T.....T.....T.....T.....C.....
T. longipennis (26-4) ..A.....T.....T.....T.....T.....T.....C.....

T. longipennis (26-2) TGCATATTCA ACCA
T. longipennis (26-6) .....
T. longipennis (26-3) .....
T. longipennis (26-1) .A.....
T. longipennis (26-5) .A.....
T. longipennis (26-4) .A.....

```

Figura 15. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos para 6 clonas del individuo 26 perteneciente a la especie *T. longipennis*. Las secuencias dentro de los recuadros indican diferencias genéticas entre las 6 diferentes clonas. Las secuencias de los individuos 26-2, 26-6 y 26-4 presentan una delección y 13 inserciones de nucleótidos.

```

T. longipennis (26-1) GFSVDNATLT RFFALHFLLP FIIAAMVMIH LLFLHQTGSS NPLGLNSNFD KIPFHPYFSI
T. longipennis (26-4) .....T.....
T. longipennis (26-5) .....

T. longipennis (26-1) KDLMGVSLTL MFFILLSLWE APILMDPENF IPANPLVTPV HIQP
T. longipennis (26-4) .....
T. longipennis (26-5) .....

```

Figura 16. Alineamiento de la secuencia de proteínas para 3 clonas del individuo 26 de la especie *T. longipennis*. Las secuencias dentro del recuadro indican diferencias genéticas entre las 3 diferentes clonas.

En el caso del individuo 91 de la especie *T. rubida* perteneciente al complejo *Rubrofasciata*, se secuenciaron 5 clonas, las que al parecer fueron codificantes y no se encontró ninguna secuencia con delecciones, inserciones o codones de paro al deducir la secuencia de residuos de aminoácidos. Estas cinco secuencias tienen identidades de 95 hasta 99.9% de similitud a nivel de nucleótidos (Tabla 9). La traducción de la proteína es 100% idéntica para las clonas 91-2, 91-21 y 91-23 (Figura 17), las demás clonas

presentan variaciones en la composición de residuos de aminoácidos. La clona 91-3 presentó 6 cambios de aminoácidos, cinco de los seis cambios son mutaciones sinónimas, ya que los residuos de aminoácidos cambiados presentan características químicas similares, como la carga, no necesariamente afectando la función de la proteína. Sólo un cambio es una mutación no sinónima, ya que el aminoácido cambiado es una prolina (aminoácido polar) por una valina (aminoácido no polar). En la Figura 18, se pueden observar con mayor claridad las posiciones de las mutaciones presentadas a lo largo de las secuencias del gen del *cit b*. Es importante decir, que con estas cinco secuencias se demuestra la existencia de más de una variante del gen del *cit b* y al parecer la confluencia de más de una secuencia codificante, es decir, heteroplasmia y la posible presencia de pseudogenes en el individuo RAA091 de la especie *T. rubida*.

Tabla 9. Identidad genética a nivel de aminoácidos para 5 clonas del individuo 91 perteneciente a la especie *T. rubida*.

	1	2	3	4		
T. rubida (9121)	TTTATCATTC	CAGCTATAGT	ATACTTCAT	CTCCTATTTT	TACAGCAAA	AGGATCTAGT
T. rubida (9123)	[1] 91-1	C
T. rubida (91-2)	[2] 91-2
T. rubida (91-1)	[3] 91-3
T. rubida (91-3)	[4] 9121
T. rubida (9121)	ATCCATTG	GATTGAATAG	AACTTTGAT	AGATCCCAT	TCCGCTTA	CTTCTCTATT
T. rubida (9123)	[5] 9123
T. rubida (91-2)
T. rubida (91-1)
T. rubida (91-3)
T. rubida (9121)	AAAGACTTGA	TAGGAGTATC	ACTTACATTA	ATATTCTTCA	TTATATTA	TTTATGAGAA
T. rubida (9123)
T. rubida (91-2)
T. rubida (91-1)
T. rubida (91-3)
T. rubida (9121)	CCACGAATAC	TAGGAGATCC	AGAAAAATTTT	ATTCCAGCTA	ACCATTAGT	TACACCAGTG
T. rubida (9123)
T. rubida (91-2)
T. rubida (91-1)
T. rubida (91-3)
T. rubida (9121)	CATATTCAAC	CA				
T. rubida (9123)
T. rubida (91-2)
T. rubida (91-1)
T. rubida (91-3)

Figura 17. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos para 5 clonas del individuo 91 perteneciente a la especie *T. rubida*. Las secuencias dentro de los recuadros indican diferencias genéticas entre las 5 diferentes clonas.

```

T. rubida (91.2)      GFSVDNATLT RFFALHFLLP FIIAAMVMVH LLFLHQGTSS NPLGLNSNFD KIPFHPYFSI
T. rubida (91-3)      .....
T. rubida (9121)      .....
T. rubida (9123)      .....
T. rubida (91-1)      .....

T. rubida (91-2)      KDLMGWSLTL MFFIMLNLE PRMLGDPENF IPANPLVTPV HIQP
T. rubida (91-3)      .....L.S...VPI.M.....
T. rubida (9121)      .....
T. rubida (9123)      .....
T. rubida (91-1)      .....A.....

```

Figura 18. Alineamiento de la secuencia de proteínas para 5 clonas del individuo 91 perteneciente a la especie *T. rubida*. Las secuencias dentro del recuadro indican diferencias genéticas entre las 3 diferentes clonas.

Análisis empleando secuencias codificantes del gen del cit b

Como observamos en los ejemplos anteriores, la secuenciación de varias clonas fue útil para determinar las variantes del fragmento del *cit b*. Sin embargo, la identificación de variantes del *cit b* para definir cuales de estas pertenecen a pseudogenes y cuales son producto de heteroplasma es difícil. Además, la secuenciación de un número grande de clonas es impráctica y no específica, ya que muchas de estas clonas secuenciadas pudieran ser la misma variante, no asegurando que se pudieran encontrar las variantes heteroplásmicas o pseudogenes presentes en un organismo. Por lo anterior, se decidió emplear otras técnicas que pudieran ayudarnos a resolver estos problemas y nos brindaran la posibilidad de obtener una secuencia de cada una de las diferentes variantes.

Para determinar la presencia de pseudogenes y de heteroplasma se emplearon las técnicas moleculares de análisis del polimorfismo conformacional de las cadenas sencillas de ADN (SSCP por sus siglas en inglés). Con esta técnica se compararon los fragmento del gen del *cit b* amplificado a partir de la extracción de ADN total y el amplificado a partir de cADN obtenido de la extracción de RNA mensajero, de tal manera, que la comparación empleando ambos amplificados sirvió para saber cual era la o las secuencias codificante, es decir si existía heteroplasma, así como la presencia y el número de pseudogenes presentes en cada especie de triatomino analizada.

De las especies *T. dimidiata*, *T. bassolsae*, *T. mexicana*, *T. pallidipennis*, *T. picturata* y *T. rubida* se extrajo RNA y se realizó la retrotranscripción, para obtener cADN. Posteriormente, con la mayoría de cADNs y ADNs se amplificó el fragmento del *cit b* (Figura 19).

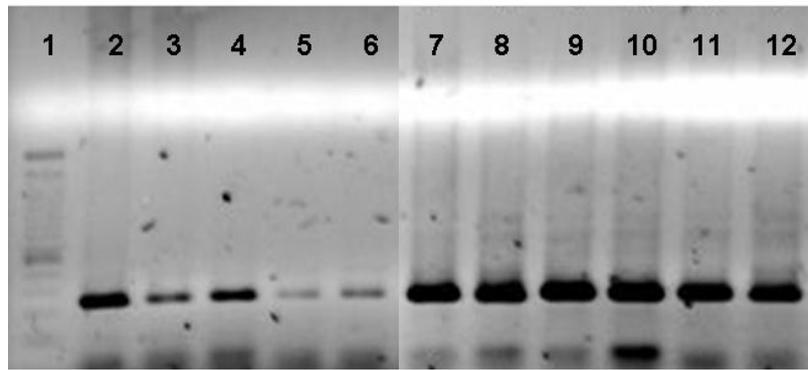


Figura 19. Amplificación por PCR del gen del *cit b* usando ADN y cADN de diferentes muestras de triatomíneos. 1.- Marcadores 100pb; 2.- *T. dimidiata* (cam7); 3.- *T. sp* (aut jal 26); 4.- *T. longipennis* (RAA067); 5.- *T. rubida* (RAA145), 6.- *T. mexicana* (RAA172), 7.- *T. dimidiata* (CAM7); 8.- *T.sp* (Autjal 26); 9.- *T. longipennis* (RAA067); 10.- *T. rubida* (RAA145), 11.- *T. mexicana* (RAA172), 12.- *T. pallidipennis* (RAA179).

Al analizar los productos de PCR con la técnica de SSCP, teóricamente en el caso de existir una sola versión del gen del *cit b* sólo se debieran de observar dos bandas, cada banda correspondiente a cada una de las dos hebras de ADN. La presencia de más de dos bandas, reflejaría variantes genéticas del gen, que indicarían pseudogenes y/o heteroplasmia. En la Figura 20, se observa un análisis de SSCP, los carriles 1, 3, 5 y 7 son amplificados a partir de la extracción de ADN total, mientras que los carriles 2, 4, 6 y 7 son amplificados a partir de cADN. Como se puede ver en la Figura 20 y la Tabla 10, la mayoría de los amplificados, ya sea para aquellos provenientes de ADN total o de cADN de las 4 especies de triatomíneos analizadas, presentaron al menos 4 bandas, las cuales pudieran ser secuencias codificantes, es decir, secuencias heteroplasmicas. Para confirmar esto se extrajo el ADN amplificado de cada una de las bandas del gel del análisis de SSCP y se realizaron amplificaciones por PCR del *cit b* con estos tipos de ADN o cADN, para su posterior secuenciación.

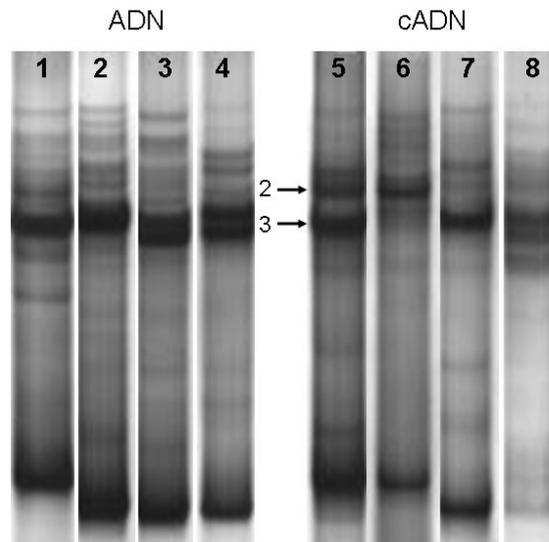


Figura 20. Análisis de SSCP para las especies de triatomíneos analizadas. SSCP con muestras provenientes de ADN: 1.- *T. dimidiata* (CAM7), 2.-*T. longipennis* (RAA067), 3.- ADN *T. rubida* (RAA091), 4.- ADN *T. mexicana* (RAA172). SSCP con muestras provenientes de cADN 5.- cADN *T. dimidiata* (CAM7), 6.- cADN *T. longipennis* (RAA067), 7.- cADN *T. rubida* (RAA091), 8.- cADN *T. mexicana* (RAA172).

Tabla 10. Bandas identificadas por SSCP para los amplificadores provenientes de ADN o de cADN.

Organismos	Número de bandas ADN	Número de bandas cADN	Bandas coincidentes en amplificadores con ADN y cADN
<i>T. dimidiata</i>	8	8	4
<i>T. longipennis</i>	8	6	4
<i>T. rubida</i>	9	6	6
<i>T. mexicana</i>	9	6	6

Las flechas 2 y 3 en el carril 5 de la Figura 20 indican las muestras extraídas, amplificadas y secuenciadas provenientes de los SSCP, de estas muestras se obtuvieron al menos una secuencias para cada muestra. A lo largo de los alineamientos de las secuencias obtenidas de nucleótidos se observaron mutaciones puntuales que no correlacionaban con amplificadores de esta misma especie reportados en el GenBank (Figura 21), algunas de estas mutaciones son químicamente diferentes, lo cual, nos pudiera sugerir una posible modificación en la funcionalidad de la proteína, para analizar este dato se realizó un modelo molecular de la proteína empleando la secuencias con mutaciones. Los resultados nos indicaron que aproximadamente no existe interacción o interferencia entre estos residuos de aminoácidos que modifiquen la funcionalidad la proteína (Figura 22).

Otra manera de saber si las mutaciones a lo largo de las secuencia del *cit b* son importantes en la función, es realizar una búsqueda extensiva en el Genbank de las secuencias de esta proteína (abarcando diferentes géneros, familias y reinos), para así

cam3pro	GFELVKWLWG	GFSVDNATI	T	RFFALHFLLP	FI	AAMVMIH	LL	S	HQ	S	S	NPLGLNSNFD								
cam2pro	A	E	L	G								
Aldrichinagrahami	.ID..Q.V..	..A.....TF..I..	..V	L	ATL..	I..	L	E	G	..M...I.								
Autographanigrisigna	.VM..N.I..	..A.....YTF....	M	T...	L	E	G	..N...L.								
Bombusignitus	.QFI.E.I..	..IN.D..	N	..YSE..I..	L	LMF..	..M	L	I	G	..IHSKM.IY								
Grylloblattasculleni	.TDV.Q.V..	..A.....	N	..TF..M..	M	V	T	A	L	..E...L.								
Cheraxdestructor	.TD..Q.I..TF....	L	ATLV.	I..	L	H	S	GAN...SQSP.								
Homosapiens	.TD..Q.I..	..Y...S	P	..TF..I..	L	AAL..	L	E	G	..N...IT.HS.								
Auxisrochei	.TT..E.I..F...F..	V	TIL..	L	E	G	..N...I...SA.								
Canisfamiliaris	.TD..E.I..	K	F	I	L	A	V	L	E	G	..N...S.IT.DS.					
Canislatrans	.TN..E.I..	K	F	I	L	A	V	L	E	G	..N...S.IT.S.					
Musmusculus	.TT..E.I..	K	F	I	L	A	I	V	L	E	G	..N...T...DA.				
Passerdomesticus	.QT..E.A..	P	L	V	E	L	T	L	V	T	L	E	G	..N...IP.DC.		
Rattuseveretti	.TT..E.I..	K	F	I	L	A	I	V	L	E	G	..N...T...DA.				
Rattusnorvegicus	.TT..E.I..	K	F	I	L	A	I	V	L	E	G	..N...T...DA.				
Saccharomycescerevisiae	.NDI.S...	S	P	I	Q	Y	V	I	M	M	A	L	I	H	GITG.L.
Trypanosomacruzi	.QW.CY.I..	SEFINDE	I	KLHV..V...	V	I	T	I	V	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Plusiafestucae	.VM..N.I..	..A.....YTF....	M	T...	L	E	G	..N...M...L.								
Sclerophasmaparesisensis	.TD..Q.V..	..A.....	N	..TF..V..	M	I	S	V	L	L	E	G	..N...I...M.			
Tetradontophorabielanensis	.NE..Q.V..	..A.S.P...MI.....	L	T	E	G	L	L	V	L	E	G	..N...Q.			
tdgbmut	.ND.....	L	L	

Figura 23. Alineamiento de secuencias del citocromo b de diferentes organismos. Cuadros en azul indican mutaciones sinónimas¹⁵, en rojo mutaciones no sinónimas¹⁶, las flechas indican el aminoácido conservado histidinas.

¹⁵ Mutación que involucra uno o varios cambios de nucleótidos en la secuencia codificante, sin embargo resultando es un aminoácido diferente pero de una misma naturaleza química.

¹⁶ Mutación que involucra uno o varios cambios de nucleótidos en la secuencia codificante que resulta en la traducción de un aminoácido de diferente naturaleza química.

VIII DISCUSIÓN

VIII.1 Relaciones filogenéticas de los vectores de la Enfermedad de Chagas. Utilidad del citocromo b como marcador molecular

Pocos estudios a nivel genético se han realizado con las especies de triatomíneos del Norte de América. Estos estudios han abierto el interés en este tipo de análisis y han generado información general de las relaciones filogenéticas de algunas especies de triatomíneos de México y de Estados Unidos (Lyman *et al.*, 1999; Marcilla *et al.*, 2001; Hypsa *et al.*, 2002).

El presente estudio filogenético incluyó el análisis de diferentes triatomíneos de importancia epidemiológica en México y Centro América, además de algunas especies que no habían sido analizadas previamente utilizando las secuencias del *cit b* y del ITS-2. Entre ellas se encuentran las siguientes especies: *T. bassolsae*, especie descrita por Alexandre-Aguilar *et al.*, (1999), la cual, empleando caracteres morfológicos y análisis isoenzimáticos fue incluida en el complejo *Phyllosoma* (Martínez *et al.*, 2005); *T. mexicana* es una especie reportada en varios estados de México, por ejemplo Guanajuato, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí, y la cual ha sido incluida constantemente, por sus caracteres morfológicos, dentro del complejo *Phyllosoma* (Lent y Wygodzinsky, 1979; Bustamante *et al.*, 2004); *T. gerstaeckeri* ha sido reportada en estados del noreste y centro del país, como Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo y Tamaulipas (Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Galvão *et al.*, 2003); *T. brailovskyi* y *T. bolivari*, son especies escasamente reportadas y poco estudiadas, que se han descrito en los estados de Colima, Nayarit, Oaxaca y Jalisco (Ramsey *et al.*, 2000; Martínez-Ibarra *et al.*, 2001; Galvão *et al.*, 2003); *T. lecticularia*, la cual pertenece al complejo *Lecticularia* y *T. rubida*, al complejo *Rubrofasciata*, son especies epidemiológicamente importantes en la región norte de México (Zárate y Zárate, 1985; Martínez-Ibarra *et al.*, 1992; Paredes *et al.*, 2001).

Al analizar las secuencias del *cit b* y del ITS-2, tanto los resultados obtenidos con las distancias genéticas, así como las relaciones genéticas mostradas en los árboles, confirmaron la inclusión de la especie *T. bassolsae* al complejo *Phyllosoma*.

Por otro lado, se ha reportado la cercanía morfológica de *T. brailovskyi* con la especie *T. dimidiata* (Martínez *et al.*, 1984), incluyéndolas dentro de un nuevo complejo llamado complejo *Dimidiata* (Carcavallo *et al.*, 2000). En el caso de la especie *T. dimidiata*, hasta el momento, permanece en controversia su inclusión a algún complejo;

sin embargo, la mayor discusión se centra en su relación con el complejo *Phyllosoma*. Por ejemplo, análisis realizados con el fenotipo antenal, marcadores isoenzimáticos y con secuencias del ITS-2, han demostrado que aunque es una especie muy relacionada al complejo, *T. dimidiata* representa una entidad diferente, por lo que no se debería incluir en éste (Flores *et al.*, 2001; Marcilla *et al.*, 2001; Esteban *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006). En contraste, estudios empleando morfometría de la cabeza, así como análisis de las secuencias del *cit b*, *coI* (citocromo oxidasa) y otras secuencias mitocondriales, apoyan la inclusión de esta especie al complejo *Phyllosoma* (Lyman *et al.*, 1999; Hypsa *et al.*, 2002; Bustamante *et al.*, 2004; Pfeiler *et al.*, 2006). Posiblemente estas discrepancias son debidos a los altos niveles de variabilidad genética intraespecífica para diversas poblaciones de *T. dimidiata* provenientes de diferentes ecotopes¹⁷, que sugieren la existencia de más de una variante de la especie en México (Marcilla *et al.*, 2001; Tamay-Segovia *et al.*, 2008). Otra especie que se ha propuesto cercana filogenéticamente al complejo es *T. recurva* (Pfeiler *et al.*, 2006); esto es interesante, ya que no existían reportes a nivel morfológico ni propuestas anteriores de la probable relación de esta especie con el complejo. En nuestro análisis, *T. brailovskyi*, *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri* y *T. recurva*, mostraron distancias muy cercanas a las que agruparon al complejo *Phyllosoma*, y en el caso de los árboles filogenéticos realizados, estas especies se encontraron dentro del clado que agrupa a las especies de este complejo *Phyllosoma*. Es por ello que se sugiere la inclusión de estas especies a dicho complejo. En el caso particular de *T. dimidita*, nuestro grupo de trabajo había apoyado la exclusión de esta especie al complejo *Phyllosoma*, utilizando estas mismas secuencias (ITS-2 y *cit b*) (Martínez *et al.*, 2006), sin embargo, es importante considerar que solo se analizaron especies que tradicionalmente se habían incluido en el complejo (*T. bassolsae*, *T. picturata*, *T. longipennis*, *T. phyllosoma*, *T. longipennis* y *T. mazzottii*) y en ese momento no se incluyeron a otras especies de controversia, como *T. brailovskyi*, *T. bolivari*, *T. gerstaeckeri*, *T. sanguisuga* y *T. recurva*. Ahora, consideramos que al aumentar el número de especies mexicanas analizadas, los resultados nos reflejan una mayor claridad de las relaciones filogenéticas de este grupo de insectos. Es importante considerar que existen otras especies que también muestran controversias en cuanto a su inclusión a este mismo complejo, por ejemplo, *T. gomeznunezi*, *T. ryckmani* y *T. hegneri* (Carcavallo *et al.*, 2000) y sería interesante el

¹⁷ Espacio ocupado por una especie, que incluye tanto el espacio físico como el papel funcional de la misma.

poder analizarlas; sin embargo, existen pocos estudios de estas especies y no se sabe con claridad su distribución geográfica exacta. Un análisis futuro de estas especies es importante porque pudieran modificar las relaciones filogenéticas observadas en este trabajo.

Para la especie *T. bolivari* se desconoce si podría estar incluida dentro de algún complejo específico; al analizarla observamos que se encuentra en un clado externo al complejo *Phyllosoma* y presenta una fuerte relación filogenética con *T. rubida* perteneciente al complejo *Rubrofasciata*, en este caso sería necesario ampliar el análisis incluyendo a *T. rubrofasciata* integrante de este complejo para determinar si realmente *T. bolivari* puede ser incluida. Por otro lado, es importante considerar que por primera vez se describen las relaciones filogenéticas de *T. bassolsae*, *T. bolivari*, *T. brailovskyi*, *T. gerstaeckeri* y *T. mexicana* con otras especies.

Al analizar las secuencias del ITS-2, observamos que las distancias genéticas de las especies; *T. gerstaeckeri*, *T. mexicana*, *T. dimidiata*, *T. brailovskyi* y *T. recurva* con respecto a las del complejo *Phyllosoma*, tenía rangos similares de distancias, y filogenéticamente con altos valores de soportes estadísticos, sugieren la agrupación de todas ellas en un grupo mayor, posiblemente llamándolo complejo *Sanguisuga* debido a que la especie *T. sanguisuga* es filogenéticamente la más antigua según el árbol filogenético y el posible ancestro de este grupo, estos resultados concuerdan con los obtenidos con las secuencias del *cit b*.

A diferencia de lo obtenido con el *cit b*, el árbol generado con las secuencias del ITS-2 no logró diferenciar a la especie *T. bassolsae* de *T. pallidipennis* así como *T. picturata* de *T. longipennis*. Se ha reportado que el tipo de evolución reflejado por ambos marcadores es diferente, se sabe que la tasa de mutación de los genes mitocondriales es más alta que la de los genes nucleares (en una proporción de 10 mutaciones dentro del gen mitocondrial por cada una en el núcleo) (Brown *et al.*, 1982) siendo más claro el proceso de divergencia en los genes mitocondriales. Es por ello que hipotetizamos que dado el tipo de evolución que tiene el ITS-2, no logró diferenciar a las especies del complejo *Phyllosoma*. Para la especie *T. bolivari* al igual que con las secuencias del *cit b*, con ITS-2 se encontró cercana a la especie *T. rubida* y no a *T. dimidiata* como se había propuesto por Carcavallo *et al.*, (2003).

Debido a la mejor resolución del árbol filogenético observado con las secuencias del *cit b*, se consideró realizar un árbol filogenético general en donde se empleó las secuencias del *cit b* publicadas en el Genbank con las aquí obtenidas (Figure 9). En el

árbol, podemos identificar una clara separación entre las especies del género *Triatoma* del Sur y Centro América con las especies del Norte de América por lo que este escenario apoya la hipótesis de divergencia genética dentro del género *Triatoma* (Marcilla *et al.*, 2001, Hypsa *et al.*, 2002). Para las especies de otros complejos como *T. barberi*, *T. lecticularia*, *T. rubida*, *T. infestans* y *R. prolixus*, se confirmó el agrupamiento propuesto por Lent y Wygodzinsky (1979). Para *T. barberi* se observó una cercana relación a *T. protracta*, ambas especies pertenecientes al complejo *Protracta*. En contraste a lo reportado, nuestros estudios sugieren que la especie *T. nitida*, que también se incluye dentro del complejo *Protracta*, esta más relacionada a *T. rubida* (complejo *Rubrofasciata*). De igual manera la especie *T. sanguisuga* y *T. lecticularia*, ambas pertenecientes al mismo complejo (*Lecticularia*) se encuentran en clados diferentes, observando para *T. lecticularia* una mayor cercanía genética con la especie *Dipetalogaster maximus* y a *T. sanguisuga* más cercana a *T. dimidiata* y a las especies del complejo *Phyllosoma*. Estos resultados muestran las discrepancias establecidas entre las clasificaciones morfológicas y las genéticas sugiriendo una reevaluación de estos complejos.

Fue posible observar para la especie *R. prolixus*, de origen mexicano un 100% de similitud genética con *R. prolixus* de origen Sudamericano, agrupándose dentro de las especies del mismo complejo *Prolixus*. La clasificación obtenida en el presente trabajo concuerda con los análisis obtenidos con isoenzimas de las mismas especies (Martínez *et al.*, 2005) en el cual, *T. lecticularia* es la especie más cercanamente relacionada a el complejo *Phyllosoma*, seguida por *T. rubida* y por *T. infestans*.

VIII.2. Análisis de las secuencias del citocromo b en especies simpátricas

En esta parte del estudio se analizaron poblaciones simpátricas de las especies del complejo *Phyllosoma* provenientes de las comunidades de Talpa de Allende, Autlan de Navarro y Teocuitatlan de Corona, todas ellas localizadas en el estado de Jalisco. A pesar que desde 1942 Mazzotti y Osorio reportaron la capacidad de las especies del complejo *Phyllosoma* para entrecruzarse de manera experimental dejando descendencia fértil, hasta antes del presente trabajo este fenómeno no habían sido estudios en detalle en condiciones naturales en las diversas comunidades de México. Cabe mencionar que se han reportado a más de una especie en los diferentes estados de la República, con una alta probabilidad de que haya varios sitios donde se pueden entrecruzar especies en simpatría, como en el estado de Jalisco. Por ejemplo en los estados de Guerrero y

Michoacán se han colectado a las especies *T. longipennis*, *T. mazzottii* y *T. pallidipennis* (Vidal-Acosta *et al.*, 2000), en Nayarit *T. longipennis* y *T. picturata* (Cortés-Jiménez *et al.*, 1996; Magallón-Gastélum *et al.*, 1998; Bautista *et al.*, 1999; Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Flores, 2001) y en el estado de Oaxaca se han reportado hasta 4 especies diferentes del complejo *Phyllosoma* (*T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. pallidipennis* y *T. picturata*) (Zárate y Zárate, 1985; Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Ramsey *et al.*, 2000).

Los análisis con las secuencias del *cit b* y los patrones de receptores antenales han mostrado su capacidad como herramientas taxonómicas a nivel de especies y géneros (Martínez *et al.*, 2006; Catalá *et al.*, 2005).

En particular, los análisis realizados con las especies simpátricas mostraron una clara incongruencia entre morfología cualitativa y los análisis genéticos y morfológicos cuantitativos, es decir, individuos clasificados con caracteres morfológicos cualitativos como *T. pallidipennis*, *T. picturata* y *T. longipennis*, se distribuyeron en clados del árbol filogenético diferentes a los esperados. Además la ausencia de diferencias significativas entre los grupos estudiados en los análisis morfológicos muestra la similitud entre las especies que integran el complejo *Phyllosoma*, sugiriendo fuertemente que estas especies son subespecies con variedades cromáticas. Estos resultados indican que aparentemente no se ha establecido una divergencia genética que lleve a la especiación, por lo que no mantienen una barrera reproductiva, además de que se observó una estrecha cercanía genética entre ellas. Estos resultados no sustentan el estatus taxonómico de especie, ya que no cumplen con alguno de los conceptos más importantes para designarlas como tales, dentro de estos conceptos encontramos el biológico, ecológico, filogenético y morfológico, por esta razón proponemos el estatus de subespecie para los integrantes del complejo *Phyllosoma*. Los resultados demuestran que los individuos híbridos productos de entrecruzamiento entre especies diferentes se pueden encontrar en la naturaleza en zonas simpátricas, por lo que el empleo de caracteres morfológicos para clasificar pudiera ser problemático, en especies que se encuentren en simpatria, teniendo la necesidad de emplear más de una herramienta de clasificación. En este caso con las secuencias del *cit b* y las del ITS2 se pudo identificar que los individuos híbridos presentan caracteres genéticos combinados de dos especies (Figura 11).

Estos marcadores muestran que los estudios de individuos en localidades simpátricas en el estado de Jalisco son mezclas de poblaciones producto de entrecruzamiento entre diferentes individuos que viven en proximidades en estas áreas naturales, sugiriendo que las especies del complejo *Phyllosoma* son morfotipos con

variedades cromáticas y genéticas los cuales mantienen la posibilidad natural de entrecruzarse y sobre todo de dejar descendencia fértil (Martínez-Ibarra *et al.*, 2008; Mazzotti y Osorio 1942).

Es importante mencionar que algunas de estas especies con morfotipos intermedios presentan una alta tasa de deformaciones morfológicas, por ejemplo en el caso de las antenas y las alas presentan deformidades asimétricas, es decir, una antena o un ala normal mientras que la otra presenta deformidades. Estos organismos son conocidos como "Fenodesviantes". Aparentemente estos fenómenos no interfieren con la viabilidad de los individuos. No se sabe si estas mutaciones están relacionadas a los modelos de tensión de zonas, donde las formas intermedias son genotípicamente menos aptas que los individuos parentales y las zonas simpátricas son mantenidas a través de un balance entre la selección contra los individuos con estos fenotipos, o si el entrecruzamiento es una fuente de diversificación y una posible especiación reticulada generando nuevas variantes genéticas mejor adaptadas, generando nuevas líneas evolutivas (Pérez *et al.*, 2005; Tauleigne-Gomes y Lefévre, 2005;).

Finalmente, es importante mencionar que hay que tener sumo cuidado con las colectas de los organismos en zonas simpátricas y especialmente de los individuos pertenecientes al complejo *Phyllosoma* colectados en el estado de Jalisco, ya que estas poblaciones pueden ser el resultado de entrecruzamiento, dificultando así la clasificación tradicional morfológica cualitativa, por ello sugerimos ampliamente los estudios detallados ya sea con marcadores morfológicos cuantitativos o los análisis genéticos. Los resultados presentados en este trabajo son un ejemplo de la complejidad taxonómica de las especies del complejo *Phyllosoma* y evidencia las dificultades de clasificación que presenta el género *Triatoma* y que por años ha sido objeto de estudio (Usinger *et al.*, 1944; Lent y Wygodzinsky, 1979; Schofield, 1994; Flores *et al.*, 2001; Bustamante *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2006).

VIII.3. Análisis de secuencias altamente variables del gen del citocromo b

La presencia de pseudogenes y heteroplasmia de genes mitocondriales como el *cit b* son fenómenos que no han sido ampliamente estudiados en insectos y particularmente en triatominos. Este fenómeno es interesante en el caso de los análisis con triatominos porque este marcador molecular ha sido utilizado ampliamente en estudios genéticos y filogenéticos. La presencia de pseudogenes y heteroplasmia son eventos biológicos observados en diferentes organismos ya sea en mamíferos (humanos

y roedores; DeWoody *et al.*, 1999), en aves (Allende *et al.*, 2001), peces (*Tetradon nigroviridis*; Antunes & Ramos, 2005) o en algunos insectos (*Drosophila*; Solignac *et al.*, 1983).

Dado que nuestro grupo ha utilizado al *cit b* como marcador genético para los estudios de pseudogenes y la heteroplasmia nos dimos a la tarea de investigar la presencia en nuestro sistema de estudio. Este análisis contempló el estudio de 6 especies de triatomínicos: *T. dimidiata*, *T. pallidipennis*, *T. mexicana*, *T. longipennis*, *T. picturata* y *T. rubida*.

Para los casos de las especies *T. longipennis*, *T. picturata*, y *T. rubida* se identificó la presencia de heteroplasmia y pseudogenes al clonar y secuenciar más de una clona de un mismo individuo de las diferentes especies. Estos análisis mostraron al menos 4 variantes genéticas del gen del *cit b* identificadas por la presencia de deleciones e inserciones, las tasas mutacionales entre transversiones y transiciones, la proporción de mutaciones en primera, segunda y tercera posición, presencia de codones de paro al realizar la deducción de la proteína, así como el empleo de uso de codones. También revelaron la existencia de dos pseudogenes y al menos una secuencia heteroplásmica para cada una de las especies estudiadas, confirmando los resultados observados en los análisis de Southern blot al detectar más de una variante del *cit b* en el genoma.

En análisis más detallados, empleando la técnica de SSCP, con los amplificadores del PCR del gen del *cit b* usando como templado tanto ADN total y cADN extraídos de los triatomínicos analizados, se pudieron identificar al menos 2 copias heteroplásmicas y al menos 3 pseudogenes nucleares. En el caso particular de la especie *T. dimidiata* se obtuvieron dos secuencias provenientes de cADN del mismo individuo, una de ellas fue la secuencia funcional. En contraste, la otra secuencia presentó mutaciones no sinónimas (serina por leucina y serina por glicina), las cuales no se han reportado en otras secuencias del citocromo b de triatomínicos (e incluso de otras especies de diferentes géneros). Aunque esta secuencia se encuentre en la mitocondria, nuestros análisis nos sugieren que probablemente no es una proteína funcional. Como se sabe la heteroplasmia es un proceso biológico que puede deberse a diferentes procesos, como la fuga y el establecimiento del ADN mitocondrial de origen paterno en el cigoto, coexistiendo con el ADN materno. Este proceso generalmente es debido a defectos del proceso de ubiquitinación (Sutovsky *et al.*, 1999) del ADN paterno cuando el óvulo es fecundado, y ha sido observado cuando dos especies diferentes se entrecruzan, de tal manera que no se ubiquitina el ADN paterno y no hay proceso de degradación de este

ADN. Como observamos en el caso de las especies del complejo *Phyllosoma*, se presentó el proceso de entrecruzamiento, de tal manera que esta pudiera ser una posible explicación de la existencia de secuencias heteroplásmicas que se han fijado a lo largo de la evolución de estas poblaciones.

En el caso de los pseudogenes, estos son secuencias de ADN que no son codificantes y por lo tanto presentan varias mutaciones que impiden que se pueda traducir una proteína. Como fue el caso de las secuencias obtenidas para la especie *T. rubida*, en esta especie se pudieron identificar 2 secuencias con deleciones e inserciones y codones de paro.

En el aspecto filogenético y taxonómico, es importante considerar la existencia de estas secuencias, ya que se pueden llegar a emplear como marcadores para diferenciar especies e inferir relaciones filogenéticas, resultando en una mala interpretación de los datos y por lo tanto en la obtención de hipótesis filogenéticas erróneas.

Ambos fenómenos son importantes tanto biológica como filogenéticamente, debido a que se pudiera inferir el origen de los patrones de herencia de los genes, migraciones poblacionales, e incluso hibridación entre diferentes especies (Coyer *et al.*, 2004).

Estos hallazgos son importantes ya que no se habían reportando ambos fenómenos en una misma especie, además estos resultados abren el campo para explorara cuáles podrían ser las causas de ellos.

IX. CONCLUSIONES

- I. Se planteó la necesidad de reevaluar las categorías taxonómicas conocidas como complejos propuestas por Lent y Wygodzinsky (1979), en particular los complejos *Phyllosoma*, *Dimidiata*, *Protracta* y *Rubrofasciata*. De acuerdo a los resultados genéticos obtenidos se propuso fusionar los complejos *Phyllosoma* y *Dimidiata*, debida a la escasa variación genética existente entre estos grupos, llamándolo complejo *Sanguisuga* debido a que la especie *T. sanguisuga* es filogenéticamente la más antigua según el árbol filogenético y el posible ancestro de este grupo.
- II. Nuestros análisis sugieren que las especies del complejo *Phyllosoma* en particular las especies *T. picturata*, *T. pallidipennis* y *T. longipennis* son subespecies y no especies. Sólo *T. mazzottii*, *T. mexicana* y *T. phyllosoma* debieran considerarse como especies ya que son las únicas con identidad genética propia.
- III. También se propusieron los siguientes cambios: la inclusión de *T. brailovskyi*, *T. recurva*, *T. bassolsae*, *T. gerstaeckeri* y *T. mexicana* a este nuevo complejo. Así como la exclusión de *T. bolivari* de este grupo y posiblemente su inclusión al complejo *Rubrofasciata*.
- IV. Los resultados de este trabajo demostraron la posibilidad de hibridación de las especies del Complejo *Phyllosoma* en hábitat simpátrico. Debido a ello, se propone tener sumo cuidado en la clasificación de los individuos colectados en zonas donde existan especies en simpatría, como es el caso de los estados de Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Oaxaca, donde se han reportado mas de dos especies coexistiendo.
- V. Se determinó la existencia de pseudogenes y heteroplásmia del gen del *cit b* en algunas especies de triatomíneos analizadas, estos resultados indican la necesidad de utilizar más de un marcador molecular para estudios taxonómicos, así como, secuenciar más de una vez a un individuo, para asegurarse de obtener la secuencia codificante.

X. PRODUCTIVIDAD EN EL DOCTORADO

I. Artículos de investigación.

Martínez F., Alejandre-Aguilar R., Moncada Y. H., Espinoza B. 2005. Molecular taxonomic study of Chagas disease vectors from the *Phyllosoma*, *Lecticularia*, and *Rubrofasciata* complexes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **73**(2): 321-325.

Martínez F., Villalobos C., Cevallos A. M., De La Torre P., Laclette J. P., Alejandr -Aguilar R. Espinoza B. 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other (Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCitB sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **41**(2): 279-287.

Tamay-Segovia P., Alejandre-Aguilar R., Martínez F., Villalobos G., Zavala-Diaz de la Serna J. F., de la Torre P., Laclette, Blum-Dominguez S., Espinoza B. 2008. Two *Triatoma dimidiata* (clades of Chagas disease vector) associated to different habitat in southern Mexico and Central America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **78**(3): 472-478.

Martínez, I., Noguera, B., Martínez, F. & Espinoza, B., Microsatellite and mini-exon analysis of mexican *Trypanosoma cruzi* human strains and their susceptibility to Nifurtimox and Benznidazole. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. (Manuscrito Enviado).

II. Capítulo de Libro

Fernando Martínez y Bertha Espinoza. 2007. Diversidad de insectos Hemiptera: Reduviidae en México Capitulo 3. Diversidad biológica de México. Segundo Estudio del País. CONABIO

III. *Memorias en extenso*

Fernando Martínez, Guiehdani Villalobos, Ana-María Cevallos, Patricia De la Torre, Juan-Pedro Laclette, Ricardo Alejandr -Aguilar y Bertha Espinoza. 2006. An alisis filogenético de especies de triatominos de importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad de Chagas: El empleo de ADN Nuclear y Mitocondrial como marcadores moleculares. *Entomol a Mexicana*, **5**(2): 1188-1192.

Fernando Martínez, Ricardo Alejandre-Aguilar, Yolanda Hortelano Moncada, Bertha Espinoza. 2006. Estudio genético poblacional de vectores de la enfermedad de Chagas pertenecientes a los complejos *Phyllosoma*, *Lecticularia* y *Rubrofasciata*. *Entomol a Mexicana*, **5**(2): 1109-1114.

Fernando Martínez, Guiehdani Villalobos, Ana-María Cevallos, Patricia De la Torre, Juan-Pedro Laclette, Ricardo Alejandr -Aguilar y Bertha Espinoza. 2007. Presencia de pseudogenes y eteroplasmia del gen del citocromo B en especies de triatominos (Hemiptera: Reduviidae): Implicaciones filogenéticas y taxonomicas. *Entomol a Mexicana*, **6**(2). 1321-1323.

Guiehdani Villalobos, Fernando Martínez, Patricia De la Torre, Juan-Pedro Laclette y Bertha Espinoza. 2007. Presencia de *Triatoma phyllosoma* (Hemiptera: Reduviidae) en la región del Ismo de Tehuantepec, Oaxaca. *Entomol a Mexicana*, **6**(2). 1324-1326.

IV. *Artículos de divulgación.*

Bertha Espinoza, Fernando Martínez, Guiehdani Villalobos Y Cenia Almazán Marín. 2006. Los Vectores de la Enfermedad de Chagas En México: Importancia epidemiológica, diversidad genética y análisis del proteoma. *Gaceta Biomédicas. UNAM. Año 11, No. 11.*

V. Artículos en preparación

Natural crossbreeding between sympatric species of the *Phyllosoma* complex (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) indicate the existing of one specie with morphologic and genetics variations.

Taxonomic studies of *Triaroma brailovskyi*, *Triatoma bolivari*, *Triatoma gerstaeckeri* and *Triatoma mexicana* and its relationship with others species of triatomines.

Presence of pseudogenes and heteroplasmy in cytochrome b gene in the species of the genera *Triatoma* (Insecta: Hemiptera: Reduviidae).

XI. PERSPECTIVAS

Como ya se mencionó, México es uno de los países con mayor diversidad de vectores triatominos y en la actualidad sólo se han analizado 21 de las 33 especies reportadas, de las cuales sería interesantes analizar a *T. gomeznunezi*, *T. ryckmani* y *T. hegneri* especies endémicas de México, incluidas tentativamente dentro del complejo *Phyllosoma*, para así poder establecer una mejor hipótesis evolutiva y resolver los problemas taxonómicos que presenta este complejo.

En el caso de las especies simpátricas sería interesante realizar un análisis de entrecruzamiento controlado entre todas las especies del complejo *Phyllosoma*, ya que en el presente trabajo sólo se analizaron las especies *T. picturata*, *T. pallidipennis* y *T. longipennis*, con el fin de determinar la dirección evolutiva que está tomando éste importante complejo de especies, así como determinar las características genéticas que se están entremezclando. Para ello, se propone utilizar la técnica de los Análisis de los Fragmentos Polimórficos (AFLPs) que es una técnica más poderosa y más completa que la secuenciación, ya que esta puede analizar el genoma completo de estos individuos.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Alejandre-Aguilar, R., Nogeda-Torres, B., Cortes-Jiménez, M., Galvão, C. & Carrillo, R., 1999. *Triatoma bassolsae* sp. n. from Mexico, with a key to species of *Phyllosoma* complex (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **94**: 353-359.
- Allende, L. M., Rubio, I., Ruíz-del-Valle, V., Guillén, J., Martínez-Laso, J., Lowy, E., Varela, P., Zamora, J., Arnaiz-Villena, A. 2001. The Old World sparrows (genus *Passer*) phylogeography and their relative abundance of nuclear mtDNA pseudogenes. *J Mol Evol*. **53**: 144-154.
- Antunes, A. & Ramos, M. J. 2005. Discovery of a large number of previously unrecognized mitochondrial pseudogenes in fish genomes. *Genomics*. **86**: 708-717.
- Bautista, N. L., García de la Torre, G. S., De Haro Arteaga, I. & Salazar-Schettino, P. M., 1999. Importancia of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a vector of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the state of Morelos, Mexico, and possible ecotopes. *J Med Entomol*. **36**: 233-235.
- Bustamante, D. M., Monroy, C., Menes, M., Rodas, A., Salazar-Schettino, P. M., Rojas G., Pinto, N., Guhl, F. & Dujardin, J. P., 2004. Metric variation among geographic populations of the Chagas vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *J Med Entomol*. **41**: 296-301.
- Barges, M. D. & Mas-Coma, S. 1997. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rADN sequences. *Mol Biol Evol*. **14**: 569-577.
- Barges, M. D., Vigo, M., Horak, P., Dvorak, J., Patzner, R. A., Pointier, J. P., Jackiewicz, M., Meier-Brook, C. & Mas-Coma, S. 2001. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal ADN ITS-2 sequences. *Infect Genet Evol*. **16**: 1-23.
- Barges, M. D., Marcilla, A., Dujardin, J. P. & Mas-Coma, S. 2002. Triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi*: a molecular perspectiva based on nuclear ribosomal ADN markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **96**: 159-164.
- Becerril-Flores, M. A., Rangel-Flores, E., Imbert-Palafox, J. L. , Gómez-Gómez, J. V., Figueroa-Gutiérrez, A. H. 2007. Human infection and risk of transmission of Chagas disease in Hidalgo State, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. **76**: 318-323
- Breniere, S. F., Taveira, B., Bosseno, M. F., Ordoñez, R., Lozano-Kasten, F., Magallón-Gastélum, E., Ouaiissi, A. & Ramsey, J., 2003. Preliminary results of

random amplification of polymorphic ADN among Triatominae of the *Phyllosoma* complex (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **98**: 1033-1038.

- Brenière, S. F., Pietrokovsky, S., Gastélum, E. M., Bosseno, M. F., Soto, M. M., Ouaiissi, A., Kasten, F. L. & Wisnivesky-Colli, C. 2004. Feeding patterns of *Triatoma longipennis* Usinger (Hemiptera, Reduviidae) in peridomestic habitats of a rural community in Jalisco State, Mexico. *J Med Entomol*. **41**: 1015-1020.
- Brenière, S. F., Bosseno, M. F., Magallón-Gastelúm, E., Castillo-Ruvalcaba, E. G., Soto-Gutiérrez, M., Montaña-Luna, E. C., Tejeda-Basulto, J., Mathieu-Daudè, F., Walter A. & Lozano-Kasten F. 2007. Peridomestic colonization of *Triatoma longipennis* (Hemiptera, Reduviidae) and *Triatoma barberi* (Hemiptera, Reduviidae) in a rural community with active transmission of *Trypanosoma cruzi* in Jalisco state, Mexico. *Acta Trop*. **101**: 249-257.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A. & Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial ADN sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J Mol Evol*. **18**: 225-239.
- Bustamante, D. M., Monroy, C., Menes, M., Rodas, A., Salazar-Schettino, P. M., Rojas, G., Pinto, N., Guhl, F. & Dujardin, J. P. 2004. Metric variation among geographic populations of the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) and related species. *J Med Entomol*. **41**: 296-301.
- Carcavallo, R. U., Martínez, A. & Peláez, D. 1987. Una nueva especie de *Triatoma Laporte* de México. *Chagas*. **4**: 476-477.
- Carcavallo, R. U., Jurberg, J., Lent, H., Noireau, F. & Galvão, C. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol vectores*. **7**: 1-99.
- Carbajal de la Fuente, A. L. & Catalá, S., 2002. Relationship between antennal sensilla pattern and habitat in six species of Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **97**: 1121-1125.
- Catala, S. & Schofield, C. J., 1994. The antennal sensilla of *Rodhnius*. *J Morphol*. **219**: 193-203.
- Catala, S., Sachetto, C., Moreno, M., Rosales R., Salazar-Schettino, P. M. & Gorla, D., 2005. Antennal Phenotype of *Triatoma dimidiata* populations and its relationship with species of *Phyllosoma* and *Protracta* Complexes *J Med Entomol*. **42**: 719-725.

- Cohen, J. M., Wilson, M. L., Cruz-Celis, A. & Ramsey, J. M., 2006. Infestation by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) is associated with housing characteristics in rural Mexico. *J Med Entomol.* **43**: 1252-1260.
- Coleman, A. W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.* **19**: 370-375.
- Cortés-Jiménez, M., Noguera-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R., Isita-Tornelli, L. & Ramírez-Moreno, E. 1996. Frequency of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* collected in Cuernavaca City, Morelos, Mexico. *Rev Latinoam Microbiol.* **38**: 115-199.
- Coyer, J. A., Hoarau, G., Stam, W. T., & Olsen, J. L. 2004. Geographically specific heteroplasmy of mitochondrial DNA in the seaweed, *Fucus serratus* (Heterokontophyta: Haeophyceae: Fucales). *Mol Ecol.* **13**: 1323-1326.
- Cruz-Reyes, & Pickering-López, 2007. CHAGAMEX: Base de datos. Instituto de Biología, UNAM.
- De La Merced, S. A. 1987. Chagas disease vectors. Vol. I, II y III Anatomic and physiological aspects, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- DeWoody, J. A, Chesser, R. K, & Baker R. J. 1999. A translocated mitochondrial cytochrome b pseudogene in voles (Rodentia: Microtus). *J Mol Evol.* **48**: 380-382.
- Dotson, E. M., & Beard, C. B. 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Mol Biol.* **10**: 205-215.
- Dorn, P., Monroy, C. & Curtis, A. 2006. *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. *Infect Genet Evol.* **7**: 343-352.
- Dotson, E. M., & Beard, C. B. 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect Mol Biol.* **10**: 205-215.
- Dumontiel, E., Gourbière, S., Barrera-Peréz, M., Rodríguez-Félix, E., Ruiz-Piña, H., Baños-Lopez, O., Ramirez-Sierra, J., Menu, F. & Rabinovich, J. E., 2002. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatán peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* **67**:176-183.

- Dumontiel, E. & Gourbiere, S. 2004. Predicting *Triatoma dimidiata* abundance and infection rate: a risk map for natural transmission of Chagas disease in the Yucatán peninsula of México. *Am J Trop Med Hyg.* **70**: 514-519.
- Esteban, L., Angulo, V. M., Feliciangeli, M. D. & Catalá, S. 2005. Analysis of sensilla patterns of *Rhodnius prolixus* from Colombia and Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **100**: 909-914.
- Enger, K., Ordoñez, R., Wilson, M. & Ramsey, J., 2004. Evaluation of risk factors for rural infestation by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Triatominae), a Mexican vector of Chagas disease. *J Med Entomol.* **41**: 760-767.
- Espinoza-Gómez, F., Maldonado-Gutiérrez, A., Coll-Cardenas, R., Hernández-Suárez, C. M. & Fernández-Salas, I., 2002. Presence of triatominae Hemiptera Reduviidae and risk of transmisión of Chagas disease in Colima Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **97**: 25-30.
- Flores, A. 2001. Tesis de maestría. Principales vectores de la Enfermedad de Chagas en el occidente mexicano: Estudios epidemiológicos y genéticos de poblaciones peridomésticas y domésticas. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Flores, A., Magallón-Gastélum, E., France-Bosseno, M. F., Ordoñez, R., Lozano-Kasten, F., Espinoza B., Ramsey J. & Brenière S. F., 2001. Isoenzyme variability of five principal triatomine vector species of Chagas disease in Mexico. *Infect Genet Evol.* **1**: 21-28.
- Galvão, C., Carcavallo, R., Da Silva Rocha, D. & Jurberg, J., 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic note. *Zootaxa.* **202**: 1-36.
- García, A. L., Carrasco, H. J., Schofield, C. J., Valente, S. A., Frame, I. A., Stothard, R. & Miles M. A., 1998. Random amplification of polymorphic ADN as a tool for taxonomic studies of Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol.* **35**: 38-45.
- García, B. A., Moriyama, E. N. & Powell, J. R., 2001. Mitichondrial ADN sequence of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic Relationships. *J Med Entomol.* **38**: 675-683.

- Goldsmith, R. S., Kagan, I. G., Zarate R. J., Reyes Gonzalez, M. A. & Cedeño Ferreira, J. 1978. Epidemiological studies of Chagas disease in Oaxaca, Mexico. *Bull Pan Am Health Organ.* **12**: 236-250.
- Guarneri, A. A., Pereira, M. H. & Diotaiuti, L., 2000. Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *J Med Entomol.* **37**: 373-379.
- Guzmán-Bracho C., 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends Parasitol.* **17**: 372-376.
- Guzmán-Marín, E., Barrera-Pérez, M. A., Rodríguez-Félix, M. E., Escobedo-Ortegón, F. J. & Zavala-Velázquez, J. E., 1990. Índices entomológicos de *Triatoma dimidiata* en el estado de Yucatán. *Rev Biomed.* **2**: 20-29.
- Guzmán-Marín, E. 1992. Hábitos biológicos de *Triatoma dimidiata* en el estado de Yucatán México. *Rev Biomed.* **3**:125-131.
- Hasegawa, M., Kishino, K., & Yano, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial ADN. *J Mol Evol.* **22**: 160-174.
- Hillis, D. M., Moritz, C., & Mable, B. K., 1996. Molecular Systematics Ed., Sinauer Associates, INC., Estados Unidos.
- Holder, M. & Lewis, P. O., 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat Rev Genet.* **4**: 275-284.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J. P., 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science.* **14**: 2310-2314.
- Hypsa, V., Tietz, D., Zivavy, J., Rigo, R. O., Galvao, C. & Jurberg, J., 2002. Phylogeny and biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) molecular evidence of a new world origin of the Asiatic clade. *Mol Phylogenet Evol.* **23**: 447-457.
- Ingman, M. & Gyllensten, U., 2001. Analysis of the complete human mtADN genome: methodology and inferences for human evolution. *J Heredity.* **92**: 454-461.
- Jiménez, M. L., Llinas, J. & Palacios, C., 2003. Infection rates in *Dipetalogaster maximus* (Reduviidae: Triatominae) by *Trypanosoma cruzi* in the Cape region, Baja California Sur, México. *J Med Entomol.* **40**: 18-21.

- Jurberg, J., Galvão, C., Galindez, I., Carcavallo, R., Segura, C. & Curto de Casas, S., 1996. Distribución geográfica y distribución altitudinal de las especies del género *Triatoma* Laporte, 1932 del norte de América, Centro y Caribe. *Entomol Vector.* **3**: 87-117.
- Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K. & Yonekawa, H., 1995. Elimination of parental mitochondrial ADN in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 4542-4546.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**:150-163.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P., 1979. Revision of de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas disease. *Boll Am Museum Natural His.* **163**: 142-520.
- López-Cárdenas, J., Gonzalez Bravo, F. E., Salazar Schettino, P. M., Gallaga Solorzano, J. C., Ramírez Barba, E., Martínez Mendez, J., Sánchez-Cordero, V., Peterson, A. T. & Ramsey, J. M., 2005. Fine-scale predictions of distributions of Chagas disease vectors in the state of Guanajuato, Mexico. *J Med Entomol.* **42**:1068-1081.
- Lyman, D. F., Monteiro, F. A., Escalante, A. A., Cordon-Rosales, C., Wesson, D. M., Dujardin, J. P. & Beard, C. B., 1999. Mitochondrial ADN sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* **60**: 377-386.
- Magallón-Gastélum, E., Magdaleno-Peñaloza, N. C., Kattain-Duchateau, G., Trujillo-Contreras, F., Lozano-Kasten, F. J., & Hernández-Gutiérrez, R., 1998. Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), en el estado de Jalisco, México. *Rev Biomed.* **9**: 151-157.
- Magallón-Gastélum, E., Lozano-Kasten, F., Flores-Perez, A., Bosseno, A. & Brenière, F., 2001. Sylvatic triatominae of the *Phyllosoma* complex Hemiptera: Reduviidae around the community of Carrillo Puerto Nayarit, Mexico. *J Med Entomol.* **38**: 638-340.
- Magallón-Gastélum, E., Lozano-Kasten, F., Soto-Gutiérrez, M., Flores-Pérez, A., Sánchez B., Espinoza, B., Bosseno, M. F. & Brenière, S. F., 2006. Epidemiological risk for *Trypanosoma cruzi* transmission by species of *Phyllosoma* complex in the occidental part of Mexico. *Acta Trop.* **97**: 331-338.

- Marcilla, A., BARGUES, M. D., Ramsey, J., Magallon-Gastelum, E., Salazar-Schettino, P. M., Abad-Franch, F., Dujardin, J. P., Schofield, C. J. & Mas-Coma, S., 2001. The ITS-2 of the Nuclear rADN as a molecular marker for populations, species, and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol.* **18**: 136-142.
- Marcilla, A., BARGUES, M. D., Abad-Franch, F., Panzera, F., Carcavallo, R. U., Noireau, F., Galvão, C., Jurberg, J., Miles, M. A., Dujardin, J. P. & Mas-Coma, S. 2002. Nuclear rADN ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol.* **1**: 225-235.
- Martínez, A., Carcavallo, R. U. & Jurberg, J., 1994. *Triatoma gomeznunezi* a new species of Triatomini from Mexico (Hemiptera: Reduviidae, Triatominae). *Entomol Vector.* **1**: 15-19.
- Martínez A., Carcavallo, R. U. & Pelaez, D., 1984. *Triatoma brailovskyi*, nueva especie de Triatominae de México. *Chagas.* **1**: 72-75.
- Martínez, F., 2003. Tesis de licenciatura. caracterización de la diversidad genética de insectos transmisores de la enfermedad de chagas en México. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez, F., Alejandre-Aguilar, R., Hortelano-Moncada, Y. & Espinoza, B., 2005. Molecular Taxonomic study of Chagas disease vectors from the Phyllosoma, Lenticularia and Rubrofasciata complexes. *Am J Trop Med Hyg.* **73**: 321-325.
- Martínez, F., Villalobos, G., Cevallos, A. M., de la Torre, P. Lacleite, J. P., Alejandre-Aguilar, R. & Espinoza, B., 2006. Taxonomic study of the *Phyllosoma* complex and other triatomine (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) species of epidemiological importance in the transmission of Chagas disease: using ITS-2 and mtCytB sequences. *Mol Phylogenet Evol.* **41**: 279-287.
- Martínez-Ibarra, J. A., Galavíz-Silva, L., Lara-Campos, C. & Trujillo-García, J. C., 1992. Distribución de los Triatóminos asociados al domicilio humano en el municipio general de Terán, Nuevo León, México. *Southwest Entomol.* **17**: 261-265.
- Martínez-Ibarra, J. A., Bárcenas-Ortega, N. M., Noguera-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R., Lino Rodríguez, M., Magallón-Gastélum, E., López-Martínez, V. & Romero-Nápoles, J. 2001. Role of two *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) species in the transmission of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida:

Trypanosomatidae) to man in the west coast of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **96**: 141-144.

- Martínez-Ibarra, J. A., Novelo-López, M., Hernández-Robles, M. R. & Grant-Guillén, Y. 2003a. Influence of the blood meal source on the biology of *Meccus picturatus* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **98**: 227-232.
- Martínez-Ibarra, J. A., Grant-Guillén, Y. & Martínez-Grant, D. M., 2003b. Feeding, defecation, and development times of *Meccus longipennis* Usinger, 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **98**: 899-903.
- Martínez-Ibarra, J. A., Z. Y. Morales-Corona, A. Rubio-González, M. G. Moreno-Ruiz, R. Del Riego-Ruiz, M. A. Mundo-Barajas & B. Espinoza. 2008. The occurrence of hybrids and laboratory evidence of fertility among three species of the *Meccus phyllosomus* (Heteroptera, Reduviidae) complex in Mexico. *Acta Trop.* (En revision).
- Mazzotti, L., 1940. Triatomídeos de México y su infección natural por *Trypanosoma cruzi* Chagas. *Rev Med Mex.* **20**: 95-109.
- Mazzotti, L. & Osorio, M. T., 1942. Cruzamientos experimentales entre varias especies de Triatomas. *Rev Mex Med* **22**: 215-222
- Miles, M. A., Feliciangeli, A. D. & Rojas de Arias, A. 2003. American tripanosomiasis (Chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *B M J.* **326**: 1444-1448.
- Moffitt, J. E., Venarske, D., Goddard, J., Yates, A. B. & de Shazo, R. D., 2003. Allergic reactions to *Triatoma* bites. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **91**: 122-128.
- Monteiro, F. A., Escalante, A. A. & Beard, C. B., 2001. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends Parasitol.* **17**: 344-347.
- Monteiro, F. A., Donnelly, M., Beard, C. & Costa, J., 2004. Nested clade and phylogeographic analyses of the Chagas disease vector *Triatoma brasiliensis* in Northeast Brazil. *Mol Phylogenet Evol.* **32**: 46-56.
- Page, R. D. M., 1996. An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Com Applic Biol Scien.* **12**: 357-358.
- Pérez, R., Hernández, M., Quintero¹, O., Scvortzoff, E., Canale, D., Méndez, L., Cohanoff, C, Martino, M., & Panzera, F. 2005. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae) *Genetica.* **125**: 261-270

- Paredes, G. E. A., Valdez-Miranda, J., Noguera-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R. & Canett-Romero, R., 2001. Vectorial importance of Triatominae bugs (Hemiptera: Reduviidae) in Guaymas, Mexico. *Rev Latinoam Microbiol.* **43**: 119-122.
- Pérez, R., Hernández, M., Quintero, O., Scvortzoff, E., Canale, D., Méndez, L., Cohanoff, C., Martino, M. & Panzera, F. 2005. Cytogenetic analysis of experimental hybrids in species of Triatominae (Hemiptera-Reduviidae). *Genetica* **125**: 261-270.
- Pfeiler, E., Bitler, B. G., Ramsey, J. M., Palacios-Cardiel, C. & Markow, T. A., 2006. Genetic variation population structure and phylogenetic relationships of *Triatoma rubida* and *Triatoma recurva* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the Sonoran desert, insect vectors of the Chagas disease parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Phyllo Evol.* **41**: 435-446.
- Pinzón Cantarell, J. R., Quintal Áviles, R. & Zavala Velásquez, 1976. La enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán, México. *Salud Pub Mex.* **18**: 999-1003.
- Posada, D. & Crandall, K. A., 1998. Modeltest: testing the model of ADN substitution. *Bioinform.* **14**: 817-818.
- Ramsey, J. M., Ordoñez, R., Cruz-Celis, A., Alvear, AL., Chávez, V., López, R., Pintor, J. R., Gama, F. & Carrillo, S., 2000. Distribution of domestic Triatominae and stratification of Chagas disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Med Vet Entomol.* **14**: 19-30.
- Ramsey, J. M., Alvear, A. L., Ordoñez, R., Muñoz, G., García, A., López, R. & Leyva, R. 2005. Risk factors associated with house infestation by the Chagas disease vector *Triatoma pallidipennis* in Cuernavaca metropolitan area, Mexico. *Med Vet Entomol.* **19**: 219-228.
- Rangel-Flores, H., Sanchez, B., Mendoza-Duarte, J., Barnabé, C., Brenière, F., Ramos, C. & Espinoza, B., 2001. Serological and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg.* **65**: 887-895.
- Ronquis, F. & Huelsenbeck, J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinform.* **19**: 1572-1574.
- Ryckman, R 1962. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North America. *Univ California Publ Ent.* **27**: 93-239.

- Ryckman, R. E. 1984. The Triatominae of north and Central America and west Indies. A checklist with synonymy (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Bull Soc Vec Ecol.* **11**: 209-220.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989 Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory press. Cold Spring Harbor, NY.
- Segura, E. L. & Escobar-Mesa, A., 2005. Grupo de estudios sobre la Enfermedad de Chagas. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en el Estado de Veracruz. *Salud Pub. Mex.* **47**: 201-208.
- Schofield, C. J. 1984. House design and domestic vectors of disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **78**: 285-292.
- Schofield, C. J. 1994. Triatominae: Biología y control. Eurommunica Publications. Uruguay, Montevideo.
- Schofield, C. J., Jannin J. & Salvatella R., 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* **22**: 583-588.
- Solignac, M, Monnerot, M, Mounolou, J. C. 1983. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**: 6942-6946.
- Stothard, J. R., Yamamoto, Y., Cherchi, A., García, A. L., Valente, S. A. S., Schofield, C. J. & Miles, M. A., 1998. A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bull Entomol Res.* **88**: 553-560.
- Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. & Schatten, G., 1999. Ubiquitin tag for sperm Mitochondria. *Nature.* **402**: 371-372.
- Tamay-Segovia, P., Alejandr -Aguilar, R., Martínez, F., Zavala-D as de la Serna, F., De la Torre, P., Laclette, J. P., Blum-Domínguez, & Espinoza, B., 2007. *Am J Trop Med Hyg.* **73**: 472-478.
- Tamura, K. & Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* **10**: 512-526.
- Teixeira, A., Nascimento, R. & Sturm, N., 2006. Evolution and pathology in Chagas disease a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **101**: 463-491.
- Trujillo, F. C., Villanueva, M. A., Soto, M. G., Raygoza, M. A. & Jiménez, A. C., 2000. Seguimiento serológico de infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos

estudiados de 50 municipios del estado de Jalisco, México de 1987 a 1994. *Rev Soc Bras Med Trop.* **33**: 591-596.

- Tauleigne-Gomes, C. & Lefévre, C., 2005. Natural hybridisation between two coastal endemic species of *Armeria* (Plumbaginaceae) from Portugal. *Plan Syst Evol.* **250**: 215-230.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F, Jeanmougin, F. & Higgins, D. G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **24**: 4876-4882.
- Tyler, K. M. & Engman, D. M., 2001. The cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* **31**: 472-481.
- Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J. L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C., Llausás, A., Gutiérrez, G. & Sepúlveda, J., 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública Mex.* **34**: 186-196
- Vidal-Acosta, V., Ibáñez-Bernal, S. & Martínez-Campo, C., 2000. Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Púb Mex.* **42**: 496-503.
- Villalobos, G., 2005. Tesis de licenciatura. Análisis filogenético de especies de triatominos (Hemiptera: Reduviidae) presentes en México. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Usinger, R., 1944. The Triatominae of North and Central America and the West Indies and their public health significance. *Publ Health Bull.* **288**: 1-83.
- Walter, A., Lozano-Kasten, F., Bosseno, M. F., Ruvalcaba, E. G., Gutiérrez, M. S., Luna, C. E., Baunaure, F., Phélinas, P., Magallón-Gastélum, & Brenière, S. F. 2007. Peridomestic habitat and risk factors for *Triatoma* infestation in a rural community of the Mexican occident. *Am J Trop Med Hyg.* **76**: 508-515.
- Wincker, P., Britto, C., Borges Pereira, J., Cardoso, M. A., Oelemann, W. & Morel, M. C. 1994. Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* **51**: 771-777.
- World Health Organization, 2002. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee, Geneva.

- Zárate, L. & Zárate, R. J., 1985. A checklist of the triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. *Int J Entomol.* **27**: 102-127.

XIII. ANEXO

Diseño de oligonucleótidos

Alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos para diferentes vectores de la enfermedad de Chagas empleando el programa Clustal X. Las regiones en oscuras son las zonas usadas para diseñar los oligonucleótidos. A) Secuencia de inicio del gen citocromo b, B) Secuencia final del gen citocromo b (el tamaño del amplificado es de aproximadamente 360 pares de bases.

A)

T. dimidiata 1	AATATCCGCT	ATCCCTTACT	TAGGAAACGA	TTTAGTTAAA	TGATTATGAG
T. dimidiata 2	AATATCCGCT	ATCCCTTACT	TAGGAAACGA	TTTAGTTAAA	TGATTATGAG
T. infestans	TCTATCTGCT	ATTCCATACT	TAGGAAACGA	ACTCGTAAA	TGATTATGGG
T. pallidipennis	AATATCTGCC	ATTCCCTACC	TAGGAAACGA	CCTAGTCAA	TGATTGTGAG
T. protracta	ACTATCCGCG	GTTCCCTATC	TAGGAAACGA	ATTAGTAAA	TGATTATGAG
R. prolixus1	ACTCTCAGCC	GTCCATACT	TAGGAAATGA	ATTAGTTAAA	TGATTATGAG
R. prolixus2	ACTCTCAGCC	GTCCATACT	TAGGAAATGA	ATTAGTTAAA	TGATTATGAG
T. sanguisuga	AATATCTGCC	ATTCCCTACC	TAGGAAACGA	TTTAGTTAAA	TGATTATGAG
T. sordida	CCTATCCGCC	ATCCCATACC	TGGGCAATGA	GCTCGTAAA	TGATTATGAG
Consensus	A TATC GC	AT CC TAC	TAGGAAACGA	TTAGT AAA	TGATTATGAG

B)

T. dimidiata 1	TACATATTCA	ACCAGAATGA	TATTCCTAT	TTGCATATGC	AATTCTACGA
T. dimidiata 2	TACATATTCA	ACCAGAATGA	TATTCCTAT	TTGCATATGC	AATTCTACGA
T. infestans	TTCACATTCA	ACCTGAATGA	TACTTCCTAT	TCGCATAT--	-----
T. pallidipennis	TACATATTCA	ACCAGAATGA	TATTCCTGT	TTGCATAC--	-----
T. protracta	TACACATTCA	ACCTGAATGA	TACTTCCTAT	TTGCATAC--	-----
R. prolixus1	TACATATCCA	GCCAGAATGA	TATTCCTTAT	TCGCCTACGC	TATTTTACGA
R. prolixus2	TACATATCCA	GCCAGAATGA	TATTCCTTAT	TCGCCTAC--	-----
T. sanguisuga	TGCACATTCA	ACCAGAATGA	TACTTCCTAT	TTGCATAC--	-----
T. sordida	TACACATTCA	GCCTGAATGA	TATTCCTTT	TCGCATAT--	-----
Consensus	TACA ATTCA	ACCAGAATGA	TATTCCTAT	T GCATA --	-----

De este alineamiento se obteniendo los siguientes oligonucleótidos degenerados:

Primer directo (24pb) CGA ATT AGT TAA ATG ATG ATT (A+G) TGR GG con una temperatura de alineamiento de 60.1°C.

Primer Reverso (23 pb) TAT GC(A+G) AAT AGG AA(A+G) TAT CAT TC con una temperatura de alineamiento de 53.5°C.