

00551



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

## CARACTERIZACIÓN CITOGÉNICA Y GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Triatoma pallidipennis*

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
ROSALINDA ORDOÑEZ ALCOCER

DIRECTOR DE TESIS: DRA. JANINE RAMSEY W.

CUERNAVACA, MORELOS

2005

m341504



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), bajo la dirección de la Dra. Janine Ramsey.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rosalinda Ordaz  
Alcocer

FECHA: 19-I-05

FIRMA: [Firma manuscrita]

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en forma muy especial a la Dra. Janine Ramsey por la dirección de esta tesis y por permitirme aprender y trabajar con ella en el reconocimiento de la enfermedad de Chagas en nuestro país.

Al Dr. Francisco Panzera y al Dr. Jean Pierre Dujardin por el apoyo técnico y por haberme permitido obtener los conocimientos necesarios para la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Salud Pública por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

A todo el equipo de campo del laboratorio de Patogenicidad Bacteriana por ayudarme a conseguir los especímenes utilizados en la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

Con profundo amor:

A Natalia Angélica y Angel quienes con su amor, ayuda y comprensión me inspiraron y ayudaron a realizar esta meta.

A mis padres quienes con su ejemplo y amor siempre han estado conmigo en todas las etapas de mi vida.

A mis hermanos Domingo, Pedro, Aurea y María Elena quienes siempre han estado conmigo apoyándome y queriéndome.

A mis sobrinos que con su amor me han hecho más fácil el diario vivir.

A mis amigos, por el apoyo y las palabras de aliento recibidas.

## INDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>1. Introducción</b>	2
1.1 Epidemiología	2
1.2 Epidemiología en México	4
1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
1.4 Ciclo evolutivo del parásito en los vectores	9
1.5 Infección y enfermedad de Chagas	12
1.6 Modos de Transmisión	14
1.7 Transmisión vectorial	15
1.8 Taxonomía, sistemática y binomía de triatominos	16
1.9 Triatominos en México	22
1.10 Complejo <i>phyllosoma</i>	23
1.11 Especiación y población	25
1.12 Técnicas para distinguir entre especies y poblaciones	30
1.13 Citogenética	32
1.14 Morfometría	36
1.14.1 Análisis univariado	40
1.14.2 Análisis multivariado (ACP)	41
1.14.3 Análisis discriminante (AD)	42
1.14.4 Dimorfismo sexual y medio ambiente	44
1.15 Control de la transmisión vectorial	45

<b>2. Antecedentes</b>	49
2.1 Conocimiento de capacidad vectorial	49
2.2 <i>Triatoma pallidipennis</i>	49
2.3 Uso de la Citogenética en otros complejos	52
2.4 Uso de la Morfometría en otros complejos	54
<b>3. Justificación</b>	56
<b>4. Objetivos</b>	57
<b>5. Metodología</b>	58
5.1 Definición de Términos	58
5.2 Área de estudio	58
5.3 Material	58
5.4 Obtención de muestras	58
5.5 Técnicas de análisis utilizadas	59
5.5.1 Infectividad con <i>T. cruzi</i>	59
5.5.2 Estudios citogenéticas	59
5.5.2.1 Método de aplastado	59
5.5.2.2 Técnica de bandeó C	61
5.5.3 Morfometría	63
5.5.3.1 Morfometría de cabeza	63
5.5.3.2 Morfometría de alas	65
5.6 Análisis Estadístico	67
5.6.1 Análisis univariado	67
5.6.2 Análisis multivariado	67
5.7 Dimorfismo sexual	68

5.8 Asimetría	68
<b>6. Resultados</b>	<b>69</b>
6.1 Infectividad	69
6.2 Citogenética	70
6.3 Morfometría	73
6.3.1 Precisión y exactitud	73
6.3.2 Perfil de Guillaumin	74
6.3.2.1 Cabezas	74
6.3.2.2 Alas	76
6.4 Análisis multivariado	78
6.5 Análisis discriminante con tamaño excluido	83
6.6 Dimorfismo sexual	85
6.7 Asimetría	86
<b>7. Discusión</b>	<b>88</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>94</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>95</b>



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
Figura 2	Ciclo de vida de <i>T. pallidipennis</i>	18
Figura 3	Influencias en la variación del fenotipo	37
Figura 4	Isometría y alometría	39
Figura 5	Distribución de <i>T. pallidipennis</i>	51
Figura 6	Morfometría de cabeza	64
Figura 7	Morfometría de alas	65
Figura 8	Meiosis de <i>T. pallidipennis</i> macho	72
Figura 9	Perfil de Guillaumin cabeza <i>T. pallidipennis</i> macho	74
Figura 10	Perfil de Guillaumin cabeza <i>T. pallidipennis</i> hembra	75
Figura 11	Perfil de Guillaumin ala derecha <i>T. pallidipennis</i> macho	75
Figura 12	Perfil de Guillaumin ala derecha <i>T. pallidipennis</i> hembra	75
Figura 13	Perfil de Guillaumin ala izquierda <i>T. pallidipennis</i> macho	75
Figura 14	Perfil de Guillaumin ala izquierda <i>T. pallidipennis</i> hembra	75
Figura 15	ACP de <i>T. pallidipennis</i> macho	80
Figura 16	ACP de <i>T. pallidipennis</i> hembra	82
Figura 17	AD de <i>T. pallidipennis</i> macho y hembra	84

## Resumen

La enfermedad de Chagas se encuentra entre las enfermedades parasitarias de mayor impacto social en toda América Latina. Esta enfermedad es transmitida por vectores conocidos como triatominos o chinches. En México, se encuentra el complejo *phyllosoma* en el que se encuentra incluido *T. pallidipennis*, considerado como uno de los vectores más importantes del país.

Debido a la importancia que tiene el eliminar estos vectores del ambiente domiciliario sin tener impacto en el ambiente silvestre se realizó este estudio para saber si existían diferencias citogenéticas y morfométricas correlacionadas con la infectividad entre las poblaciones con hábitat intradomiciliario, peridomiciliario y silvestre de esta especie, que posteriormente pudieran ser aplicables a algún programa de control de vectores.

Mediante estudios citogenéticas se estudiaron gónadas provenientes de 10 triatominos macho de cada hábitat y no se encontraron diferencias entre las 3 poblaciones. De la misma manera se estudiaron 30 triatominos hembra y 30 triatominos macho de cada uno de los hábitat por morfometría; al hacer el análisis estadístico univariado y multivariado de las mediciones de alas y cabeza no se encontraron diferencias significativas entre las 3 poblaciones. Lo mismo ocurrió al realizar la infectividad de todos los individuos de las 3 poblaciones ya que aunque se encontró una tasa de infectividad alta tampoco se encontraron diferencias significativas entre ellas.

En las 3 poblaciones se encontró asimetría de alas de origen genético y muy poca asimetría fluctuante que es la originada por el ambiente lo que nos habla de que probablemente se trata de una especie de domiciliación reciente. Cuando se analiza el dimorfismo sexual en el tamaño total de las 3 poblaciones de la especie estudiada se encuentra que las hembras son más grandes que los machos, pero cuando se analizan solamente las alas se encuentra que el dimorfismo sexual está relacionado con el hábitat de la especie.

Todos estos resultados nos indican que hay un flujo genético continuo entre estas poblaciones, a pesar de que podemos medir pequeñas diferencias en cuanto a tamaño total y dimorfismo sexual en las hembras silvestres.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1 Epidemiología

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas descrita por el doctor Carlos Chagas en 1909, se limita al continente americano, se distribuye entre los paralelos 42 de latitud norte y 45 de latitud sur, y ha sido uno de los principales problemas de salud pública en América Latina, siendo considerada desde 1993 como la enfermedad parasitaria más grave de América. Esta enfermedad es causada por el parásito flagelado conocido como *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). En 1997 se calculó que esta enfermedad afectaba entre 16 y 18 millones de personas en 18 países, que 100 millones de personas estaban en riesgo de infectarse y que se producían 45,000 muertes anuales (1,2). En los últimos años el número de personas infectadas ha disminuido a cerca de 12 millones como resultado de intensas intervenciones de control que se han llevado a cabo en diferentes países de América del Sur (3).

De acuerdo con el Banco Mundial, la enfermedad de Chagas se encuentra entre las enfermedades parasitarias de mayor impacto social negativo en América Latina en término de años potencia de vida perdidos, superando a la malaria y quedando en cuarto lugar entre las enfermedades infecto-infecciosas, apenas superada por las infecciones respiratorias, las diarreicas y el SIDA (4). Este peso médico social se debe básicamente al gran número de individuos infectados y al potencial de morbi-mortalidad de la enfermedad de Chagas, principalmente debida a la forma crónica cardiaca, que incide entre el 10 al 40% de los portadores de la infección (5). La transmisión del parásito se ha ido interrumpiendo en la mayor parte de América del Sur (6), pero la enfermedad sigue siendo endémica en diferentes regiones de México (7).

La enfermedad de Chagas puede ser considerada como el resultado de interacciones ecológicas complejas entre parásitos, mamíferos (huéspedes reservorios) y poblaciones humanas que viven en condiciones de riesgo de contagio. Varios factores pueden favorecer la transmisión del parásito a las personas: factores biológicos (independientes de la actividad humana y relacionados con los parásitos y sus vectores), aspectos bioclimáticos-ecológicos (que determinan la distribución relativa de sus poblaciones) y aspectos socio-ecológicos (dependientes de la intervención humana, como la

colonización de áreas de bosque y la deforestación, los cambios ambientales ligados al desarrollo de algunas actividades económicas, las condiciones socioeconómicas precarias y con higiene doméstica deficiente, que son factores que favorecen la colonización de las casas por triatomíneos), o algunos patrones sociales y culturales. La transmisión de *T. cruzi* por vectores a las personas ocurre cuando los humanos entran a formar parte del ciclo de vida del parásito, generalmente en calidad de huéspedes accidentales (8,9,10,11), es decir es una enfermedad parasitaria de animales silvestres (zoonosis) que es transmitida por especies silvestres de triatomíneos (12). La domesticación de animales silvestres (13) y el disturbio del ambiente silvestre (14) han favorecido la invasión e incrementado la adaptación de algunas especies de triatomíneos a los domicilios humanos, dando como resultado ciclos de transmisión domiciliarios (15).

A partir de la década de los 60 se ha progresado en la lucha antichagásica con la evolución de las técnicas serológicas de diagnóstico, con el surgimiento de nuevos insecticidas, con el desarrollo de estrategias de vigilancia epidemiológica y más recientemente con el surgimiento de terapéutica específica. Así tenemos que se han aplicado las técnicas de inmunofluorescencia, inmunodetección, hemaglutinación indirecta y ELISA para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas y para el diagnóstico parasitológico se está aplicando PCR. A partir de 1977 surgieron los insecticidas piretroides sintéticos con mejor acción "knock-down" y mayor poder residual. Los medicamentos específicos contra *T. cruzi* (nifurtimox y benznidazol) descubiertos en los años 60 y 70 inicialmente mostraron ser activos en la etapa aguda de la infección. En la década de 1990, fueron probadas en casos crónicos en niños, demostrando capacidad de cura en cerca del 60% de los casos, y también revelaron un efecto benéfico en los casos de enfermedad indeterminada, reduciendo el potencial evolutivo de la enfermedad (16).

Algunos países de Latinoamérica han emprendido acciones coordinadas de lucha contra la endemia. Así, en 1991 fue lanzada la Iniciativa Común de los Países del Cono Sur para la eliminación de *Triatoma infestans*, que es el principal vector de la enfermedad en Brasil, Argentina, Uruguay, Paraguay, Chile, Bolivia y el sur de Perú. La estrategia se basó en el empleo de

insecticidas de acción residual prolongada contra poblaciones domésticas de vectores y en la estimulación de la participación de las comunidades afectadas en la detección de nuevos focos de infestación, complementada con el examen serológico de todas las donaciones a bancos de sangre. Estas acciones han dado como resultado que en 1997 Uruguay haya sido certificado como un país libre de transmisión; Chile logró la certificación en 1999; en el año 2000, diez de los doce estados brasileños considerados como endémicos fueron declarados libres de transmisión de *T. cruzi* a personas (17); en el 2001 se interrumpió la transmisión en cuatro provincias de Argentina y en el 2002 en un departamento de Paraguay. La incidencia de la infección en niños y adultos jóvenes se ha reducido en un 72% en los países involucrados en esta iniciativa (18).

Se han llevado a cabo minuciosas evaluaciones sobre la eficiencia de las acciones anti-chagásicas aplicadas por estos países y se ha podido demostrar que las fuertes inversiones realizadas (más de 230 millones de dólares en el período 1991-1997) han dado como resultado un excelente resultado para las economías nacionales (por omitir los beneficios directos para las personas que no se infectaron gracias a las intervenciones de control). Los costos financieros de estas intervenciones son de hecho mínimos en comparación con los que produce la existencia de casos de enfermedad nuevos (19). Según la OMS la enfermedad de Chagas está entrando en una fase de extinción. Si las autoridades mundiales de la salud hacen este pronóstico es gracias al éxito suministrado por la lucha antivectorial. Es esencial obtener una base sólida de conocimientos sobre los insectos vectores del mal de Chagas, que permita reconocer y eliminar a las especies cuyo papel es determinante en la transmisión de esta enfermedad (20).

## **1.2 Epidemiología en México**

En 1940 *Mazzottii* informó por primera vez sobre la enfermedad de Chagas en México (21) y en 1947 se describieron los primeros casos de la enfermedad con comprobación serológica (22). En 1949 el doctor Perrin en un informe personal reportó el primer caso de enfermedad cardíaca producida por *T. cruzi* observada en México (23) y el Dr. Aceves en el Instituto Nacional de

Cardiología informó el primer caso mexicano con cardiopatía chagásica crónica (24). Hasta 1961, solamente se habían informado de 6 casos humanos comprobados parasitológicamente (25). Biagi y Arce Gómez (26) informaron en 1965 de un caso de miocardiopatía con comprobación histológica y en 1976 Rotberg (27) describió otro caso de miocardiopatía chagásica en un enfermo del estado de Guerrero. Hasta 1980 se habían encontrado 142 casos de enfermedad de Chagas en México, algunos con comprobación parasitológica y otros con demostración inmunológica, la mayoría de ellos se encontraron en regiones localizadas en las vertientes del Océano Pacífico, desde el estado de Zacatecas hasta el sur del país (25,28,29). La Secretaría de Salud reportó entre 1989 y 1994 un total de 168 casos de enfermedad de Chagas y 58 defunciones debidas a la enfermedad (30).

La información sobre la prevalencia de la enfermedad de Chagas en México es escasa y la importancia de la enfermedad en la Salud Pública ha permanecido en debate hasta la fecha (31,32,33).

Hay muy pocos datos epidemiológicos disponibles sobre la enfermedad crónica en México. Se han descrito casos aislados en algunos estados (34,35,36,37,38). Entre 1993 y 1998 las autoridades de salud reportaron un total de 441 casos nuevos de cardiomiopatía chagásica crónica (39) y en 2001 Moreno-López (40) en un estudio observacional encontró 16 casos de miocardiopatía chagásica en Tehuantepec, Oaxaca. En 2002 Monteón-Padilla reporta que hay decenas de miles de sujetos con enfermedad crónica y que por lo menos 5,000 de ellos tienen cardiopatía chagásica crónica (41).

En la Encuesta Nacional de Seroepidemiología (ENSE) realizada en 1992, se analizaron 66,678 muestras representativas de todas las entidades federativas del país. Aún cuando la cobertura del estudio para la investigación de esta enfermedad no fue la óptima, los resultados indicaron que la enfermedad de Chagas se presenta irregularmente en todo el territorio nacional y con una prevalencia de 1.6% para una dilución de HAI de 1:8 (38).

Se cree que la prevalencia de infección en donadores de sangre es comparable o mayor que la del resto de los países latinoamericanos. En un estudio realizado en donadores de sangre en un banco de sangre de Jalisco se encontró que 1.28% de los donadores estaban infectados (42).

El estudio más reciente sobre la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en la República Mexicana fue realizado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE), en colaboración con la red de bancos estatales de transfusión sanguínea (CNTS/SSA). Al realizar este estudio en casi 65,000 donadores de sangre provenientes de 18 bancos de transfusión sanguínea, se encontró que el promedio de donadores seropositivos era del 1.5% y que había casos seropositivos en todo el país. La mayor seroprevalencia se encontró en el estado de Hidalgo con 2.2%. Se encontraron diferencias en la prevalencia por estado entre áreas urbanas y rurales (39).

En estudios realizados en los estados de Jalisco y Zacatecas en donde se describieron varios casos clínicos de la enfermedad (32,43), se obtuvo una seroprevalencia del 10%-17%. En comunidades rurales y en área urbana del estado de Morelos la seroprevalencia alcanza valores que van del 1 al 4% (44). En el estado de Oaxaca, la seroprevalencia registrada es del 3.5% pero los estudios en los que se basa esta información no son representativos a nivel de población (45,46). En el valle de Iguala del estado de Guerrero se hizo un estudio en el que se encontró una seroprevalencia del 1.8% (47). A pesar de los diversos estudios que demuestran la importancia de la seroprevalencia y del impacto clínico de la enfermedad en la población, no existen estudios realizados en poblaciones representativas de los diferentes contextos epidemiológicos del país. Parece muy probable que un gran número de casos no hayan sido detectados antes, y por ello el incremento en el número de casos reportados en los últimos años sea un reflejo de una mejor detección y diagnóstico de la enfermedad.

Basándose en los riesgos que existen en las diferentes regiones del país debido a la altitud, temperatura y humedad, y en los datos que se conocen de prevalencia por transfusión sanguínea, se estima que 91 millones de individuos están en riesgo de enfermarse con *T. cruzi* en México y que surgen 69,000 casos nuevos por año (48).

### 1.3 Trypanosoma cruzi

*Trypanosoma cruzi* es un flagelado que tiene la siguiente clasificación taxonómica (49):

Reino: Protista  
Phyllum: Protozoa  
Subphyllum: Sarcomastigophora  
Clase: Zoomastigophora  
Orden: Kinetoplastidae  
Familia: Trypanosomatidae  
Género: Trypanosoma  
Sección: Stercoraria  
Subgénero: Schizotrypanum

El *T. cruzi* en el huésped humano tiene una longitud aproximada de 20  $\mu\text{m}$ , el cuerpo del parásito está limitado por la membrana citoplasmática que tiene de 8-10 nm de espesor y está formada por una bicapa lipídica en donde se encuentra una región especializada conocida como citostoma, por debajo de la membrana se encuentra un citoesqueleto formado principalmente por microtúbulos sub-peliculares, los cuales están unidos entre sí y a la membrana plasmática y a la cisterna del retículo endoplasmático a través de puentes (cuya naturaleza proteica aún no se conoce). El único flagelo que el parásito posee nace del cuerpo basal (cinetosoma) que está situado cerca de la envoltura mitocondrial del cinetoplasto, y surge por el bolsillo flagelar. El aparato de Golgi está ubicado cerca del bolsillo flagelar sin conectarse con el cuerpo basal ni con el flagelo. Se sabe que tienen ribosomas y aparato de Golgi. El núcleo del parásito es de naturaleza fibrilar, se ha observado que en células interfásicas se encuentra el nucleolo en el centro del mismo y la cromatina se presenta en cúmulos adyacentes a la membrana nuclear. Tienen una mitocondria única que se encuentra ramificada y recorre todo su cuerpo, la cual contiene una región especializada bien definida conocida como



cinetoplasto el cual está formado por una porción de DNA extranuclear condensada denominada DNA de cinetoplasto (kDNA) y la doble membrana mitocondrial que lo envuelve y se localiza por debajo de la base del flagelo; este DNA explica más del 30% del DNA total del parásito y está formado por una red de cerca de 20,000 a 30,000 minicírculos estrechamente asociados los cuales codifican para pequeñas guías de RNA que controlan la especificidad del proceso de edición del mRNA formado en los maxicírculos, y por 30 a 40 maxicírculos en los cuales se encuentra el DNA mitocondrial correspondiente a todas las células eucarióticas, este DNA se utiliza por su alta repetitividad para identificar diferentes cepas de *T. cruzi* mediante PCR. Cuentan también con otros organelos conocidos como glicosomas que es donde se encuentran las enzimas involucradas en el camino glicolítico, acidocalcisomas y reservosomas (50,51).

Las poblaciones naturales de *T. cruzi* muestran una gran diversidad genética y fenética. Las cepas difieren en su morfología o estructura antigénica, virulencia, y susceptibilidad al tratamiento específico. Se han hecho intentos para establecer posibles asociaciones entre las diferentes cepas y las formas clínicas de la enfermedad, pero se han obtenido resultados controvertidos. Las técnicas usadas para la caracterización de tal diversidad incluyen caracterización de péptidos, esquizodemos (patrón de fragmentos de DNA obtenidos por acción de enzimas de restricción) y zimodemas (patrón de movilidad electroforética de las enzimas), así como amplificación-hibridación de DNA y análisis molecular como el riboprinting, la amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA (RAPD). Esta metodología ha permitido el reconocimiento de subpoblaciones parasitarias sin que hasta el momento se haya encontrado una correlación con el comportamiento del parásito (52).

*T. cruzi* posee un polimorfismo genético considerable (53). Diferentes estudios llevados a cabo utilizando electroforesis enzimática multilocus han demostrado que las poblaciones naturales de *T. cruzi* tienen una estructura clonal (54), lo que ha llevado a la subdivisión del taxon en 2 linajes principales: *T. cruzi* I y *T. cruzi* II (55,56). Cada linaje es genéticamente heterogéneo.

*T. cruzi* I es el linaje prevaleciente en los ciclos silvestres y además es el que infecta al hombre en la región norte de América del Sur, América Central y América del Norte (57). Este linaje está genéticamente muy diversificado.

Por otro lado, *T. cruzi* II ha sido dividido en 5 subgrupos basándose principalmente en datos provenientes del análisis de marcadores empleando la técnica de RAPD. En dos de estos grupos quedan ubicadas determinadas cepas del ciclo silvestre y las demás cepas que infectan a poblaciones humanas del Cono Sur (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile y Paraguay) (58).

En un estudio realizado en México (59), utilizando la técnica de RAPD, se caracterizaron 56 cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes huéspedes mexicanos con diferentes orígenes geográficos. Los resultados demostraron que el 98% de los aislados pertenecían a *T. cruzi* linaje I. En un estudio llevado a cabo por Espinoza y col (60) se describen aislados de *T. cruzi*, con alta y baja virulencia probados en un modelo de ratón, con diferentes genotipos caracterizados mediante la técnica de polimorfismo de espaciadores de genes de rRNA. Todos estos aislados ahora pueden ser clasificados como *T. cruzi* I, por lo tanto la homogeneidad por RAPD no correlaciona con la heterogeneidad de la virulencia. La relación entre genotipos y características biológicas tales como infectividad y virulencia está aún en debate y no se entiende claramente (61,62,63). Se requiere realizar más estudios sobre los mecanismos de patogenicidad para entender mejor las implicaciones biológicas de la variabilidad entre cepas mexicanas (59).

#### **1.4 Ciclo evolutivo del parásito en los vectores**

El ciclo de vida de *T. cruzi* transcurre entre dos huéspedes: uno vertebrado (mamíferos silvestres, mamíferos domésticos y el hombre) y uno invertebrado (triatominos que son insectos hematófagos de la familia Reduviidae).

*T. cruzi* se desarrolla a través de un ciclo de vida complejo y presenta estadios morfológicamente diferentes que poseen características propias que reflejan su adaptación a los distintos hábitats por los que debe pasar durante su ciclo ontogénico. El epimastigote (20-40 X 2  $\mu\text{m}$ ) es extracelular, tiene forma elongada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo. Este estadio se presenta en el intestino medio del vector y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi*. Este estadio puede ser cultivado con facilidad en el laboratorio. El estadio de amastigote (2-4  $\mu\text{m}$ ) es redondo u ovalado y carece de flagelo libre y es el único estadio intracelular, se reproduce en

células de diferentes tejidos (muscular, nervioso, macrófagos) del organismo infectado y es el causante indirectamente de la patología de la enfermedad de Chagas. El esferomastigote (2-4  $\mu\text{m}$ ) tiene un flagelo extracelular que bordea el cuerpo del parásito y es un estadio replicativo presente en el estómago del insecto vector. El estadio de tripomastigote (20-25 X 2  $\mu\text{m}$ ) tiene forma elongada con el cinetoplasto situado en la parte posterior del núcleo y se observa con una membrana ondulante formada por el flagelo, es extracelular y no replicativo. Este estadio está presente en la circulación en el mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal en el vector (tripomastigote metacíclico) (20).

Los insectos infectados, durante y después de alimentarse con la sangre del mamífero, excretan las formas infectantes del parásito (tripomastigotes metacíclicos) con sus deyecciones. Estas penetran por la mucosa o por escoriaciones de la piel, a veces aprovechando el mismo orificio provocado por la picadura del insecto. La picadura no es dolorosa pero es irritante, por lo que el huésped al rascarse favorece la penetración del parásito. (20).

El contacto inicial entre el tripomastigote (metacíclico o circulante) y la célula hospedera se lleva a cabo por mecanismos de reconocimiento específicos. Las evidencias, en general indirectas, sugieren que el parásito presenta receptores que facilitan su interiorización a la célula (64), de esta manera puede penetrar en cualquier célula nucleada aunque tiene preferencia por los fagocitos y las células musculares. En general los tripomastigotes metacíclicos transmitidos por el insecto se interiorizan en las células fagocíticas locales, lo que da origen a una reacción inflamatoria conocida como "chagoma de inoculación". Una vez ubicado intracelularmente, el parásito se diferencia en amastigote y se duplica constituyendo los denominados "nidos de amastigotes". Después de cierto número de divisiones, que en experimentos *in vitro* se ha determinado son entre 7 y 9, se rompe la célula y los amastigotes se diferencian a tripomastigotes circulantes que son liberados a la circulación. Los mecanismos por los que se desencadena este proceso, así como su diferenciación nuevamente a tripomastigote y liberación por ruptura celular, aún se desconocen. El parásito circulante invade nuevas células, vuelve a multiplicarse en ellas y a diferenciarse a tripomastigote, repitiéndose el ciclo; esto da como resultado una parasitemia persistente. El número de parásitos

El ciclo de vida (Fig 1) de *T. cruzi* continúa cuando un triatomino busca alimento en un mamífero parasitado. Según Brack (66), los parásitos circulantes ingeridos se diferencian a esferomastigotes que se multiplican en el estómago y son los responsables de la persistencia de la infección durante toda la vida del insecto; una parte de los esferomastigotes se diferencian a epimastigotes, que también se multiplican mientras pasan por el tubo digestivo hacia la ampolla rectal y allí una parte se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. La diferenciación a tripomastigotes metacíclicos prepara al parásito para que sobreviva en el medio hostil que encuentra en el suero de los mamíferos. Cuando este insecto vuelve a alimentarse eliminará con las heces al parásito el cual al ingresar en otro mamífero reiniciará el ciclo natural.

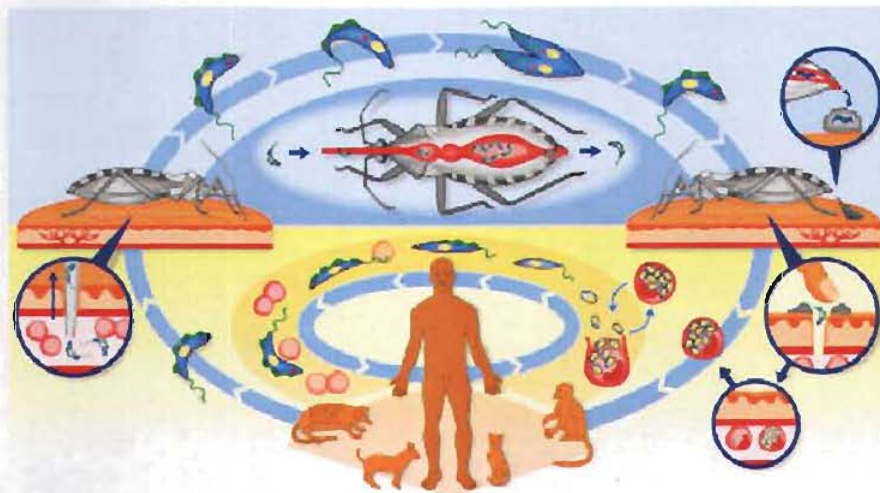


Fig 1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

De acuerdo con lo dicho anteriormente, *T. cruzi* es liberado por el insecto sólo con sus deyecciones, por lo que a esta parasitosis se le denomina de estación posterior. Desde el punto de vista epidemiológico es importante destacar la existencia de otro flagelado que coexiste con *T. cruzi* en muchas áreas: *Trypanosoma rangeli*. Este parásito no es patógeno para el hombre ni para animales silvestres o domésticos, pero si para los triatominos. Como es

factible encontrar insectos infectados con cualquiera de las dos especies es indispensable poder diferenciarlas (67).

*Trypanosoma rangeli* pertenece al género: Trypanosoma, sector Stercoraria, subgénero Herpetosoma. Está incluido en este subgénero porque tiene una morfología similar a los demás miembros que pertenecen al mismo. Además, no obstante que los tripomastigotes metacíclicos eventualmente se asocian con las glándulas salivales del vector invertebrado, su desarrollo prosigue en la estación posterior. *T. rangeli* fue descrito por primera vez en el huésped invertebrado y no en el huésped vertebrado. Se ha reportado que parasita a humanos, perros y monos, pero no es patógeno en estos huéspedes. No obstante se ha visto que es altamente patógeno en el huésped invertebrado *Rhodnius prolixus*. (68)

La característica distintiva más importante del *T. rangeli* es su habilidad para invadir la hemolinfa y las glándulas salivales de los triatominos y transmitir la infección por inoculación al huésped vertebrado (estación anterior). En los mamíferos, la infección por *T. rangeli* se caracteriza por tener una gran variedad de huéspedes, falta de patogenicidad, es de corta duración, hay desconocimiento de la existencia de una fase reproductiva del parásito e incapacidad para proteger al insecto contra la infección por *T. cruzi* (67)

### **1.5 Infección y Enfermedad de Chagas.**

Es importante diferenciar entre infección y enfermedad. Estudios efectuados en Sudamérica indican que del 30% al 40% de los pacientes infectados desarrollan una enfermedad chagásica crónica (cardiomiopatía o megasíndromes). En 1998 el Ministerio de Salud y Acción Social de Argentina consideró a la "fase indeterminada y a la fase aguda de la enfermedad como equivalente a la de infección chagásica". Mientras que la fase crónica fue considerada como enfermedad chagásica crónica con manifestaciones orgánicas (69).

Hay tres etapas principales de la enfermedad de Chagas en los humanos (70). La etapa aguda que aparece poco después de la infección y se caracteriza porque el paciente tiene una alta parasitemia y una respuesta inflamatoria general (fiebre, dolor de cabeza, edema periférico, signo de

Romaña) de intensidad variable. La mayor parte de los pacientes no recuerdan la fase aguda de la enfermedad ya que pasa como una enfermedad febril común. La fase aguda generalmente ocurre durante los primeros años de vida en las zonas endémicas, y provoca una mortalidad cercana al 15% por miocarditis o meningoencefalitis. No hay resistencia natural en el ser humano, pero en 3 ó 4 semanas después de que se inició se encuentran anticuerpos en el suero que protegen de la infección, aunque aparentemente no modifican el curso de la enfermedad en el individuo ya infectado. En esta etapa también existe hipersensibilidad tardía (71).

Al terminar la fase aguda, el enfermo queda asintomático y el número de parásitos circulante puede ser insignificante. A partir de este momento la infección entra en el período indeterminado. Después de 5 a 40 años, durante los cuales el sistema inmune parece ser capaz de reducir los tripomastigotes a niveles por debajo de los detectables con el microscopio, en la mayoría de los casos no vuelve a causar problemas. Sin embargo, por razones aún desconocidas, en un 30 a 40% de los pacientes infectados se desarrolla daño tisular en el corazón, esófago o colon (71). Durante la fase crónica de la enfermedad ocurre la destrucción lenta de las células infectadas por la forma de amastigote del parásito (72). Las células blanco primarias son las del corazón y en menor grado las del esófago, intestino y tejido nervioso, y los signos clínicos de miocarditis generalmente aparecen en pacientes con edad entre 30-50 años. La cardiopatía chagásica se manifiesta por una miocardiopatía dilatada, daño al tejido nervioso e incluye típicamente un bloqueo aurículo-ventricular completo. Con relativa frecuencia se presenta una trombosis intracavitaria y aneurisma ventricular. El diagnóstico de esta fase depende de los datos epidemiológicos que se tengan sobre exposición del paciente al parásito, de los datos clínicos compatibles con la enfermedad de Chagas y de la comprobación de la infección, ya sea por xenodiagnóstico (de baja sensibilidad pero específico), o por serología, que muestra los anticuerpos específicos anti-*T.cruzi* en una alta proporción de los casos (71). Una reacción autoinmune se ha asociado también con el desarrollo de la enfermedad, aunque la importancia de este hecho en el desarrollo de la enfermedad aún se debate (73,74). Esto se debe a la reacción cruzada con antígenos compartidos

entre el tejido del corazón y *T. cruzi* (75,76,77). La fase crónica de la enfermedad incapacita al paciente y finalmente lo lleva a fallas cardíacas.

Los principales medicamentos usados para el tratamiento terapéutico son nitrofuranos y nitroimidazoles. Su eficacia está limitada principalmente a la fase aguda de la infección en la que se ha encontrado hasta un 70% de eficacia para volver negativas las pruebas serológicas. Debido a que son altamente mutagénicos y causan importantes efectos colaterales se están desarrollando actualmente medicamentos nuevos y algunos parecen ser prometedores. Las vacunas contra la fase crónica todavía están muy lejos de poderse desarrollar, aún cuando se ha hecho una gran cantidad de investigación que ha permitido un mejor entendimiento del mecanismo inmune de la infección y que han probado que el desarrollo de una vacuna es posible (78,79).

## 1.6 Modos de Transmisión

La vía más importante de infección chagásica es la entomológica (80). La transmisión natural de la infección al hombre ocurre cuando las personas entran en contacto con las heces de triatominos contaminados y se introduce *T. cruzi* a través de lesiones, las mucosas o por la conjuntiva. Los factores involucrados en la eficiencia vectorial de las diferentes especies de triatominos incluyen su capacidad para invadir y colonizar los domicilios, así como sus hábitos de alimentación (frecuencia de picaduras a humanos y antropofilia), lapso de tiempo entre inicio de la picadura y defecación, resistencia al ayuno, cantidad de sangre ingerida en cada toma, infectividad y metacicloogénesis (cantidad absoluta y relativa de tripomastigotes metacíclicos en las heces del insecto), longevidad de los insectos, distribución relativa de las poblaciones de vectores, parásitos y reservorios mamíferos (más la susceptibilidad de estos huéspedes al parásito y los niveles y duración de la parasitemia), etc. (19). Los factores de crecimiento y migración de las poblaciones humanas han ido consolidando ésta vía y generando las otras vías representadas por la transmisión a través de transfusión de sangre que es la segunda causa de infección y que representa entre el 12 al 20% de la población infectada (81). Esta vía es de gran importancia en áreas urbanas en donde los vectores triatominos están ausentes, por lo que el control serológico de las donaciones a

bancos de sangre es un complemento necesario en cualquier programa de control de vectores (82,83). Otra vía probable de infección es la transplacentaria. La infección del producto puede producirse durante la vida intrauterina o en el momento del parto. En general esta modalidad de infección afecta a menos del 3% de los hijos de madres chagásicas. El desarrollo de tecnología médica nueva, como por ejemplo, los trasplantes de órganos, donde la colonización del receptor se ve favorecida por la inmunosupresión terapéutica, ha originado nuevos mecanismos de transmisión. Estas últimas fuentes de transmisión son controlables si se realiza el diagnóstico serológico de las muestras de sangre transfusional y de los donadores de órganos (16,84,85).

### 1.7 Transmisión vectorial

El mecanismo más frecuente de transmisión de *T. cruzi* al hombre es el vectorial. La distribución de la parasitosis se traslapa al área de distribución de su vector y de la zoonosis, y en ciertas zonas se asocia a factores socio-económicos como la densidad de la población y características de la urbanización que favorecen la domiciliación de los triatominos.

El parásito en su transmisión natural presenta un ciclo silvestre y otro domiciliario. En ambos participan insectos hematófagos de la familia Reduviidae (huésped intermediario o vector) y mamíferos (huésped definitivo). Las diferencias entre estos ciclos radican en las especies de reduvidos y de mamíferos que intervienen y en los nichos ecológicos de ambos. En el ciclo silvestre la transmisión se realiza entre triatominos y animales silvestres que actúan como reservorios, entre los que destacan la comadreja, el tlacuache, el ratón y el armadillo (12,20,86). Estos focos silvestres eran quizás los únicos que existían antiguamente, hasta que el hombre invadió este ámbito y alteró el equilibrio ecológico y ya que los insectos tenían que buscar alimento para subsistir invadieron la vivienda humana dando así origen al ciclo domiciliario. Este ciclo es cada vez más importante, debido a la importancia que tiene la enfermedad de Chagas en la Salud Pública, y en este participan el hombre y animales domésticos como el perro, el gato, animales agropecuarios, además de los triatominos domiciliados (87).



Entre las especies domiciliadas una de las fuentes de infección preferida con la que cuentan es el hombre. Esto unido a que el triatomo puede infectarse y transmitir la infección con *T. cruzi* desde que es ninfa de primer estadio hasta que llega a ser adulto, a que una vez infectado permanece así de por vida y a que tanto machos como hembras son hematófagos hace que los triatomos sean eficientes transmisores de este parásito al hombre. En las heces de los insectos pueden encontrarse parásitos desde pocos días después de una ingesta de sangre parasitada, pero es entre 20 y 30 días después cuando se encuentra el mayor número de parásitos. Estos insectos no transmiten la infección a su descendencia por lo que los huevos están siempre libres de *T. cruzi* (20).

### 1.8 Taxonomía, sistemática y binomía de triatomos

Los triatomos constituyen un grupo de insectos conocidos en el continente con los nombres de vinchuca, pito, barbeiro, chinche voladora, chinche besucona, entre otros. Son hematófagos, se alimentan habitualmente de noche y su picadura es indolora. Se pueden clasificar de la siguiente manera (88):

Reino: Animalia

Phyllum: Artropoda

Clase: Insecta

Orden: Hemíptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Géneros: *Triatoma*, *Panstrongylus*, *Rhodnius*, *Cavernicola*, *Torrealbaia*, *Psammolestes*, *Paratriatoma*, etc.

Las características morfológicas que permiten situar a los Heterópteros en la familia Reduviidae son: la inserción lateral de sus antenas, que normalmente tienen 4 segmentos y son filiformes, un rostro o proboscide con 3 segmentos que no se extiende más allá del prosterno, la presencia casi constante del canal estridulatorio, un cuello bien diferenciado y la presencia de glándulas de Brindley (89).

Todos los Hemípteros Heterópteros se alimentan mediante la succión de líquidos orgánicos (89). La mayoría de los hemípteros son fitófagos. Sin embargo, la familia Reduviidae agrupa también a otros dos tipos de insectos: un depredador que se alimenta de insectos, y otro estrictamente hematófago (los Triatominae) (88).

Los Triatominae son insectos alados o ápteros (dependiendo del estadio en el que se encuentren), aplanados dorsoventralmente, tienen un aparato bucal suctopizador y patas caminadoras, son ovíparos, y su metamorfosis es incompleta o gradual. Presentan una cabeza pequeña que posee ojos compuestos y ocelos, una trompa y antenas. Las antenas se presentan por delante de los ojos y su forma de implantación permite la caracterización de los géneros de triatominos (12).

Usinger (90) presentó una hipótesis filogenética de los Triatominae, agrupándolos en cuatro tribus. Dentro de la tribu Triatomini reconocida por la presencia de tubérculos ocelares postero-laterales y clípeo adelgazado hacia el ápice, características que pueden considerarse apomórficas, se encuentra el género *Triatoma* caracterizado a su vez por tener la cabeza larga y subcilíndrica y el escudete sin tubérculos basales y espina terminal roma. En el mismo trabajo dividió el género en grupos de especies basándose en las características de los adultos como son el tamaño de los adultos, presencia o ausencia de pelos revistiendo el cuerpo, y en el caso de tenerlos si son erectos o están pegados a la superficie, el tamaño del primer artejo antenal, el tamaño y la forma de la espina escutelar, grado de aplanamiento de la superficie ventral del abdomen y presencia o ausencia de la fossa tibial.

Posteriormente, Lent y Wygodzinsky (12) dividieron a *Triatoma* en grupos y subgrupos de especies, empleando algunas características de las ninfas de primero y de quinto estadios de desarrollo, y en menor proporción de los adultos. A las especies que tenían una gran cantidad de similitudes morfológicas las constituyeron en complejos. Sin embargo, debido a la carencia de ejemplares juveniles, muchas especies fueron agrupadas provisionalmente en estos grupos, basándose principalmente en la similitud de las formas adultas y en su distribución geográfica. El conocimiento del semaforonte (es el individuo en un momento dado que es específico y especial en su trayectoria de vida) de varias de estas especies no ha progresado hasta la fecha, por lo

que el agrupamiento de especies al interior del género continúa siendo poco robusto.

Los triatomínos tienen un ciclo de vida en el que pasan desde huevo por cinco estadios ninfales hasta llegar al estado adulto como hembra o macho (Fig 2). Los huevos ovoides y operculados suelen ser blancos o rosados, a menudo tornándose más oscuros a medida que el embrión se desarrolla. Las especies arbóreas, como *Rhodnius prolixus*, suelen adherir sus huevos al sustrato, a veces en pequeños grupos, lo que contribuye a protegerlos, mientras que las que ocupan hábitats terrestres suelen depositar huevos sueltos, uno o dos a la vez. La oviposición tiene una periodicidad circadiana y generalmente empieza a los 10-20 días después de la primera cópula. Las hembras no apareadas pueden depositar algunos huevos infértiles. Ordinariamente sin embargo, las chinches hembras copulan varias veces y pueden retener el esperma durante un período prolongado. Cada hembra puede depositar de 100 a 600 huevos durante su vida adulta de 3-12 meses, según la especie y la cantidad de sangre ingerida. Los huevos se depositan individualmente o en grupos, unos cuantos a la vez, y por lo general eclosionan al cabo de 10-40 días, según la especie y la temperatura. Las ninfas recién emergidas son blandas, de color rosado, pero su cutícula no tarda en endurecerse y oscurecerse; estas ninfas están listas para su primera comida de sangre a los 2 ó 3 días después de la eclosión pero pueden sobrevivir sin alimentarse por varias semanas si no disponen de huésped (91).



Fig. 2 Ciclo de vida de *T. pallidipennis*

Las ninfas suelen alimentarse de los mismos huéspedes que los adultos. En buenas condiciones, cada ninfa toma aproximadamente 8-9 veces su propio peso de sangre, mientras que los adultos suelen tomar 2-4 veces su propio peso. Las ninfas de quinto estadio suelen tomar la mayor cantidad de sangre, entre 200 y 1000 mg en el caso de las especies asociadas con el hombre. A veces una sola comida de sangre hasta la repleción basta para iniciar la muda hasta el próximo estadio. Sin embargo, la mayoría de las especies tardan 10-20 minutos en alimentarse hasta la repleción y los movimientos del huésped las molestan fácilmente, por lo tanto es más normal que cada ninfa tome varias comidas más pequeñas entre mudas sucesivas (91).

Actualmente, la familia de los reducidos subfamilia Triatominae se ha dividido en 5 tribus: Triatomini, Rhodniini, Cavernicolini, Bolboderini y Alberprosenini, 17 géneros y 130 especies, solamente el género *Linshcosteus distant*, 1904 no se encuentra en América (20).

En tres de estos géneros se encuentran la mayor parte de las especies que actúan como vectores de *T. cruzi* y son 13 especies que pertenecen al género *Rhodnius*, 13 al género *Panstrongylus* y 72 especies al género *Triatoma*. Estas especies constituyen complejos específicos (20,92).

Estas tribus con excepción de los Triatomini son consideradas como grupos monofiléticos, basándose en caracteres morfológicos. En contraste, los Triatomini se consideran como parafilético, definiéndose esto por un carácter simpliomórfico (12). Se han usado recientemente técnicas moleculares para llevar a cabo estudios básicos en los triatominos. No obstante que el análisis genético de los mismos se inició con la citogenética a principios del siglo XX (93), si se compara con otro grupo de vectores como los mosquitos, la sistemática molecular de los triatominos está aún en la infancia. En forma tradicional las aloenzimas ha sido el método de elección para el estudio de la sistemática molecular de los triatominos. Recientemente se han usado métodos basados en el estudio del DNA tales como el RAPD, el SSCP (polimorfismo conformacional de una sola banda) y la secuenciación del DNA los cuales han tenido un impacto considerable en el campo. Lyman y col (94) utilizaron herramientas moleculares para confirmar que *Triatoma* no es un grupo monofilético. También demostraron que se debe incluir *Psammolestes* dentro del género *Rhodnius* (15).

El primer registro de triatominos en América data del año 1590, cuando el religioso Lizarraga los describe en su viaje a la Argentina, en la provincia de Tucumán. Carlos Darwin se refiere a los triatominos cuando narra su pasaje por América del Sur, en su viaje alrededor del mundo.

En América se distribuyen la gran mayoría de las especies de triatominos desde los grandes lagos en Estados Unidos (paralelo 40 latitud norte), hasta el sur de Argentina (paralelo 46 de latitud sur). Esto señala al continente americano como centro de origen y diversidad de estos insectos (13), aunque las especies del viejo mundo pudieron desarrollarse por evolución paralela a partir de ancestros reducidos similares. Existen solo 13 especies de triatominos fuera de América: el género *Linshcosteus* (Distant, 1904) con cinco especies confinado a la India; siete especies de *Triatoma* (Laporte, 1832), se encuentran solamente en el sureste de Asia y Australia, y una especie, *Triatoma rubrofasciata* (De Geer, 1773) se encuentra distribuida en puertos tropicales asociada con ratas. La extensa distribución de esta especie se puede explicar mediante el transporte de la misma en los barcos, durante los siglos XVII hasta cerca del siglo XX; Ryckman y Archbold (95) sugieren que esta especie se originó en la India, aunque también podría haberse originado en América, específicamente en el noreste de Brasil donde se halla ampliamente distribuida.

Inicialmente los triatominos vivían en ecotopos silvestres. Varios tipos de hábitats silvestres son conocidos como ecotopos naturales de estos insectos: palmeras, nidos de aves, grutas de piedras, troncos de árboles, y se caracterizan por tener siempre cerca un mamífero como fuente de alimentación. Este grupo de insectos muestra variaciones graduales en cuanto a su capacidad de adaptación al ambiente doméstico (viviendas humanas) y peridoméstico (gallineros, corrales, patios, etc.) La mayoría de las especies continúan en el hábitat silvestre mientras unas pocas se han domiciliado. Zeledón (96) ha clasificado a estos insectos en diferentes grupos de acuerdo a su hábitat y capacidad de domiciliación:

- a) Especies silvestres con huéspedes y hábitats muy específicos que difícilmente se adaptarían a la vivienda humana (ambiente sinantrópico). Por ejemplo: *Cavernicola pilosa* (Barber, 1983) que se encuentra invariablemente asociada a murciélagos.

- b) Especies silvestres con hábitats especializados aunque los adultos son ocasionalmente encontrados en las casas, a menudo atraídos por la luz. Por ejemplo: *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811).
- c) Especies silvestres con ecotopos más generales, que ocasionalmente colonizan casas o peridomicilios. Ej. *T. rubrovaria* (Blanchard, 1843) y *T. platensis* (Neiva, 1913). Son insectos que, siendo totalmente silvestres, han iniciado más recientemente un proceso de adaptación al domicilio humano, encontrándose pequeños grupos de ellos en las casas o sus alrededores y que incluyen tanto ninfas como adultos.
- d) Especies que han retenido ecotopos silvestres pero están también comúnmente asociadas con el ambiente domiciliario. Ej: *T. sordida* (Stal, 1859), *T. pallidipennis*, *T. dimidiata*. Son insectos adaptados o aún en proceso de adaptación al domicilio humano. Los insectos de este grupo no llegan a altas densidades de población en las casas presentando, además, variados y numerosos ecotopos naturales que les permite vivir en condiciones silvestres.
- e) Especies altamente adaptadas al ambiente domiciliario, como *T. infestans* (Klug, 1834), restringidas al domicilio humano y sus anexos. Son insectos exitosamente adaptados al domicilio y peridomicilio humanos. Pueden alcanzar altas densidades de población en las casas que llegan a ser, a veces de varios miles de individuos.

La categoría (a) muestra especies que se han adaptado a hábitats estables dentro del ambiente silvestre, mientras que la categoría (e) muestra especies que se han adaptado al medio ambiente domiciliario que tiende a ser el hábitat más estable a través del tiempo, ofreciendo alimentación, protección a climas extremos y a depredadores. La combinación de estos factores permite una menor mortalidad, tasas de reproducción mayores, alta densidad de población y la tendencia hacia una variabilidad genética reducida. Esta buena asociación con el huésped le ha permitido al vector la dispersión en áreas donde no podría sobrevivir bajo otras condiciones (13).

La categoría a la que una especie pertenece indica el valor que como transmisor de *T. cruzi* le corresponde: el último grupo está formado por especies con alto significado epidemiológico como vectores de la enfermedad de Chagas mientras que el primer grupo está formado por especies

exclusivamente silvestres que tienen importancia en el ciclo enzoótico de la parasitosis.

Las características de la vivienda y el peridomicilio están directamente relacionadas con la mayor o menor probabilidad de domiciliación del triatomo. La transición de cualquier especie del ámbito silvestre al doméstico es invariablemente un fenómeno lento que puede resultar en adaptaciones genéticas y/o fenotípicas y estas adaptaciones pueden ser cuantificadas a través de la morfometría (97,98), o marcadores citogenéticos (99). Este nivel de evolución de población ha sido estudiado recientemente en algunas especies de triatomos y se ha observado que el tamaño total del DNA de poblaciones silvestres es mayor que el de las poblaciones domiciliarias de la misma especie (20).

## 1.9 Triatomos en México

En México se ha reportado que existen 29 especies autóctonas de triatomos distribuidas en todo el país (Tabla1), de estas 20 se han encontrado infectadas de manera natural con *T. cruzi* (46,100,101,102).

Los principales vectores que son responsables de la transmisión de *T. cruzi* en México pertenecen a los complejos *protracta* (del grupo *protracta*) y al complejo *phyllosoma* (del grupo *rubrofasciata*). Dentro del grupo *protracta* tenemos a *T. barberi*, *T. neotomae*, *T. protracta*, *T. nítida*, *T. peninsularis* y *T. sinaloenses*. *T. barberi* es una especie muy importante por su distribución y por encontrarse poblaciones intradomiciliarias y silvestres, se encuentra relacionada con viviendas construidas con adobe o paredes sin repillado lo que esta relacionado con las condiciones tradicionales de construcción en México. Las otras especies del complejo *protracta* tienen menor importancia en la transmisión de la enfermedad en el país. Entre las especies del complejo *phyllosoma* existen 6 que son de importancia médica para el país por su distribución y grado de infectividad que poseen: *Triatoma longipennis*, *Triatoma mazzottii*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma picturata*, y *Triatoma mexicana*. Otra especie importante por su distribución y la gran adaptación que tiene a la vivienda humana es *Triatoma dimidata*, no obstante que se ha asignado al complejo *phyllosoma*, se ha visto mediante estudios

moleculares que tiene características propias que la hacen diferente. Existen otras 4 especies con poca importancia epidemiológica asignadas tentativamente al complejo *phyllosoma* por Lent (12) y son *Triatoma bolivari*, *Triatoma brailovskyi*, *Triatoma hegneri* y *Triatoma ryckmani* (103).

La prevalencia de infección por *T. cruzi* en estas especies va desde 16-18% para *T. dimidiata* domiciliaria en Yucatán (104); 33% para *T. barberi*, 50% para *T. mazzottii* y 18% para *T. longipennis* en Jalisco (105); de 70-92% para *T. barberi* y del 50-90% para *T. pallidipennis* en Morelos (100,106,107); 33.9% para *T. mazzottii*, 24.4% para *T. barberi*, 27.2% para *T. phyllosoma* y 3.7% para *T. dimidiata* en Oaxaca (102).

Se han encontrado numerosas localidades con transmisores, y prácticamente se han encontrado triatominos infectados en casi todos los estados de la República Mexicana, aunque la mayor parte de las localidades se encuentran en la vertiente del Pacífico y en altitudes de 0-1800 m sobre el nivel del mar, lo que hace suponer que la zona endémica de enfermedad de Chagas es muy amplia, casi dos terceras partes del territorio nacional (25).

En México se han identificado diferentes reservorios silvestres entre los que se encuentran *Didelphys marsupiales* (tlacuache), *Dasybus novecinctus mexicanus* (armadillo), *Canis familiaris* (perro), *Rattus norvegicus* (rata noruega), *Mus musculus* (ratón), *Sciurus vulgaris* (ardilla), siendo algunos de ellos específicos de México (25). La seroprevalencia de infección a *T. cruzi* en estos reservorios se ha reportado que varía entre 8% a 62%, de acuerdo a la especie y a la región (108,109,110). **Ojo quitar**

### **1.10 Complejo *phyllosoma***

El complejo *phyllosoma* pertenece al género *Triatoma* subgrupo Rubrofasciata, este complejo es un ensamblaje de especies de triatominos grandes distribuidas solamente en México (principalmente en la Costa Central del Pacífico y noroeste del país), en áreas con climas tropicales y subtropicales (111). Los adultos presentan un abdomen muy ancho (poco usual en los triatominos) y tubérculos torácicos prominentes y conspicuos (12). El reconocimiento y diferenciación de los miembros de este grupo (especialmente



en la etapa de ninfa) es frecuentemente difícil y su status taxonómico es conflictivo.

Hasta 1941 (112), se consideraba que este complejo estaba formado por siete especies: *T. intermedia*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma*, *T. picturata* y *T. usingeri*. Usinger (91) consideró al grupo como un complejo y redujo estas especies al rango de subespecies tomando a *phyllosoma* como la especie nominal. Lent y Wygodzinsky (12) sinonimizaron a *T. intermedia* y *T. usingeri* con *T. longipennis* y así reconocieron a 7 especies en este complejo: *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. pallidipennis*, *T. mexicana* y *T. dimidiata* (*T. mexicana* la incluyeron porque la hembra tiene un abdomen amplio como las demás especies del complejo aunque el macho no lo tiene y en ese momento no conocían a las ninfas de esta especie y a *T. dimidiata* porque dicen que superficialmente se parece a las especies del complejo). Posteriormente Schofield (13) incluyó a *T. dimidiata* en este complejo. Recientemente se describió a *T. bassolsae* como una especie nueva (113) y se incluyó dentro de este complejo. Dujardin (20) ha sugerido la incorporación de otras 6 especies en este grupo: *T. bolivari*, *T. brailowskyi*, *T. dimidiata*, *T. hegneri*, *T. mexicana* y *T. ryckmani*.

Las especies del complejo *phyllosoma* tienden a ser muy parecidas y su identificación, que generalmente se basa en morfología (incluyendo la genitalia masculina) (12). El examen de un gran número de individuos ha mostrado una gran sobreposición entre características morfológicas claves. Por esta razón la distribución de muchas de las especies no ha podido ser claramente definida y en consecuencia es difícil determinar su significado epidemiológico.

El problema taxonómico que presenta este complejo es con respecto a la determinación de especies/subespecies de sus miembros (12,91). Algunas de estas especies son capaces de llevar a cabo cruces entre ellas como lo demostró Mazzottii (114), quién al hacer cruces entre *T. phyllosoma*, *T. pallidipennis*, *T. picturata*, *T. longipennis* y *T. mazzottii* encontró que se produjeron descendientes fértiles, llegando algunos de ellos hasta la generación F2 (no indica la viabilidad de los descendientes ni si hizo retrocruza), lo que le llevó a concluir que estas especies presentan afinidades biológicas que les permiten cruzarse entre sí en condiciones experimentales.

Se han llevado a cabo algunos estudios usando herramientas moleculares y así tenemos que Marcilla (93) utilizando la secuencia del ITS-2 (que es un gen de evolución lenta) encontró que hay muy pocas diferencias entre las especies consideradas como complejo *phyllosoma* en 1944, mediante este marcador no encontraron diferencias entre *T. longipennis* y *T. picturata* y basándose en este marcador concluyeron que *T. dimidiata* es diferente del complejo *phyllosoma*. Encontraron que la divergencia de secuencias entre 5 especies mexicanas: *T. phyllosoma*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. picturata* y *T. mazzottii* del complejo *phyllosoma* fue del 1.5% mostrando solamente diferencias de 2 a 6 nucleótidos. En un estudio llevado a cabo por Flores (115) en *T. pallidipennis*, *T. longipennis* y *T. picturata* se analizaron 17 loci enzimáticos mediante el análisis enzimático multilocus y no se encontraron loci diagnósticos que pudieran diferenciar estas especies lo que apoya su agrupación dentro del complejo *phyllosoma*. En otros estudios recientes (Harris, en prensa) comparando rLSU y ND4 de DNA mitocondrial se confirmó que no hay mas que un 5 % de divergencia entre *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma* y *T. picturata*. Posteriormente fueron analizadas *T. pallidipennis*, *T. longipennis* y *T. picturata* por medio de RAPD (116) y no se encontraron marcadores específicos de especie encontrándose una relación muy cercana entre estas especies.

Ya que se requiere información similar para las otras especies del complejo *phyllosoma* se tienen que seguir llevando a cabo estudios que utilicen herramientas moleculares que sirvan para aclarar la validez de las designaciones de especies/subespecies y para reunir una mayor cantidad de características que permitan una mejor definición taxonómica y sistemática de estas especies dentro del complejo (117).

### **1.11 Especiación y Población**

La palabra población desde el punto de vista biológico puede definirse como todos los individuos de la misma especie que se encuentran en la misma área al mismo tiempo (118). Desde el punto de vista genético es un grupo espacial y temporal de individuos conespecíficos que se reproducen por intracruzamiento. La población genética tiene continuidad a través del tiempo por la interconexión

reproductiva entre las generaciones y tiene unidad espacial por el cruzamiento entre sus miembros (119)

La definición de especies de acuerdo con Mayr (120) es la siguiente: "grupos de poblaciones naturales que se reproducen entre ellos de una manera real y potencial y que están aislados desde el punto de vista reproductivo de otros grupos análogos". En 1976 Van Valen (121) define a la especie como un linaje (o grupo de linajes estrechamente relacionados) que ocupa una zona adaptativa mínimamente diferente de algún otro linaje en su rango y la cual evoluciona separadamente de todos los linajes fuera de su rango. En 1989 Ridley (122) define a la especie como un grupo de organismos entre dos eventos de especiación, y uno de extinción, o de aquellos que son descendientes de un evento de especiación. Esto asegura una cierta identidad de posibles combinaciones genéticas que son típicas de una comunidad y que encuentran su expresión en características morfológicas, fisiológicas y etológicas (90). El concepto de aislamiento reproductivo se debe interpretar tomando en cuenta no solamente los aspectos biológicos y genéticos sino también el aislamiento geográfico y nicho ecológico.

Así en la naturaleza existen muchas especies con morfología diferente capaces de cruzarse y dar híbridos fértiles, algunas veces con fijación rápida de nuevos caracteres intermedios, que pueden ser consideradas como especies nuevas por hibridización. Entre los triatominos, el ejemplo mas claro es el de *T. infestans* el cual al cruzarse con *T. platensis* produce huevos fértiles durante algunas generaciones, estas formas híbridas presentan caracteres morfológicos intermedios entre ambas especies después de muchos años (123).

Una premisa central de la teoría sintética (120) de la evolución es que la variabilidad fenotípica dentro de una población es la materia prima para la diferenciación de las poblaciones y posteriormente su especiación. De aquí que se requiera el análisis detallado de la variabilidad genética de caracteres morfológicos cuantitativos. Esto lo puede hacer la Morfometría.

Entre los primeros intentos para examinar otras características diferentes a las morfológicas en triatominos se estudió a la hemolinfa. Este estudio dió origen a una nueva pregunta taxonómica ya que demostró dos poblaciones diferentes dentro de *Triatoma sordida* (124). Treinta y tres años después se

comprobó mediante técnicas isoenzimáticas y citogenéticas que *T. sordida* es un complejo de especies isomórficas (125,126). Estos estudios demostraron por primera vez que había diferencias bioquímicas importantes que podían subdividir una especie de triatominos (reconocida por morfología como tal), en diferentes unidades genéticas. Sin embargo, hasta la fecha no se ha reconocido otra especie hermana (sibling), esto podría reflejar una falta de estudios poblacionales en triatominos y también podría hablarnos del mecanismo biológico de formación de especies hermanas, especialmente si tal mecanismo implica convergencia morfológica entre dos especies relacionadas que compiten dentro de un mismo nicho ecológico. De acuerdo con esta hipótesis, las especies hermanas de *T. sordida* inicialmente pudieron haber sido dos especies morfológicamente diferentes que convergieron debido a la adaptación a un mismo ecotopo.

La idea de que las especies hermanas en triatominos reflejan convergencia ecológica se apoya en la observación de cambios genéticos, métricos y morfológicos de diferentes especies durante la transición de vida de un medio silvestre a uno domiciliado (127,128). El sistema sensorial, en términos de densidad de sensillas en las antenas, se va simplificando progresivamente conforme se va incrementando la estabilidad del hábitat (129). La simetría bilateral se vuelve más relajada (130) así como el dimorfismo sexual (131) y también se ha visto una reducción general en el tamaño del cuerpo (97,127,131).

Ya que la morfología parece ser modulada por factores ecológicos se puede suponer que estos mismos factores pueden producir morfología divergente dentro de una sola especie o entre especies muy relacionadas. Esto se pudo ver al estudiar mediante isoenzimas (132) las distancias genéticas entre *T. infestans*, *T. platensis* y *T. delponteí*, estudio en el que se encontró que había mayor distancia genética entre *T. platensis* y *T. delponteí* que son morfológicamente y ecológicamente similares que entre *T. platensis* y *T. infestans*. Este estudio junto con las observaciones de cambios morfológicos rápidos asociados con la adaptación al hábitat domiciliado, sugieren que los factores ecológicos pueden ser la principal fuerza que dirige la especiación en triatominos (132). También se sugirió que la diferenciación morfológica podía ser más rápida que la instalación de barreras genéticas o reproductoras.

Los cambios morfológicos rápidos (ya sea convergentes o divergentes) asociados con adaptación ecológica ayudan a explicar la discordancia que existe entre diferenciación fenética y genética y da las bases para desarrollar el concepto de especie en triatominos (133). Las especies con diferencias morfológicas consistentes surgirían a través de adaptación ecológica divergente. En otras palabras, las especies morfológicas de triatominos serían "especies ecológicas", una visión que satisface el concepto de "unidades evolutivas" en el cual dos poblaciones se vuelven especies diferentes si siguen caminos evolutivos diferentes. Esta idea no excluye la existencia de diferencias genéticas importantes, pero implica que algunas poblaciones toman una dirección evolutiva diferente e implica que las "unidades evolutivas" recientes estarían todavía genéticamente muy relacionadas, lo cual es probablemente el caso de *T. infestans*, *T. platensis* y *T. delpontei* mencionadas antes (133), y podría ser el caso de *T. infestans* y *T. melanosoma* en la que *T. infestans melanosoma* recientemente ha sido elevada al rango de especie (134), aún cuando este rango de especie no pudo ser validado por las correspondientes diferencias genéticas.

Los cambios morfológicos rápidos en respuesta a factores ecológicos diferentes podrían hacer que se mal interpretara la percepción de diferencias genéticas entre algunas especies y esto podría ser de dos maneras: a) especies que se diferencian morfológicamente podrían tener antecedentes genéticos similares, b) debido a la estructura polifilética de los triatominos, especies morfológicamente muy cercanas podrían presentar diferencias genéticas importantes. Aceptando que el desarrollo de la hematofagia y la adaptación a hábitat más estables son fuerzas evolutivas que homogenizan la morfología externa (133), algunas especies aparentemente similares pudieron haber evolucionado de depredadores bien diferenciados y por lo tanto podrían presentar mas diferencias genéticas que las que se esperarían. Por ejemplo, diferentes especies de *Rhodnius*, todas con hábitat arbóreo son similares en sus rasgos morfológicos, no tienen caracteres discretos que permitan una clara diferenciación entre ellas. Sin embargo, se pueden distinguir tres grupos de especies importantes dentro del género con apreciables distancias genéticas entre ellas. Estas diferencias genéticas confirmadas por un análisis filogenético usando morfometría (133) podrían implicar una separación ancestral entre

especies ocupando diferentes áreas geográficas, pero también podrían reflejar diferencias genéticas adquiridas por sus ancestros depredadores antes del desarrollo de la hematofagia, y por lo tanto una convergencia morfológica.

*T. brasiliensis* y *T. petrochii* son dos especies morfológicamente y ecológicamente similares, sin embargo los datos de isoenzimas no solamente confirman su status específico sino que también sugieren que han evolucionado de manera independiente desde hace tiempo (135). Las especies hermanas representarían el caso extremo en donde dos linajes compiten dentro del mismo nicho ecológico llegando a tener una morfología idéntica. En esta hipótesis, las especies hermanas de tritominos corresponderían al caso especial en donde la presencia de una especie no implica la eliminación de la otra.

Los triatominos parecen ser capaces de desarrollar cambios morfológicos rápidos en respuesta a la adaptación a nuevos hábitat. Su plasticidad morfológica parece ser modulada por la presión ecológica que se ejerce sobre ellos. Si las similitudes morfológicas entre triatominos reflejan más su nicho ecológico que un ancestro común, la morfología debe ser usada con precaución como el principal criterio para estudios filogenéticos y genéticos. En algunos casos los mecanismos genéticos subyacentes a la especiación están constituidos por mutaciones, no necesariamente las mutaciones serían el mecanismo más frecuente, también hay que tomar en cuenta la deriva genética y los cambios graduales. Se tienen datos que del centro de origen de la distribución de una especie hacia la periferia, hay pérdida de genoma, acompañada de cambios fenotípicos como la reducción del tamaño. (136)

Entre los factores involucrados en la adaptación de los triatominos silvestres a hábitats peridomiciliario e intradomiciliario existen: el eclecticismo alimentario, la producción y eliminación de tripomastigotes metacíclicos, su capacidad de vuelo, la atracción que tienen hacia la luz y la capacidad de adaptación a diferentes ecotopos. También influye la falta de alimentación debida a la escasez de poblaciones del huésped animal ya que esto obliga al triatolino a buscar un nuevo hospedero y a dirigirse a la vivienda humana si esta le ofrece una fuente alimenticia y un microhábitat similar al de su hábitat natural. El triatolino también puede ser transportado por el huésped hacia el

peridomicilio humano, y también influye la modificación que se lleve a cabo del ambiente en donde viven ya sea por el hombre o por la naturaleza (136).

Los marcadores genéticos y fenéticos que nos indican diferentes estadios en la transición del ambiente silvestre al domiciliario son: el cambio del tamaño promedio de la población, la pérdida de cromatina, cambio en el tamaño del genoma (que está asociado con especialización), capacidad de vuelo/masa muscular, composición de las glándulas salivales, tamaño y características de las sensilas de las antenas, perfiles de hidrocarburos, microsátélites polimórficos, cantidad de DNA por célula.

### 1.12 Técnicas para distinguir entre especies y poblaciones.

Se ha demostrado que diferentes regiones del DNA ribosomal (rDNA) son blancos valiosos para definir marcadores para realizar estudios de sistemática y filogenética (93). Los dos espaciadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) son excelentes marcadores para distinguir entre especies, así como para analizar relaciones entre tribus, géneros, especies muy relacionadas y diferentes poblaciones dentro de una especie dada.

Utilizando esta técnica Marcilla y col (93) vieron que la longitud de los ITS-2 de las especies de triatominos de América del Sur eran siempre más cortas que las de Centroamérica y Norteamérica y que las secuencias en el ITS-2 fueron marcadamente diferentes entre las especies de Triatomini y Rhodniini.

Además los ITSs usualmente presentan secuencias en tandem repetidas o microsátélites (137) cuya unidad de repetición está entre 1 y 5 pb y los cuales son muy buenos marcadores moleculares polimórficos para la diferenciación de poblaciones dentro de una especie dada (138).

Las variantes cromáticas de *T. dimidiata* y aquellas del complejo phyllosoma fueron originalmente consideradas por Usinger (91) como subespecies, pero mientras que a las primeras se les dió el mismo nombre, a las últimas Lent (12) las elevó al rango de especie. En contraste los resultados mostrados por Bargues (139) revelan una mayor variabilidad genética entre las poblaciones de *T. dimidiata* que entre los miembros del complejo phyllosoma, sugiriendo que el rango de subespecie puede ser mas apropiado para todas estas formas.

Harry (140,141) y Monteiro (15) estudiaron a *R. prolixus* que es el principal vector domiciliado de la enfermedad de Chagas en Venezuela, Colombia y algunas partes de América Central; esta especie es similar a *R. robustus* que es silvestre. Al comparar las muestras de ambas especies por medio de electroforesis para aloenzimas no encontraron diferencias entre ellas, lo que los llevó a suponer que se podía tratar de la misma especie. Posteriormente García y col (117) encontraron diferencias genéticas entre ellas usando la técnica de RAPD y posteriormente Lyman y col (95) pudieron diferenciar ambas especies mediante el análisis del DNA mitocondrial.

Por otro lado, al analizar *T. infestans* que es un vector ampliamente adaptado al domicilio humano y del que todavía se encuentran focos silvestres en Bolivia, se encontró que se podían diferenciar ambas poblaciones por medio de la técnica de RAPD, encontrándose una mayor variación genética en las poblaciones silvestres (142). Se encontró lo mismo utilizando morfometría (97), isoenzimas (98) y DNA mitocondrial (134). Se encontró un solo haplotipo compartido por ambas poblaciones. Las intervenciones de control llevadas a cabo revelan que no hay evidencia de recolonización de focos silvestres y puede ser que la falta de diferencias genéticas observables entre los insectos silvestres y domésticos reflejen una divergencia reciente (en los últimos 3000 años) pero no necesariamente significa que actualmente ocurra flujo de genes entre ambas poblaciones. (15).

La citogenética ha demostrado ser una técnica muy útil para el análisis detallado de la subfamilia Triatominae que es cariológicamente muy homogénea y mediante el estudio del comportamiento de los cromosomas durante la meiosis del macho y la aplicación de técnicas de bandedo cromosómico se han podido comparar diferentes especies y poblaciones (99,143,144,145,125,146,147,148,149).

De la misma manera la morfometría ha ayudado a relacionar la variación métrica y los fenómenos de especiación (133,134), a representar la estructura de poblaciones (97,127,128,150).

Estas herramientas pueden ser usadas para obtener información sobre la estructura poblacional y capacidad de dispersión de los vectores de tal manera que las estrategias de control por insecticida se puedan optimizar (15). Estas herramientas también se pueden usar para identificar la fuente de migrantes



que frecuentemente recolonizan áreas ya tratadas indicando por ejemplo si vienen de pueblos vecinos, del área silvestre o si simplemente sobrevivieron al insecticida (151). Esta información es particularmente importante para monitorear la emergencia de resistencia a insecticida y para hacer predicciones sobre que tan rápido y por cual medio un gene o genes de resistencia a insecticidas pueden esparcirse a través de la población (15).

### **1.13 Citogenética**

La Citogenética comprende cualquier estudio relacionado con los cromosomas ya sean aislados o en conjunto, condensados o extendidos, tanto en lo que respecta a su morfología, organización, función y replicación como a sus variaciones y evolución. Los cromosomas están formados por dos cromátidas que contienen filamentos de DNA asociados a proteínas y a RNA. Las cromátidas se encuentran unidas entre sí por una región mas delgada conocida como constricción primaria o centrómero. El centrómero divide a las cromátidas en dos segmentos que son los brazos cromosómicos, algunas veces el centrómero se encuentra en los dos extremos de las cromátidas dando como resultado la formación de un solo brazo cromosómico por cromátida. El extremo libre de cualquier brazo del cromosoma se conoce como telómero (152).

Con respecto a la organización del centrómero se pueden identificar dos tipos de cromosomas: cromosomas con centrómero localizado o monocéntricos y cromosomas con centrómero no localizado o difuso. Los cromosomas monocéntricos presentan una constricción primaria o centrómero. Durante anafase las fibras del huso se unen a una estructura proteica llamada cinetocoro localizada en la región del centrómero por lo que la actividad cinética se limita a esta zona en el momento de la migración cromosómica. Este tipo de cromosomas se encuentra en la mayor parte de los organismos (152).

Los cromosomas con centrómero no localizado o difuso tienen las siguientes características particulares: no muestran en su estructura ninguna constricción primaria o región con un comportamiento particular durante su

segregación anafásica; durante la mitosis las fibras del huso están, o parecen estar asociadas a lo largo de todo el cromosoma separándose las cromátidas al mismo tiempo en toda su longitud y moviéndose paralelas a los polos celulares; se pueden integrar fragmentos cromosómicos de manera espontánea o inducida en uno de los polos de la célula tanto en meiosis como en mitosis (152).

Para denominar a este tipo de cromosomas con centrómero no localizado se han empleado como sinónimos dos términos con significados muy distintos: cromosomas policéntricos o con múltiples centrómeros en los cuales existen, a lo largo de todo el eje longitudinal del cromosoma mitótico, múltiples estructuras cinetocóricas discretas del tipo "bola y copa"; cromosomas holocéntricos o difusos, donde los microtúbulos del huso se asocian con una estructura cinetocórica continua que se extiende a lo largo de todo el cromosoma mitótico, como en los triatomíneos (152).

A partir de los trabajos de los Schrader se estableció claramente que al igual que los homópteros (153), los heterópteros no poseen un centrómero localizado (154).

En Triatominae, al igual que en otros Heteroptera, el desarrollo de la meiosis varía significativamente entre especies. Esta variación se debe fundamentalmente a las distintas asociaciones que presentan los cromosomas durante la fase meiótica del macho. Estas asociaciones ocurren entre regiones heteropicnóticas positivas (con mayor tinción) que pueden estar presentes en los autosomas y en los cromosomas sexuales. En general, cada especie presenta un número constante de cromosomas heteropicnóticos, así como un tipo de asociación específica entre ellos. Por ejemplo, *T. sordida* y *T. patagónica*, son especies que presentan cariotipos muy similares pero presentan asociaciones tan diferentes y específicas que nos permiten diferenciarlas con sólo observar los núcleos meióticos en profase temprana (125). La especificidad del comportamiento cromosómico para cada especie, junto a su rápida determinación y bajo costo económico, convierten a la citogenética en una herramienta muy poderosa para la taxonomía de los triatomíneos.

En general las regiones heteropicnóticas positivas constituidas por heterocromatina constitutiva detectadas durante la profase meiótica pueden

observarse más claramente utilizando una técnica conocida como bandeo C (155). Las regiones teñidas con bandeo C se denominan heterocromáticas, y están constituidas principalmente por DNA altamente repetido. Hasta la fecha todas las especies de triatomíneos analizadas poseen heterocromatina en el cromosoma sexual Y. Muchas especies también presentan heterocromatina C en sus autosomas y algunas especies en el cromosoma X. Este marcador permite caracterizar cada especie por el número de bandas, localización y cantidad de heterocromatina C. Mediante este marcador es posible diferenciar especies, determinar relaciones evolutivas e incluso detectar variabilidad poblacional (99,125,145). El estudio de los patrones de bandeo C en cada cromosoma se realiza en prometafases mitóticas debido al menor grado de condensación cromosómica que existe en esta fase y que permite visualizar más detalles estructurales que los que se observan en metafase mitótica. También se puede observar en metafase I y II de la meiosis

Los estudios sobre citogenética de triatomíneos han involucrado principalmente descripciones del número cromosómico, así como algunas características del desarrollo meiótico (156,157). En los últimos años, el estudio del comportamiento cromosómico durante la meiosis del macho y la aplicación de la técnica de bandeo C han resultado ser herramientas muy útiles para hacer un análisis detallado de este grupo cariológicamente muy homogéneo (125,143,145). En 1992 Pérez *et al* (143) sugirieron los siguientes rasgos citogenéticos útiles para la caracterización de especies de triatomíneos: número cromosómico, mecanismo sexual, tamaño comparativo de los autosomas y de los cromosomas sexuales, etapa de la meiosis en la cual estos cromosomas se separan, tamaño relativo de los autosomas, presencia de bandas C en los autosomas y constitución de los cromocentros.

Hasta 1979 se conocían los números cromosómicos de 29 especies de triatomíneos (157). Actualmente este número se ha elevado a 54 especies, pertenecientes solamente a dos de las cinco tribus de la subfamilia Triatominae: Rhodniini y Triatomini (158). Se carece de información citogenética de las tres tribus restantes: Alberproseniini, Bolboderini y Cavernicolini.

Dentro del complemento cromosómico de una especie se pueden distinguir dos tipos de cromosomas: los autosomas y los cromosomas sexuales. En esta

familia el número de autosomas (A) es muy homogéneo, solamente 3 de las 54 especies se apartan del valor típico, y supuestamente ancestral de 20 autosomas. En lo que se refiere a los cromosomas sexuales, muchas de las especies (30 de ellas) presentan un par de cromosomas sexuales, X Y en el macho. Este es el caso de todos los integrantes de la tribu Rhodniini estudiados hasta el presente. Sin embargo en la tribu Triatomini y en particular en el género *Triatoma*, se observa variación en el número de cromosomas sexuales apareciendo los sistemas  $X_1X_2Y$  y  $X_1X_2X_3Y$ .

En la Tabla 2 se puede apreciar que el número diploide de los machos se encuentra entre  $2n=21$  y  $2n=25$ , siendo el más frecuente  $2n=22$  cromosomas, el cual se halla presente en 32 especies. Si analizamos las especies del género *Triatoma* de acuerdo a su distribución geográfica, podemos observar que existe una buena correlación, aunque con excepciones, entre el número de cromosomas sexuales y su distribución geográfica. Así tenemos que todas las especies de América Central y del Norte (15 especies), excepto una (*T. lecticularia*) presentan un mecanismo  $X_1X_2Y$  en los machos (158).

De las 16 especies de Sudamérica, 15 de ellas presentan un sistema sexual XY, una posee  $X_1X_2Y$  (*T. tibiamaculata*) y dos especies presentan el sistema sexual  $X_1X_2X_3Y$  (*T. vitticeps* y *T. eratyrisiformis*).

A pesar de su importancia como vectores de la enfermedad de Chagas, los estudios citogenéticos en los triatomini son relativamente escasos. Por esta razón los análisis realizados sobre estos insectos revisten particular importancia tanto a nivel de ciencia básica como de ciencia aplicada. Entre los posibles beneficios de este tipo de investigación merece la pena destacar los siguientes puntos:

- 1.- El estudio de la variación intraespecífica para caracterizar y diferenciar poblaciones, lo cual puede servir en la estimación de la capacidad de dispersión y rutas de colonización de una especie dada.
- 2.- Diferenciación de especies con problemas de identificación taxonómica. Esto es singularmente valioso para aquellas especies con importancia epidemiológica.
- 3.- Establecer relaciones evolutivas, las cuales son particularmente importantes en el género *Triatoma* al tratarse de un grupo supuestamente polifilético.

4.- Análisis de la estructura y comportamiento segregacional de los cromosomas holocéntricos pues muestran una gran heterogeneidad entre los distintos organismos estudiados.

#### **1.14 Morfometría**

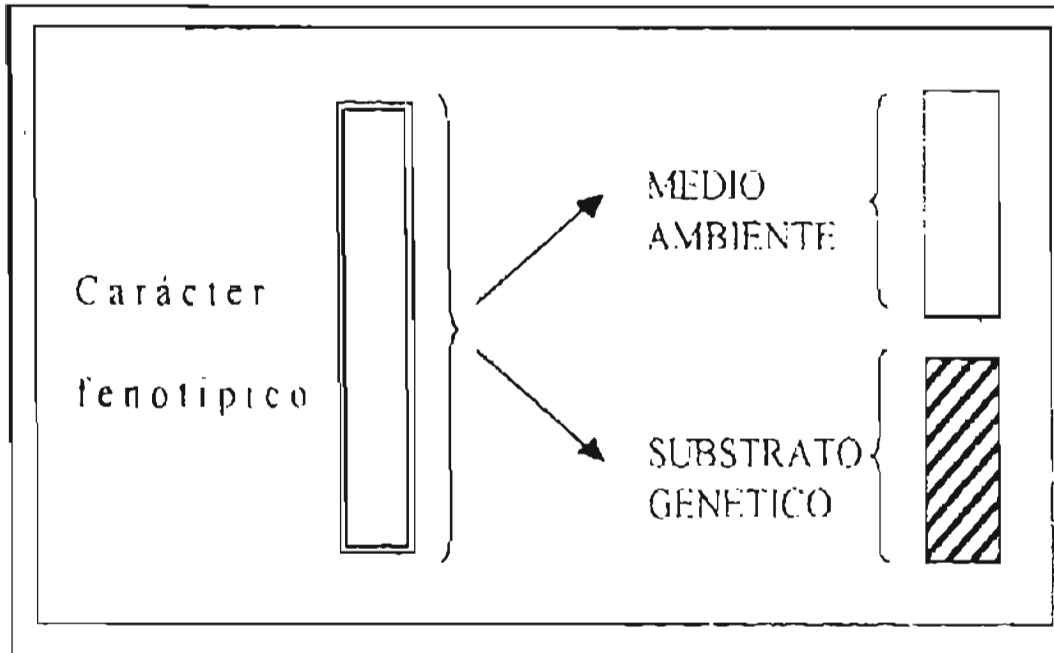
La morfometría es una rama de la biometría que es la ciencia que estudia las variaciones biológicas de los organismos. La biometría considera que las variaciones son un fenómeno universal de la vida que merece un estudio propio. Se ha considerado que las variaciones cuantitativas del fenotipo, como la altura del hombre o el ritmo cardíaco, dependen únicamente de influencias externas. Esto no es así ya que muchos experimentos de laboratorio han demostrado que la mayoría de las variaciones del fenotipo se deben en parte a causas genéticas. Así podemos decir que las variaciones genotípicas de un organismo puede tener dos componentes: un componente ambiental y un componente genético (160).

El componente genético, aunque sea desconocido, es el argumento principal para convertir a la morfometría en un instrumento válido en biología evolutiva. Pero no hay que olvidar que el componente ambiental de la variación fenotípica forma parte también de la biología, y que la morfometría lo puede detectar mejor que cualquier otro método. Por ejemplo: la simetría de un organismo puede variar únicamente por causas ambientales, como puede ser en el caso de los Tritominos el paso de una vida silvestre a una vida doméstica. (160)

El objetivo de la morfometría es brindar una definición cuantitativa del fenotipo para estudiar sus variaciones en relación a los parámetros que son de interés para el investigador. Su método es la medición del individuo entero o de segmentos relevantes del individuo, ya sean componentes externos o internos. Para cualquier carácter fenotípico, podríamos considerar al individuo como el producto de dos influencias diferentes: la genética (por medio de los genes) y la ambiental (temperatura, humedad, etc.) (Fig 3). El conjunto de estos caracteres se conoce como caracteres multifactoriales y son caracteres cuantitativos, y su estudio constituye la genética cuantitativa. La morfometría se interesa

principalmente en los caracteres continuos, es decir de aquellos que resultan de mediciones o de colecta de coordenadas (160).

Fig. 3. Influencias en la variación del fenotipo



La heredabilidad del carácter depende de la población estudiada. No se puede usar un valor de heredabilidad para interpretar los datos de morfometría. Hay selección de ciertos genotipos y por lo tanto las poblaciones geográficas presentan diferencias en sus valores continuos debido a una selección natural. Lo interesante es saber si las diferencias que se encuentran tienen un valor genético o no. Para esto se debe tratar de eliminar de manera real o teórica la contribución del medio ambiente. Por otro lado, con la morfometría también se puede eliminar la influencia genética y ver la influencia ambiental. Esto se puede hacer comparando estructuras bilaterales como por ejemplo ala derecha y ala izquierda. Si hay diferencias no se deben a una influencia genética sino a una influencia ambiental. El estudio de la simetría de un individuo permite enfocarse a la influencia del medio ambiente en este individuo. Las diferencias morfológicas entre especies resultan de los efectos de la selección natural

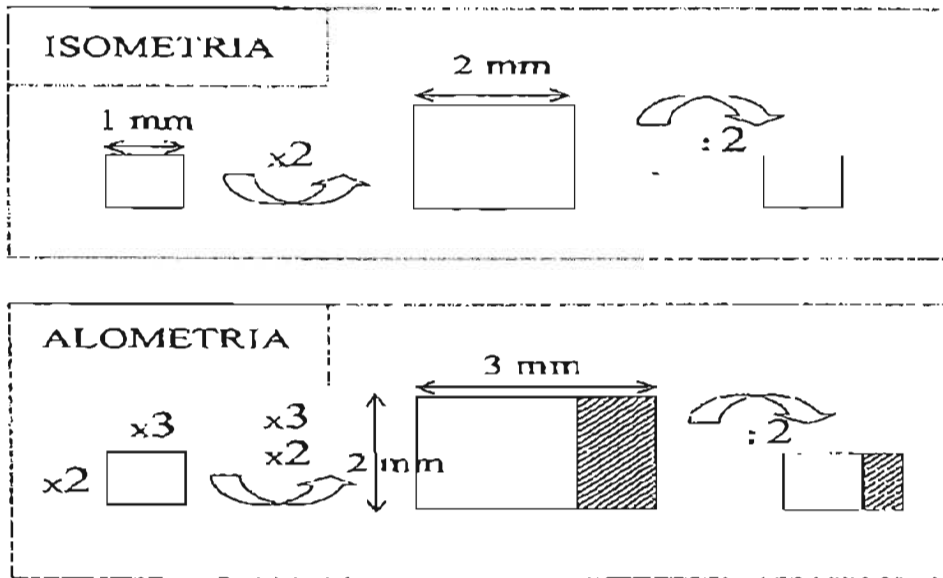
sobre los atributos genéticos y ambientales del fenotipo, así como de los cambios evolutivos del genoma (161).

Se define a la heredabilidad como la capacidad de seleccionar a ciertos fenotipos. Lo que hace el hombre para mejorar una raza lo hace también la selección natural: los fenotipos más adaptados sobreviven y su descendencia hereda el substrato genético seleccionado. De esta forma se diferencian poblaciones locales. Para saber si las diferencias métricas entre dos poblaciones geográficas son algo más que accidentes ambientales se usan dos métodos: uno que intenta eliminar las variaciones ambientales, y otro que se basa en la idea de que la forma de un individuo es un carácter específico, menos influenciado por el ambiente que su tamaño.

El primer método intenta eliminar las variaciones ambientales con la idea de que si persisten las diferencias en un mismo ambiente, o si aparecen nuevas diferencias en un mismo ambiente, dichas variaciones tienen probablemente un origen genético. El segundo método es más especulativo y no utiliza dos generaciones de individuos. Se basa en la distinción entre tamaño y forma, con la idea de que la forma es un carácter menos influenciado por el ambiente, y como consecuencia más aproximado a las diferencias evolutivas entre especies. El tamaño es una variable fácilmente modificada por factores externos. Los insectos tienen un tipo discreto de patrones de crecimiento. Una vez que se alcanza el estado adulto y el exoesqueleto está esclerotizado, el tamaño y la forma se fijan para toda la vida.

Se pueden definir dos tipos de cambio de tamaño: uno llamado cambio isométrico y otro llamado cambio alométrico (Fig 4). El cambio isométrico resulta de la multiplicación por un mismo coeficiente de todas las variables medidas. Se puede comparar este cambio a una fotocopia ampliada ya que su forma no cambia, pero su tamaño crece. El cambio alométrico resulta de la multiplicación de cada carácter por un coeficiente diferente cuando crece el conjunto, lo que lleva a un individuo más grande pero con aspecto diferente. En los organismos vivos casi no existen cambios isométricos, en cambio los alométricos parecen la regla. Así se llaman variables de "conformación" a las variables libres de cambio isométrico, y variables de "forma" a las variables libres de cambios alométricos (160).

Fig 4. Isometría y Alometría



En morfometría lo que se mide son distancias que van de un punto al otro, para ello se puede utilizar el micrómetro ocular que aunque es un método menos preciso para obtener mediciones, es uno de los métodos más económicos. Para todos estos métodos de obtención de datos, es importante la elección de los segmentos corporales que se miden. Es mejor seleccionar las partes del cuerpo que son delgadas, como por ejemplo las alas, ya que se reduce así el problema de orientar el objeto en el espacio tridimensional de la misma manera para cada individuo. Con la cabeza de los triatominos existe el problema de que como es una estructura tridimensional existen ciertos puntos homólogos aparentemente buenos que pueden ser apreciados de manera diferente en relación a la posición de la cabeza bajo el microscopio. Estos métodos tradicionales producen mediciones menos confiables que los métodos basados sobre técnicas informatizadas. Sin embargo, los métodos tradicionales siguen siendo de gran valor, especialmente en casos de falta de recursos, pero debe de tomarse en cuenta el error de precisión, lo que significa volver a medir una muestra al azar de mas o menos 30 individuos, y comparar la segunda colecta de datos con la primera. La precisión nos informa del error experimental



ligado a la toma de mediciones (o de coordenadas), lo cual podría generar falsas diferencias entre los grupos comparados (97).

Un análisis morfométrico puede eliminar los cambios inducidos por el ambiente y apuntar a las diferencias métricas independientes del tamaño. Para esto existen muchas técnicas basadas en análisis multivariado (162).

La Morfometría le proporciona al investigador de un conjunto de técnicas analíticas muy poderosas para cuantificar la variación morfométrica y tentativamente disectar los componentes genético y ambiental de los rasgos examinados. A partir de un conjunto de mediciones los análisis permiten obtener nuevas variables que describe la conformación y un aspecto del tamaño, el cual podría ser explicado por factores fisiológicos ocurriendo durante la ontogenia o por adaptaciones acaecidas durante la historia evolutiva. El objetivo de los análisis es estudiar por separado la conformación y el tamaño, relacionando estos componentes morfométricos con el entorno interno y externo de las poblaciones, suponiendo que ambos son modificados por razones biológicas diferentes

Uno de los problemas en un estudio morfométrico es la correlación biológica que pueden tener los caracteres utilizados. Para eliminar la correlación estadística entre los caracteres, el análisis univariado o bivariado se descarta, y se consideran solamente ciertas técnicas de análisis multivariado (Análisis por Componentes Principales y Análisis Discriminante). Estas últimas crean combinaciones lineales de variables iniciales (componentes principales o factores) que por construcción matemática no presentan correlación entre ellas (20).

#### **1.14.1 Análisis Univariado de las Mediciones.**

El análisis univariado se refiere a la comparación entre grupos de individuos para cada carácter por separado, generalmente se realizan tantas comparaciones entre grupos como de caracteres utilizados. La comparación es mediante la aplicación de pruebas estadísticas. Este análisis es muy útil para el estudio de la simetría del organismo. La comparación estadística entre los grupos, o entre los lados del cuerpo, verifica si las diferencias observadas son compatibles con el azar.

Las pruebas estadísticas se pueden subdividir en dos categorías: las pruebas paramétricas y las no paramétricas. Las pruebas paramétricas comparan los promedios entre sí, considerando su desviación estándar o su varianza y el número de individuos comparados. Estas pruebas requieren de dos requisitos: una distribución normal de los valores de las mediciones, y la igualdad de varianzas entre los grupos comparados. Para encajar con las condiciones de aplicación de las pruebas paramétricas, los datos iniciales se pueden transformar. Una transformación común es tomar los logaritmos naturales de los valores iniciales de medición. Esta transformación logarítmica de los datos es muy importante en análisis multivariados (160).

Después de comparar los grupos para cada carácter, se vuelve a considerar los niveles de significancia de cada comparación con el nivel de significancia corregido por la fórmula de Bonferroni. Esta prueba se utiliza mucho para hacer análisis de simetrías (160).

Es evidente que para cada carácter uno puede demostrar gráficamente como varía su rango entre grupos estudiados. Existe sin embargo una forma de presentar todos los caracteres utilizados y que no carece de visibilidad. Se llama "perfil de Guillaumin" (163). Esta gráfica es muy informativa sobre el tamaño general de un grupo con relación a otro, indicando además cuáles son las variables que podrían ser diagnosticadas entre ciertos grupos.

#### **1.14.2 Análisis multivariado de mediciones (ACP)**

Cuando se unen las variables iniciales en "nuevas" variables combinando la información de la totalidad de las medidas, se habla de análisis multivariado. En análisis multivariado define la variación entre grupos a partir de variables independientes. Esto es lo que permite el análisis multivariado, porque los "coeficientes" se calculan con el objeto de generar factores sin correlación estadística entre sí. Para hacer un análisis multivariado válido se recomienda no utilizar dos medidas redundantes. Los criterios de selección entre estas medidas se deben basar en precisión y exactitud. Según Sokal (164) la "precisión es la cercanía entre medidas repetidas del mismo objeto" mientras que la "exactitud es la cercanía de un dato medido o computado a su verdadero valor".

Estas variables se combinan en pocos factores. En términos matemáticos, la "nueva variable" representando, por lo menos en parte, al conjunto de las variables iniciales, es una combinación lineal de las variables iniciales. Para el análisis de componentes principales (ACP), esta variable recibe el nombre de "componente principal". Si comparamos diferentes especies de insectos a través de dos medidas, como el largo y ancho del cuerpo, haremos dos comparaciones separadas entre las especies. Si podemos combinar las informaciones conjuntas del largo y del ancho de cada especie en una "nueva variable", haremos entonces una sola comparación estadística entre ellas.

El ACP produce factores que rinden cuenta del rango máximo de la variación generada por la totalidad de los individuos, sin tomar en cuenta su pertenencia a tal o cual grupo. En esta representación, generalmente definida por los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) los individuos son puntos más o menos agregados que forman "nubes". El tamaño es generalmente identificado con el primer componente principal: en otras palabras, el valor de un individuo en el primer componente principal es una medida del tamaño global del cuerpo. El ACP requiere transformar los datos a log porque son análisis paramétricos. Se transforman todos para cumplir con distribución normal y varianzas iguales (160).

### **1.14.3 Análisis Discriminante de las mediciones (AD)**

En este tipo de análisis se incluyen los datos de cada individuo y del grupo al que pertenecen, separando de esta manera los grupos estudiados. El AD genera factores independientes no correlacionados entre sí, sobre los cuales los individuos se pueden proyectar en una gráfica de 2 ó 3 dimensiones. Estos factores se conocen como factores discriminantes (FD), funciones discriminantes o variables canónicas.

La diferencia fundamental entre el ACP y el AD es que el cálculo de funciones discriminantes considera la pertenencia de los individuos a los diferentes grupos definidos por el observador. El objetivo de AD no es entonces cuestionar los grupos definidos por el observador (como lo puede hacer el ACP) sino que es el separarlos, discriminarlos de la mejor manera posible, guardando sin embargo una ausencia total de correlación entre los factores.

Este tipo de análisis considera a los diferentes grupos de análisis y es más exigente en cuanto al número de individuos por grupo (160).

Igual que en el ACP, en el AD se puede proyectar a los individuos sobre los dos primeros factores, y examinar la posición de los grupos. Si se considera un nuevo individuo o grupo desconocido, se pueden utilizar las funciones discriminantes para atribuirlo al grupo más probable. El AD puede proponer una clasificación para todos los individuos, tanto los utilizados en el análisis como de otros. Su clasificación puede ser comparada con la clasificación observada y el grado de concordancia estima el valor del análisis.

La morfometría no se limita a comparar los tamaños entre individuos, sino que también intenta cuantificar y comparar sus formas. Lo que se busca no es solamente conseguir una representación de la conformación de un individuo o de una estructura anatómica, sino también una representación que sea estable, libre de variaciones de tamaño. Los intentos de reducir la influencia del tamaño sobre las diferencias métricas se pueden clasificar de acuerdo al tamaño isométrico y tamaño alométrico. Los cambios que acompañan de manera pasiva el cambio de tamaño, es decir los cambios alométricos, corresponden a lo que se espera entre individuos o poblaciones de la misma especie. Por pertenecer a la misma especie, estos individuos tienen la misma forma de crecer o la misma alometría. Especies distintas al contrario no son las mismas extensiones alométricas, tienen generalmente sus propias formas de crecer.

Para estudiar el efecto del medio ambiente eliminando la parte genética se usa la asimetría. Los insectos presentan una simetría bilateral: 3 pares de patas, dos ojos, dos alas, etc., generalmente estas estructuras bilaterales son iguales. Cada lado está bajo el control de los mismos genes, las células del lado derecho y las del lado izquierdo tienen el mismo genoma, de tal modo que la igualdad bilateral "debería ser perfecta". De no ser así, se deben buscar las causas "probablemente" en factores ambientales, no genéticos (160).

La obtención de una simetría sin defectos en el organismo maduro resulta de un desarrollo perfectamente canalizado desde los primeros estadios de vida. En la hipótesis de una ausencia de causas genéticas, el grado de asimetría nos informa sobre los problemas surgidos que pudieran haber perturbado el desarrollo perfecto del organismo. Sin embargo la hipótesis de una ausencia de causas genéticas a la asimetría no siempre es válida. Se han descrito varios

tipos de asimetría, las cuales probablemente tienen causas diferentes. Existe la asimetría fluctuante que resulta típicamente de los pequeños accidentes ocurridos durante el desarrollo, produciendo diferencias individuales en el grado de asimetría. Este tipo de asimetría tiene causas ambientales, no genéticas. La antisimetría se presenta cuando los dos lados del cuerpo difieren siempre por un mismo valor, pero el lado más grande no siempre es el mismo (izquierdo o derecho). La diferencia con la asimetría direccional es que los promedios entre izquierda y derecha tienden a ser iguales o no significativamente diferentes. Se podría imaginar la antisimetría como una asimetría direccional que perdió la noción de izquierda-derecha. Por ejemplo no siempre el lado izquierdo es el más grande, a veces lo es pero otras veces no. Esto resulta en una distribución bimodal de las diferencias bilaterales. La antisimetría tiene un origen genético (160).

### **Dimorfismo sexual y Medio ambiente**

Los especímenes machos y hembra de la misma especie de insectos difieren externamente por la morfología de sus genitales y por otros rasgos no discretos relacionados con el tamaño del cuerpo. Para estos rasgos existe un dimorfismo sexual con distribución de varianza y media a nivel poblacional. Se sabe que existe dimorfismo sexual en triatominos, que las hembras en promedio son más grandes que los machos, pero ningún estudio previo ha examinado este rasgo de dimorfismo en diferentes hábitats (97). Ya que la importancia vectorial de los triatominos está asociada con su domiciliación, es importante investigar si algunos rasgos de los insectos están asociados con esta domiciliación. Dujardin y col (97) detectaron un dimorfismo sexual, debido a reducción en el tamaño total, más pronunciado en hembras, en la transición del hábitat silvestre al domiciliario. Los especímenes domiciliarios en promedio tendían a ser más pequeños que los silvestres solamente para dos caracteres, lo que podría ser debido a una mayor sobrevivencia de los triatominos en el hábitat doméstico. El análisis cuantitativo de estos cambios reveló que la reducción en el tamaño promedio se debe principalmente a reducción en el tamaño en las chinches hembras, lo que lleva a una reducción en el dimorfismo sexual.

### 1.15 Control de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas

El control de la Tripanosomiasis americana tiene una larga historia. Se inició a principios del siglo XX, cuando se identificó el agente infeccioso y a sus vectores, Rápidamente se hizo aparente que una aproximación para controlar la enfermedad involucraría el detener la transmisión controlando al vector. En diferentes lugares de América Latina se intentó modificar el ambiente del hogar mejorando las casas rurales, reemplazando los techos, enyesando las paredes, etc., para controlar la presencia de los triatomínicos domésticos. La llegada de los insecticidas piretroides, en la década de los 40, que son biodegradables y que actúan a nivel del sistema nervioso central de los insectos trajo mayores cambios ya que permitió el control de los triatomínicos mediante el rociado de las casas con insecticidas con acción residual y con formulaciones adecuadas (165,166).

El control de los triatomínicos domésticos mediante el rociado de las casas con insecticidas se ve favorecido por un rasgo biológico que es el de que son de reproducción lenta o sea que son estrategias  $K$ , adaptados para hacer una explotación eficiente de hábitats estables (a diferencia de los mosquitos que se reproducen rápidamente y son estrategias  $r$  adaptados a una rápida explotación de hábitats cambiantes). Un intento de controlar al vector involucra la modificación de su hábitat, por ejemplo haciéndolo tóxico para los insectos blanco. Los triatomínicos no se pre-adaptan, ellos tienden a tener baja variabilidad en sus poblaciones, de tal manera que es muy difícil la selección de atributos nuevos como la resistencia a insecticidas. Otra ventaja de esta reproducción lenta es que aún en donde hay dificultades operacionales locales, hay tiempo para reorganizar intervenciones de control selectivas antes de que cualquier población residual de chinches pueda regresar a los altos niveles anteriores. Así mismo se ha visto que a corto plazo entre triatomínicos es raro o accidental el que haya intercambio de individuos entre poblaciones con localización geográfica diferente, por lo que se puede llevar a cabo una campaña de control sin que exista gran riesgo de reinvasión de áreas no tratadas (166).

El éxito de las campañas de control depende inicialmente de obtener una amplia cobertura geográfica para eliminar todos los focos domésticos y peridomésticos de infestación, y luego una vigilancia sostenida a largo plazo para identificar y tratar selectivamente las reinfestaciones.

Tradicionalmente esta lucha se basa en la educación sanitaria de la población, el mejoramiento de la vivienda y la desinfestación de las viviendas. Cuando estos criterios se cumplen, las poblaciones domésticas de triatominos pueden ser eliminadas rápidamente, y los sistemas de vigilancia basados en la comunidad pueden ser establecidos para consolidar la desinfestación lograda y para prevenir que los triatominos vuelvan a colonizar las viviendas (81,167).

A partir de julio de 1991, en un esfuerzo conjunto de los Ministros de Salud de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay, se creó una Comisión Intergubernamental para la eliminación de *T. infestans* y la interrupción de la tripanosomiasis americana transfusional (programa denominado Iniciativa de los Países del Cono Sur). En 1997 se anunciaron otras dos iniciativas contra la enfermedad de Chagas: la iniciativa de América Central que involucra a Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua en una acción simultánea para eliminar a su principal vector, *Rhodnius prolixus* y suprimir vectores domésticos secundarios como *T. dimidiata* y mejorar la búsqueda de donadores de sangre para evitar transmisión por transfusión; y la iniciativa del Pacto Andino que involucra principalmente a Venezuela y a Colombia con objetivos similares (166).

En el informe de la III Reunión Intergubernamental de la Iniciativa del Cono Sur (marzo 1994) se reportó que se habían logrado grandes avances en la eliminación de *T. infestans* de la vivienda humana mediante el uso de insecticidas residuales. Sin embargo también se encontró que en Argentina, Chile, Brasil y Uruguay entre el 3 y 4% de las viviendas rociadas eran reinvadidas por la misma especie. Para explicar el origen de estas reinfestaciones se dieron dos hipótesis: que los nuevos individuos provenían de poblaciones residuales sobrevivientes de la primera aplicación del insecticida; o que las reinfestaciones resultaban de individuos procedentes de poblaciones vecinas, y que habían llegado ahí por dispersión activa o pasiva. La estrategia de control es diferente según se trate de una hipótesis o de la otra.

Es en este contexto donde la morfometría y la citogenética pueden ayudar a resolver esta interrogante. El grupo de Panzera (99) describió una extensa variación cromosómica de bandas C en *T. infestans* de Uruguay, esta variación intraespecífica permitió por un lado, diferenciar poblaciones naturales con hábitats y capacidades vectoriales distintas, como son las pertenecientes a las regiones Suroeste y Noroeste de Uruguay. En relación al problema de las infestaciones, la comparación de las distintas frecuencias de los patrones cromosómicos de bandeo, en sucesivas colectas de una misma localidad, podría apoyar algunas de las hipótesis sobre el origen de las reinfestaciones. El análisis de pequeñas muestras de *T. infestans* colectadas en la Sexta Seccional de Tacuarembó durante los años 1989, 1992, 1993 sugirieron que los insectos de las reinfestaciones provenían de individuos residuales del ciclo anterior, ya que las sucesivas colectas no presentaron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de los distintos patrones de bandeo (168).

En 1997 (169) al realizar un estudio de morfometría en los focos silvestres de *T. infestans* en Bolivia encontró que la reinfestación encontrada después de aplicar insecticida provenía de una población residual.

En 1999 Dujardin (170) mediante un estudio morfométrico encontró que la reinfestación de *T. infestans* en Cordillera (Bolivia) después de la aplicación de insecticida provenía de focos vecinos.

El control de la enfermedad de Chagas por eliminación de las especies vectoras domésticas de triatomíneos recibe actualmente una gran atención por los gobiernos de los países más afectados, y por organizaciones internacionales como la OMS y la OPS. Una evaluación reciente muestra que las campañas de control son socialmente viables y técnicamente posibles, mientras que un análisis económico muestra que son además beneficiosas desde el punto de vista financiero (150). En diferentes áreas de Latinoamérica se sabe que algunas especies de insectos que usualmente eran consideradas como silvestres se están adaptando al hábitat doméstico, invadiendo casas y ambientes peridomésticos. Esto es particularmente evidente en áreas que están experimentando grandes cambios en el uso de la tierra, donde existe un número creciente de informes sobre especies silvestres raras o poco conocidas de triatomíneos que están empezando a invadir los domicilios humanos.



En distintas zonas de Brasil, especies como *T. brasiliensis*, *T. sordida*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius neglectus* están colonizando las casas en las que se ha controlado a *T. infestans* (92). Lo mismo ocurre con *T. rubrovaria* en Uruguay (168). Debido a que estas especies mantienen su ecotopo silvestre, la eliminación de estas nuevas especies domiciliadas no se podrá basar exclusivamente en el rociado de las viviendas con insecticidas como en el caso de *T. infestans*. Con el objeto de obtener un control vectorial eficaz se debe determinar si estos nuevos focos domiciliados se mantienen como entidades aisladas de las poblaciones silvestres o si por el contrario existe entre ellas intercambio de individuos. Para esto nos puede ayudar la genética mediante el uso de marcadores cromosómicos, morfométricos, isoenzimáticos y/o moleculares que nos puedan dar una estimación del flujo de individuos entre las distintas poblaciones. El tipo de marcador genético que se debe utilizar depende de cada especie y población. Con el estudio isoenzimático se ha logrado muy buenos resultados en *T. rubrovaria* (171), donde la citogenética fue incapaz de diferenciar poblaciones.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Conocimientos de capacidad vectorial**

Para que una especie sea un buen vector de *T. cruzi* debe reunir ciertas características como son el tener hábitos domiciliarios, alcanzar una buena densidad en la vivienda, ser antropofílica, buena receptora de la infección por el parásito y defecar inmediatamente después, o durante el momento de alimentarse. Cuando estas condiciones se dan se presenta el ciclo domiciliario (172).

La adaptación al hábitat humano es lo que define a un triatomino como un vector y como una prioridad para una campaña antivectorial. Por ejemplo dos especies de triatominos pueden estar adaptadas al parásito y a la transmisión del mismo y la especie que esté mejor adaptada al hábitat humano es la que será el vector importante (20).

El hábitat del hombre al que se adaptan numerosas especies de triatominos se subdivide en domiciliario que es donde habita el hombre y peridomiciliario que son las estructuras donde viven los animales domésticos (perros, chivos, cochinos, pollos, etc). Esta definición descansa más sobre bases operacionales (tasas de reinfestación después del tratamiento con insecticida) que sobre bases biológicas. Se dice que un triatomino es peridoméstico cuando se encuentra donde habitan los animales domésticos y no dentro de la habitación del hombre. Es una etapa de la colonización del domicilio por el triatomino (20).

### **2.2 *Triatoma pallidipennis***

*T. pallidipennis* pertenece al complejo *phyllosoma*. Algunas de sus características morfológicas son las siguientes: la longitud del macho es de 31-34 mm y de la hembra de 32-35 mm. El ancho del pronoto del macho es de 6-7 mm y de la hembra de 6-7.5mm, el ancho del abdomen del macho es de 12-13 mm y de la hembra de 13-16 mm. Tiene un cuerpo muy ancho con alas relativamente angostas. El color total va de café oscuro a negro, con manchas rojo anaranjadas sobre el cuello y conectivo y con un corio con un color casi por completo blanco amarillento. Las setas de la superficie dorsal son

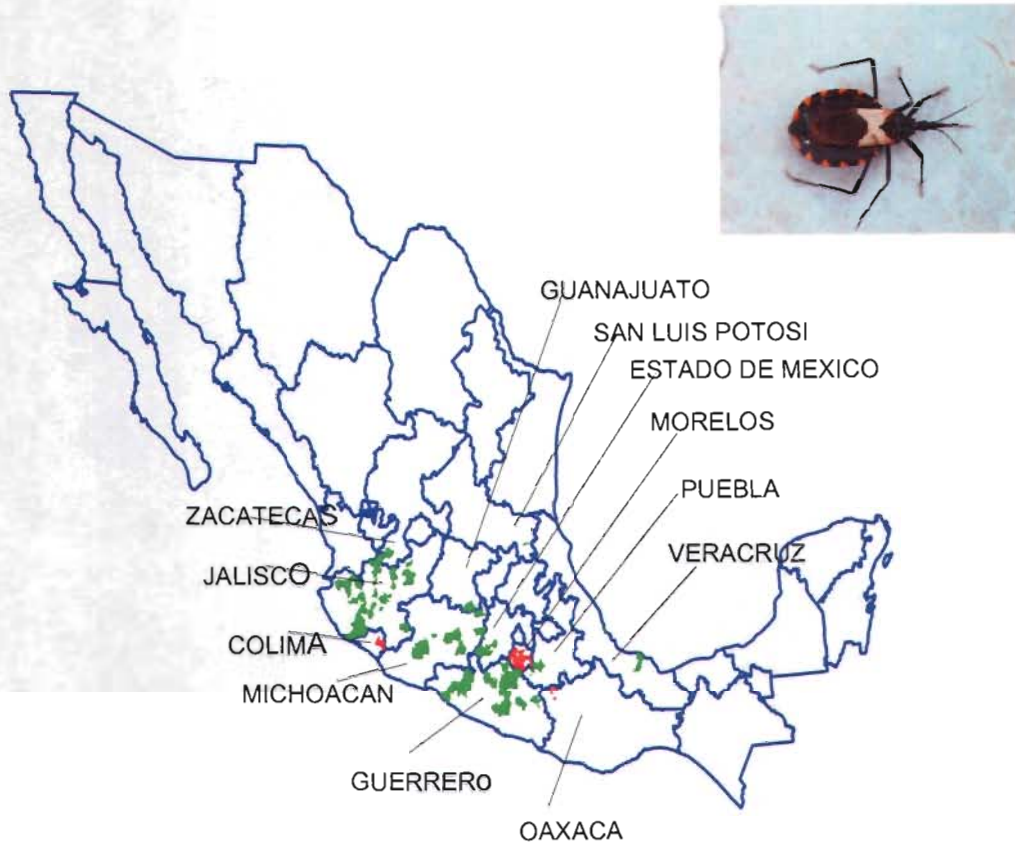
numerosas y la mayoría son cortas de no más de 0.3mm. Su cabeza es negra, el pronoto es negro, los hemélitros y las alas dejan al descubierto el conectivo y la porción lateral de los urotergitos. Los hemélitros de las hembras llegan hasta el urotergito VI y el de los machos hasta el urotergito VII (12).

*T. pallidipennis* tiene un amplio rango de distribución en México y es aparentemente simpátrica con *T. mazzottii*, *T. longipennis* y *T. picturata*. Su distribución por el centro del país va desde el norte del estado de Zacatecas a través de los estados de Guanajuato, Querétaro, México, Puebla y Morelos; a lo largo del Pacífico desde Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, habiéndose hecho algunas colectas en la planicie alta de la región mixteca de Oaxaca, a lo largo de la costa del Golfo *T. pallidipennis* solamente ha sido colectada en Veracruz (Fig 5) (103,111,113,173, 174). En el estado de Morelos que se encuentra al suroeste de la ciudad de México, *T. pallidipennis* es la principal especie de triatomino encontrada. Se puede coleccionar *T. pallidipennis* de infestaciones de casas (huevos, ninfas y adultos en la misma casa), de peridomicilios y del área silvestre tanto en las zonas rurales como en las urbanas (25,107,175,176).

A pesar de que hay algunos reportes sobre colectas de *T. pallidipennis* en domicilios, esta especie se conoce como una especie no domiciliada. La domesticación y/o urbanización de esta especie, considerada antes como completamente silvestre, no pudo haber ocurrido en poco tiempo, y dada la aparente distribución al azar de infestaciones en diferentes comunidades tanto rurales como urbanas del estado de Morelos el distanciamiento fenotípico y genético de las poblaciones pudo haber evolucionado hasta el punto de que se pueda medir.

Figura 5

Distribución de *Triatoma pallidipennis*.



### 2.3 Uso de la Citogenética en otros complejos

Recientemente se ha usado la citogenética en los triatominos para aclarar problemas de identificación taxonómica en especies que son morfológicamente muy similares y que tienen diferente importancia epidemiológica como vectores de la enfermedad de Chagas. En algunas de las especies en las que se ha detectado heterocromatina C, también se han observado variaciones intraespecíficas. Panzera (99,177) describió una gran variación en poblaciones naturales de *T. infestans* de Uruguay, siendo la primera referencia de polimorfismo cromosómico en todo el grupo Heteroptera. Mediante bandeo cromosómico detectó variaciones intraespecíficas en *T. infestans*, que permiten diferenciar adecuadamente poblaciones provenientes de diferentes localidades. Este marcador genético junto con el análisis de isoenzimas, puede estimar el flujo génico entre poblaciones naturales y por lo tanto la capacidad de dispersión de este vector. Este tipo de información ha ayudado a aclarar las rutas de migración de *T. infestans* y lo puede hacer con otras especies, no solamente desde el punto de vista histórico, sino que también puede predecir las tendencias que tienen las especies hacia la domesticación.

En 1997 Panzera (125) al estudiar por citogenética y electroforesis de isoenzimas a tres especies de triatominos: *T. sordida*, *T. gusayana* y *T. patagónica*, que son especies muy parecidas desde el punto de vista morfológico (morfología, antenas y genitalia), ecológico y etológico y que tienen diferente importancia como transmisores de la enfermedad de Chagas, encontraron que aunque tienen el mismo número diploide, cada especie tiene diferente comportamiento cromosómico al estudiar la meiosis en el macho, también encontraron diferente cantidad y localización específica de bloques de heterocromatina para cada una de las especies. En este mismo estudio las características de los cromosomas permitieron diferenciar dos poblaciones de *T. sordida* provenientes de diferentes áreas geográficas con diferentes características ecológicas ya que una de ellas era doméstica y la otra era silvestre, lo que fue confirmado por electroforesis de isoenzimas. Con esto vemos que la citogenética y la electroforesis de isoenzimas se pueden usar en triatominos para caracterizar especies y poblaciones relacionadas y que la

utilidad de la citogenética aumenta cuando se le aplica junto con otros análisis genéticos.

En el género *Triatominae* existen problemas de carácter taxonómico pendientes que involucran a especies o grupos de especies con importancia epidemiológica evidente en cuya resolución la citogenética podría servir de ayuda, por ejemplo: a) al grupo taxonómico *prolixus* integrado por *R. prolixus*, *R. nasutus*, *R. neglectus*, y *R. robustus*; b) el complejo *phyllosoma* integrado por *T. pallidipennis*, *T. picturata*, *T. mazzottii*, *T. phyllosoma*, *T. mexicana*, *T. longipennis* presente en México, se le han realizado estudios preliminares en material proveniente de insectario y se ha podido encontrar marcadores cromosómicos con los que es posible diferenciar a algunas de las especies de este complejo (144); c). Respecto a *T. pallidipennis*, existen evidencias de dos mecanismos sexuales diferentes; el primero reportado por Koshy (178) que sugiere un mecanismo sexual de  $22n=20A+XY$  en machos, y el segundo reportado por Ueshima (156) y Panzera (144) quienes reportan un mecanismo sexual de  $23n= 20A+X_1X_2Y$  también en machos; d) las variedades morfológicas y cromáticas que se observan en *T. dimidiata*, un vector importante de *T. cruzi* en México y Centroamérica (12); e) y en; las variantes morfológicas y/o cromáticas que se observan en un número determinado de especies de triatominos del complejo *protracta* de Norteamérica, algunas de las cuales han sido elevadas al rango de especie siguiendo criterios exclusivamente morfológicos ( por ejemplo *T. melanosoma*).

La presencia de heterocromatina C autosómica es frecuente en varias especies del género *Triatoma*. En un trabajo realizado por Panzera en 1995 (145), se estudiaron los cariotipos por bandeado C y el proceso meiótico de *T. platensis* y *T. delpontei* y se compararon con los de *T. infestans*. A pesar de que las 3 especies presentan el mismo número diploide, autosomas largos, bloques de heterocromatina C y cromocentros heteropicnóticos formados por autosomas y cromosomas sexuales, cada especie presenta diferente comportamiento cromosómico durante la meiosis del macho, diferente contenido de DNA y localización y cantidad específica de heterocromatina C.

## 2.4 Usos de la morfometría en otros complejos.

En 1995, Casini y col (179) encontraron diferencias métricas entre las poblaciones de *T. infestans* del Norte y del Sur de Uruguay tanto en las poblaciones naturales como en las criadas en el laboratorio. En 1997 Dujardin (97) encontró diferencias de forma entre las poblaciones silvestres y domésticas de *T. infestans* y de *Panstrongylus rufotuberculatus* (127) en Bolivia.

Dujardin reporta (131) un pequeño dimorfismo sexual debido a una reducción en el tamaño mas pronunciado en las hembras en la transición de *T. infestans* del hábitat silvestre al doméstico. Un análisis cuantitativo reveló que la reducción en el tamaño promedio es debido principalmente a la disminución del tamaño en las hembras llevando a una correspondiente reducción en el dimorfismo sexual.

El mismo autor reportó en 1999 (180) una disminución en el dimorfismo sexual de mediciones de cabeza en *Rhodnius domesticus* en el que se encontró que los ejemplares hembras colectados en el campo eran significativamente diferentes a los machos en casi todas las mediciones, mientras que no se encontraron diferencias entre los machos y hembras provenientes de ejemplares criados en el laboratorio. El mismo hizo una comparación similar en 5 mediciones de cabeza realizadas en *T. infestans* de Bolivia proveniente de hábitats silvestre y domiciliario encontrando dimorfismo sexual significativo solamente en las poblaciones silvestres pero no en las domiciliarias y la reducción del tamaño fue mayor para las hembras.

También se ha visto en *R. prolixus* y en *T. infestans* que la variación del tamaño de los insectos corresponde con las rutas que se ha supuesto siguieron las migraciones de insectos y que el tamaño va disminuyendo desde las regiones donde se originaron hacia las regiones de colonización mas reciente (128).

De acuerdo con Carcavallo et al (90), *Rhodnius* tiene solamente un complejo específico que es el de *R. prolixus* Stal, 1859. Las especies que pertenecen a este complejo son *R. robustus*, Larrouse, 1927, *R. neglectus*

Lent, 1954 y *R. nasutus* Stal, 1859. Los estudios llevados a cabo tanto morfométricamente como de isoenzimas determinaron que las diferencias entre *R. prolixus* y *R. robusuts* son casi indetectables en muchas poblaciones, mientras que en otras se puede llegar a una diferenciación específica. Esto sugiere que hay áreas con barreras geográficas y ecológicas, mientras que en otras la hibridación es frecuente y por lo tanto las diferencias específicas son mucho menos aparentes.

Se ha visto que existen diferencias de tamaño estadísticamente significativas entre poblaciones de *R. pallescens* que viven en diferentes sitios geográficos (181) atribuidas a mecanismos de selección adaptativos.



### 3. JUSTIFICACION

1. El principal vector de la enfermedad de Chagas en el estado de Morelos es *Triatoma pallidipennis* en donde se han encontrado poblaciones intradomiciliarias, peridomiciliarias y silvestres.
2. Se sabe que estas poblaciones tienen una tasa de infectividad con *T. cruzi* del 40 al 80% (176).
3. No se han caracterizado las poblaciones de *T. pallidipennis* de Morelos desde el punto de vista de citogenética y morfometría.
4. Es importante establecer si existen o no diferencias entre estas poblaciones para poder utilizarlas como marcadores a largo plazo en un programa de control vectorial.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos generales

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

1. Comparar diferentes poblaciones de *Triatoma pallidipennis* provenientes del estado de Morelos, en base a sus características citogenéticas y morfométricas. Estas poblaciones serán definidas por su comportamiento en relación a ámbitos domiciliarios y silvestres.
2. Relacionar las características morfométricas y citogenéticas con la capacidad vectorial para *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*.

### 4.2 Objetivos particulares

- 1.- Determinar la infectividad por *T. cruzi* de las diferentes poblaciones de *T. pallidipennis*.
- 2.- Analizar por medio de citogenética el comportamiento cromosómico durante la meiosis del macho de las diferentes poblaciones (intradomiciliaria, peridomiciliaria y silvestre) de *Triatoma pallidipennis*.
- 3.- Caracterizar la heterocromatina de estas poblaciones de *T. pallidipennis* mediante técnicas de bandeado C.
- 4.- Analizar por morfometría de cabeza y alas las diferentes poblaciones de *T. pallidipennis*.
- 5.- Determinar por morfometría el dimorfismo sexual de las diferentes poblaciones de *T. pallidipennis*.
- 6.- Determinar mediante morfometría la simetría de las alas de las diferentes poblaciones de *T. pallidipennis*.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Definición de Términos

Area intradomiciliaria es el área incluída dentro de las paredes de la casa habitación donde pernoctan y conviven los integrantes del hogar.

Area peridomiciliaria es el área fuera de las paredes estructurales del hogar, que pertenecen al mismo y que se encuentra a veces rodeada por una barda, en donde los integrantes de la familia realizan actividades.

Area silvestre es el área que se encuentra fuera del área urbana y en la que todavía se encuentran las condiciones ambientales sin ningún disturbio del ambiente natural original.

### 5.2 Area de Estudio

El estudio se realizó en triatominos provenientes del área metropolitana de Cuernavaca incluyendo los municipios de Cuernavaca, Temixco, Jiutepec, Emiliano Zapata y Xochitepec, de Yautepec y de Chalcatzingo. Los provenientes del área silvestre provinieron de Jiutepec, Huautla y Chalcatzingo

### 5.3 Material

Se colectaron individuos de *T. pallidipennis* provenientes de poblaciones con diferentes hábitats como son urbano y rural, y dentro de estos se estudiaron muestras de procedencia silvestre, intradomiciliaria y peridomiciliaria.

Se verificó la identidad taxonómica de cada triatomo capturado y a cada insecto le fue asignado un código registrando los datos de especie, sexo, fecha, sitio de colecta, y hábitat (intradomiciliario, peridomiciliario o silvestre)

### 5.4 Obtención de las muestras

A cada triatomo se le hicieron las siguientes determinaciones:

- a) Infectividad con *T. cruzi*: se tomó una muestra de heces de cada triatomino sobre un portaobjetos que contenía una gota de PBS.
- b) Estudio citogenético: Se hizo disección de los individuos machos para extraer gónadas, las cuales fueron conservadas en solución de etanol absoluto:ácido acético glacial (3:1), y se guardaron a -20°C hasta su uso.
- c) Morfometría de la cabeza: se mató al animal colocándolo a -20°C durante 20 minutos, se le quitó la cabeza, la cual se colocó en un tubo eppendorf con alcohol al 70% previamente identificado con el código de cada individuo y se guardó en refrigeración hasta su uso.
- d) Morfometría de alas: Para hacer la medición de las alas solamente se usaron las alas anteriores que se quitaron del cuerpo y se montaron sobre portaobjetos con medio de Hoyers, teniendo cuidado de colocarlas en forma perfectamente plana e identificando el ala derecha del ala izquierda.

## **5.5 Técnicas de análisis utilizadas:**

### **5.5.1 Infectividad con *T. cruzi***

La detección de *T. cruzi* se hizo mediante observación directa al microscopio óptico de la siguiente manera: la muestra de heces obtenida se fija con metanol durante 30 segundos, se tiñe con giemsa y se observa en forma directa al microscopio óptico.

### **5.5.2 Estudios citogenéticos:**

#### **5.5.2.1 Método de Aplastado**

Se utilizó la técnica de Sumner (1955) de tinción con orceína acético-láctica mediante el método de aplastado que consiste en lo siguiente:

**5.5.2.1.1 Preparación del material y reactivos:** Se limpian los portaobjetos colocándolos en un vaso Koplin que contiene 30 ml de agua destilada+10 ml de etanol+10 ml de ácido acético. Se dejan ahí unos minutos y después se limpian con toallas sanitarias.

Para preparar la orceína acético-láctica se disuelven 2 g de orceína sintética (Sigma 07380) en 100 ml de una solución

compuesta por 45 ml de ácido láctico y 55 ml de ácido acético glacial. Se calienta hasta la primera ebullición y se deja reposar durante 24 horas. Luego se filtra quedando lista para usarse. Esta orceina se debe almacenar a temperatura ambiente, en un frasco color ámbar o protegido de la luz con papel aluminio.

5.5.2.1.2 Aplastado del material: Para realizar el aplastado se saca el material previamente fijado en solución fijadora y almacenado a -20°C. Se colocan las gónadas en un vidrio de reloj con ácido acético glacial al 50% (preparado en el momento) por no más de 2 a 3 minutos. El material se ablanda (macera) de esta manera y se disgrega con dos pinzas sobre un portaobjetos previamente identificado con el número del individuo analizado. Para facilitar la disgregación esta se realiza sobre una superficie oscura y se le ponen encima 2 ó 3 gotas de orceina. Se le coloca encima un portaobjetos dejándolo caer desde una posición de 45°, cuidando que el material quede en el centro del cubreobjetos. En el caso de que quedaran burbujas de aire se deben secar mediante suaves golpes. La preparación se deja con el colorante de 2 a 3 horas. Posteriormente se procede a la dispersión del material golpeando el cubreobjetos de manera vertical y concéntrica, desde el centro hacia afuera. Posteriormente se procede al aplastado propiamente dicho, para lo cual se coloca una toalla de papel sobre el cubreobjetos, inmovilizando desde una esquina y con el dedo pulgar se realiza una fuerte presión sobre varios lugares del portaobjetos. Se limpia el exceso de colorante, cuidando de no mover el cubreobjetos, y se comprueba bajo el microscopio: que el nivel de coloración sea el adecuado, que el preparado posee el material de nuestro interés (células meióticas y mitóticas), en caso contrario desecharlo, que el aplastado fue el adecuado de forma que las células de nuestro interés quedaron en un solo plano. Una vez obtenidas estas condiciones, se limpia cuidadosamente tanto el porta como el cubreobjetos y se procede al sellado del cubreobjetos. Para lo cual se aplica, en el borde del cubreobjetos, dos manos de barniz de uñas transparente, una vez seca, esta

preparación se puede observar al microscopio utilizando un objetivo de inmersión.

#### 5.5.2.2. Técnica de bandeo C.

5.5.2.2.1 Obtención del material en el que se van a buscar bandas C por el método de aplastado. El material previamente fijado en la solución 3:1 se coloca sobre un vidrio de reloj en el que hay una solución de ácido acético al 50%. Bajo un microscopio se seleccionan las gónadas. Luego sobre un portaobjetos se disgregan con unas pinzas. Se coloca un cubreobjetos y se realiza la dispersión y el posterior aplastado con el pulgar. Se observa al microscopio con un objetivo de 20x o 40x en contraste de fases para comprobar si el preparado posee el material adecuado para nuestros análisis y si las células se encuentran en un solo plano. Se sumerge el preparado en nitrógeno líquido o hielo seco para poder levantar el cubreobjetos. Se despega el cubreobjetos tratando de no arrastrar el material. Se pone a escurrir el portaobjetos y se deja secar.

5.5.2.2.2 Con la preparación ya seca se lleva a cabo la técnica de bandeo que consiste en lo siguiente:

5.5.2.2.2.1 Hidrólisis del material con HCl 1N.- para esto se incuban los portaobjetos en un vaso Koplín que contiene una solución de HCl 1N durante 15 minutos a temperatura ambiente.

5.5.2.2.2.2 Lavado del HCl.- se lavan los preparados con agua destilada dentro del mismo Koplín durante 2 ó 3 minutos cambiando el agua tres veces.

5.5.2.2.2.3 Incubación con hidróxido de bario.- esta incubación se lleva a cabo con una solución de hidróxido de bario octohidratado al 5% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación se agita el Koplín de vez en cuando.

5.5.2.2.2.4 Lavado del hidróxido de bario.- Se vacía el hidróxido de bario y se llena el Koplín con agua destilada, se le

agregan 5 ml de ácido acético, se agita un poco y se deja durante un minuto. Se tira el agua y se repite el mismo proceso pero poniendo 2.5 ml de ácido acético, por último se hace lo mismo pero poniendo 1 ml de ácido acético por 3 veces. En cada lavado se agitan los portaobjetos. Por último se lavan 3 ó 4 veces con agua destilada.

5.5.2.2.2.5 Incubación con 2XSSC.-Terminado el paso anterior se introducen las preparaciones en el SSC2X a 60°C y se dejan ahí durante 30 minutos. El SSC2X se prepara mezclando: 8.8 grs de citrato de sodio dihidratado, 17.5 grs de cloruro de sodio en 1L de agua destilada y se ajusta el pH 6.8-7.0 con ácido cítrico.

5.5.2.2.2.6 Lavado del 2XSSC.- se lavan los portaobjetos con agua destilada, cambiando el agua 3 veces, estas preparaciones se mantienen en agua hasta que se tiñen.

5.5.2.2.2.7 Tinción con Giemsa.- con los portaobjetos aún mojados se procede a la tinción con giemsa. Se tiñe con giemsa al 4%, el tiempo de tinción es variable por lo que se controla bajo el microscopio (no ver bajo inmersión). Una vez obtenido el grado de tinción deseado, se lava con agua destilada para despegar el cubreobjetos.

5.5.2.2.2.8 Montaje definitivo.- con un montante adecuado (Eukitt) para esto se pone una gota de Eukitt sobre la preparación, se le coloca encima un cubreobjetos grande y se deja que la gota se expanda. Se voltea el portaobjetos sobre una toalla sanitaria y se aplasta para quitar el exceso de Eukitt. Se voltea, se pone sobre algo plano y se le colocan unas pesas encima del cubreobjetos hasta que sequen bien.

La determinación de los patrones de bandeo C para cada espécimen fue hecha analizando al menos 10 células. En machos, se observaron tanto placas mitóticas (prometafases y/o metafases goniales) como meióticas (diakinesis y metafase I). Para el caso de las hembras solo se pudo analizar células en

mitosis ya que en ellas la meiosis está detenida en profase temprana, la cual se desencadena en el momento de la copulación.

El estudio de los patrones de bandeo C en cada cromosoma fue realizado sobre prometafases mitóticas debido a que su menor grado de condensación cromosómica permite visualizar mas detalles estructurales que en metafase mitótica.

## 5.5.2 Morfometría.

### 5.5.3.1 Morfometría de cabeza

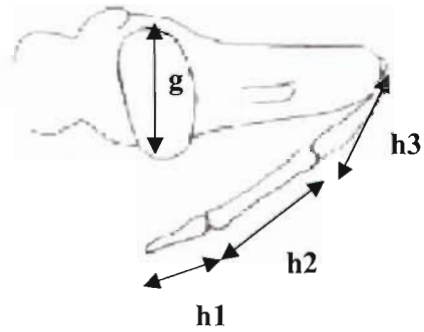
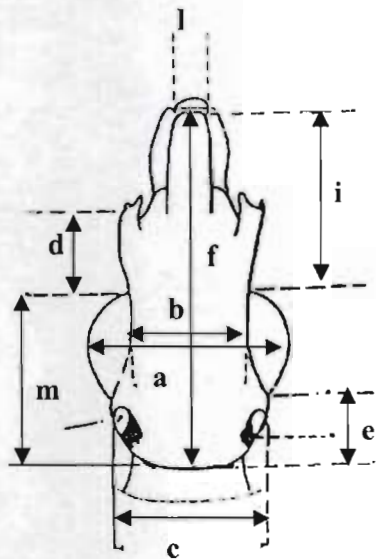
Cada cabeza previamente obtenida se colocó sobre un portaobjetos de tal manera que no se moviera y se pudieran obtener mediciones exactas y reproducibles. Ya inmovilizada, se observó en un microscopio estereoscópico adaptado con un micrómetro, y se tomaron las siguientes mediciones que se encuentran indicadas en la Fig 6 :

- a Distancia entre los ojos tomando la medida a partir del extremo externo de los ojos.
- b Distancia entre los ojos tomando la medida a partir del extremo interno de los ojos.
- c Distancia dorsal de la región postocular.
- d Longitud de la región anteocular.
- e Longitud de la región post-ocular (se excluye al cuello).
- f Longitud total de la cabeza (excluyendo el cuello).
- g Longitud lateral máxima del ojo.
- h Longitud de cada uno de los segmentos del rostro.
- i Longitud del tubérculo anterífero (desde el margen frontal del ojo hasta la orilla externa del punto de inserción de la antena).
- l Distancia dorsal del anteclípeo.
- m Distancia dorsal desde el frente del ojo hasta la parte de atrás de ocelo.



Fig 6

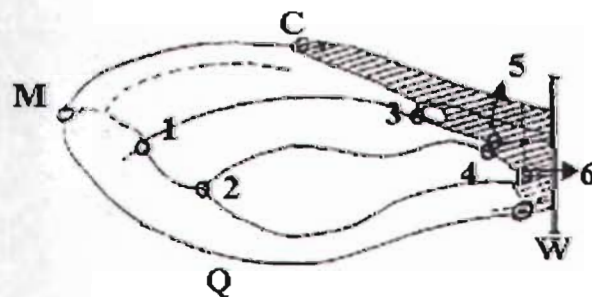
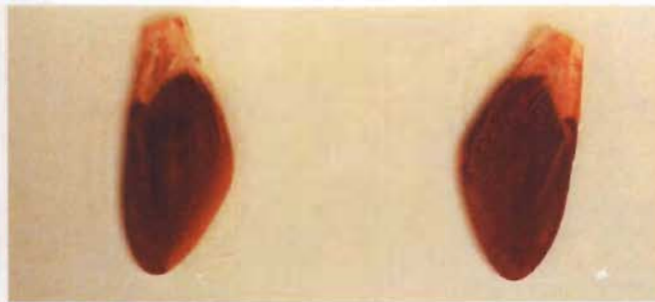
### Morfometría de Cabeza



### 5.5.4.2 Morfometría de alas

5.5.4.2.1 Las alas montadas con Hoyers se observaron en un microscopio estereoscópico Olympus adaptado con un micrómetro ocular, y se tomaron las mediciones que se encuentran indicadas en la Fig 7 :

**Fig 7. Morfometría de Alas**



- C:** Unión membrana y corium.
- Q:** Máxima distancia desde C.
- M:** Máxima distancia desde w.
- W:** Acoplamiento de las alas.
- A:** Distancia entre 1 y 3.
- B:** Distancia entre 2 y 3.
- C:** Distancia entre 2 y 4.
- D:** Distancia entre 2 y 6.
- E:** Distancia entre 1 y 2.
- F:** Distancia entre 3 y 5.
- G:** Distancia entre 4 y 6.
- H:** Distancia entre 3 y 6.
- I:** Distancia entre C y Q.
- J:** Distancia entre C y W.
- K:** Distancia entre M y W.

Se incluyó como grupo externo a *T. phyllosoma* para estimar el rango de diferenciación morfométrica dentro del género *Triatoma*.

## 5.6 Análisis Estadístico:

### 5.6.1 Análisis univariado

Para representar las variaciones entre grupos se escogió la gráfica de perfiles de Guillaumin, la cual se realizó con las tres poblaciones incluyendo y sin incluir el grupo externo, sin separar sexos, y entre las hembras y los machos de cada población, por separado.

Se utilizó la prueba de t de Student comparando la media y la desviación estándar para cada variable con corrección de Bonferroni.

Este análisis univariado permitió la selección de ciertas variables que fueron las que se utilizaron en el análisis multivariado. Se puede considerar como una primera comparación métrica entre los grupos, ya que tienen la ventaja de que se puede examinar la variación de todas las medidas disponibles. Para llevar a cabo este análisis se utilizó el programa Stata 8.0.

Posteriormente, se estimó la precisión y exactitud de cada una de las variables utilizadas.

El criterio de selección de variables a utilizar para los análisis multivariados se basó en los valores de Precisión, Exactitud, No redundancia, perfiles de Guillaumin y prueba t de Student. Los datos fueron previamente transformados a logaritmos. (160)

### 5.6.2 Análisis multivariado

Para el análisis multivariado los datos fueron transformados a logaritmo natural y se hizo un análisis de componentes principales usando la matriz de covarianza. Los especímenes silvestres y los domiciliarios fueron analizados por análisis de componentes principales los cuales fueron correlacionados con el primer componente principal. Se construyó un mapa factorial para el primer y segundo componente principal para ilustrar las diferencias en tamaño entre los diferentes especímenes de origen intradomiciliario, peridomiciliario y silvestre.

Posteriormente se hizo un análisis discriminante incluyendo y excluyendo el tamaño y se construyó un mapa factorial con los dos primeros componentes

discriminantes para ver si podíamos obtener alguna variación de forma entre las poblaciones.

Para la realización del análisis multivariado se utilizaron los programas BACwin® y PADwin®.

## 5.7 Dimorfismo Sexual

Para la estimación de dimorfismo sexual se realizó una prueba de Mann-Whitney entre hembras y machos haciendo una comparación de medias para cada carácter, por grupos poblacionales.

Se realizó una prueba de t Student para muestras independientes con un intervalo de confianza del 95%, entre machos y hembras para cada región por separado.

Se calculó el dimorfismo en base al tamaño de las alas, mediante una prueba de t student para muestras independientes para las poblaciones intradomiciliaria, peridomiciliaria y silvestre.

## 5.8 Asimetría

Para analizar la asimetría se siguió la metodología recomendada por Dujardin (160), realizando un Análisis de Varianza para cada carácter separando grupos y sexos. Se utilizaron los datos de las mediciones de los caracteres de alas derechas e izquierdas de todos los individuos. El error de medición fue estimado de la totalidad de los individuos, utilizando las dos mediciones realizadas de cada carácter.

Para saber si presentaban Asimetría Fluctuante o Antisimetría se examinó la compatibilidad con una distribución normal. de las diferencias con signo, mediante una prueba de Shapiro Wilks.

También se analizó la igualdad a cero de los promedios de las diferencias entre lados, para determinar el tipo de asimetría.

Luego se graficaron en forma de histograma los índices de asimetría fluctuante corregidos por el error de medición, para todas las variables de alas, en las poblaciones que la presentaban.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 INFECTIVIDAD

Se hizo el análisis de los resultados de infectividad para *T. cruzi* y *T. rangeli*, tomando en cuenta el origen de la población y no se encontraron diferencias significativas entre las 3 poblaciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Infectividad por *T. cruzi* y *T. rangeli* de *Triatoma pallidipennis* del estado de Morelos

	<i>T. cruzi</i>	<i>T. rangeli</i>
Población Intradomiciliaria	54.2% n=70	0% n=51
Población Peridomiciliaria	51.8% n=60	4.9% n=58
Población Silvestre	60.5% n= 51	0% n=38

## 6.2 CITOGENETICA

La cantidad de gónadas, localidad y hábitat de cada población usada en el estudio se muestra en el Cuadro 2

Cuadro 2. Datos de las muestras estudiadas

Especie	Habitat	Cantidad	Localidad
<i>T. pallidipennis</i>	Intradomiciliario	5	Cuernavaca, Zapata y Temixco
<i>T. pallidipennis</i>	Peridomiciliario	5	Yautepec, Chalcatzingo y Cuernavaca
<i>T. pallidipennis</i>	Silvestre	5	Jiutepec y Chalcatzingo

El análisis citogenético de los cromosomas de las diferentes poblaciones de *T. pallidipennis* mostró lo siguiente:

2.1 Cromosomas y su caracterización: el análisis de las gónadas de ejemplares machos provenientes de las 3 poblaciones estudiadas utilizando la técnica de la orceína ácida de Sumner, mostró que los ejemplares presentan el mismo número cromosómico constituido por 20 autosomas y 3 cromosomas sexuales o sea que es igual a 23 con  $2n=20+X_1X_2Y$ , y que no hay diferencias en el tamaño de los autosomas entre las tres poblaciones (Cuadro 3 y Fig 8).

Al ser teñidos con orceína, los cromosomas sexuales presentan heteropichnosis positiva, ya que si los comparamos con los autosomas que están constituidos principalmente por eucromatina se ven con mas color debido a que presentan un mayor grado de condensación de la cromatina.

Durante la profase temprana meiótica se observó un cromocentro formado por 5 subunidades: 3 correspondientes a cada uno de los cromosomas sexuales y dos a cada uno de los extremos de un autosoma bivalente. La asociación entre los cromosomas sexuales y el autosoma bivalente continúa hasta el diploteno. Durante la metafase, los cromosomas sexuales se observan más pequeños que los autosomas y el cromosoma sexual Y es más grande que los cromosomas X.

2.2 Técnica de bandeo C: en las tres poblaciones de *T. pallidipennis* se encontró un par de autosomas con bandas C en la parte terminal. Se

encontraron diferencias entre los cromosomas sexuales ya que el cromosoma sexual Y contiene heterocromatina mientras que los cromosomas  $X_1$  y  $X_2$  son más pequeños y no tienen heterocromatina por lo que se consideran como C negativos.

Cuadro 3. Características citogenéticas de las 3 poblaciones de *T. pallidipennis*

Características citogenéticas	<i>T. pallidipennis</i> Intradomiciliario	<i>T. pallidipennis</i> Peridomiciliario	<i>T. pallidipennis</i> Silvestre
Número de cromosomas	23	23	23
Número de autosomas	20	20	20
Mecanismo sexual	$X_1X_2Y$	$X_1X_2Y$	$X_1X_2Y$
Tamaño relativo de los cromosomas sexuales	$X_1X_2 < Y$	$X_1X_2 < Y$	$X_1X_2 < Y$
Tamaño relativo de los autosomas	No	No	No
Los cromosomas sexuales se separan en	Diploteno	Diploteno	Diploteno
Bandas C en autosomas	Si	Si	Si
Constitución del cromocentro	Cromosomas sexuales + autosoma bivalente	Cromosomas sexuales + autosoma bivalente	Cromosomas sexuales + autosoma bivalente



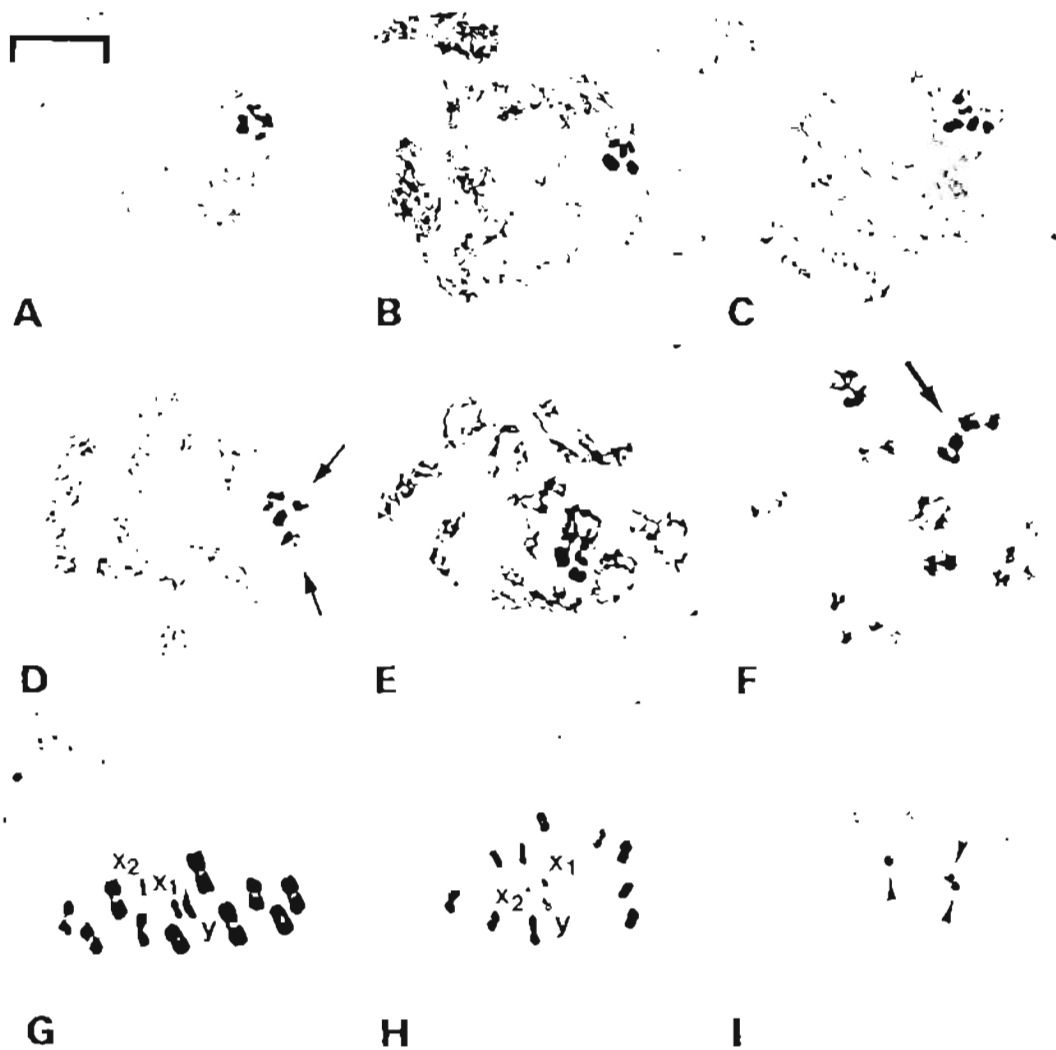


Fig 8. Meiosis de *T. pallidipennis* macho. Orceina.

A.- Profase temprana

B, C, D Difuso. Aumenta el volumen del núcleo y se ve un cromocentro formado por 5 subunidades: 3 correspondientes a los cromosomas sexuales y 2 a cada uno de los extremos de un autosoma bivalente.

E- Díploteno. Permanece la asociación de los cromosomas sexuales y el autosoma bivalente

F- Diacinesis. Se observan los 3 cromosomas sexuales y el autosoma bivalente con sus dos extremos heteropicnóticos.

G- Metafase I

H- Metafase II con tinción de orceina

I- Metafase II con tinción de bandeado C. Las flechas indican la ubicación del cromosoma Y y del autosoma bivalente que son heterocromáticos.

## 6.3 RESULTADOS DE MORFOMETRÍA

### 6.3.1 Precisión y Exactitud.

Se hicieron las pruebas de precisión y exactitud de las mediciones realizadas, para determinar que puntos eran los mejores para poder someterlos posteriormente al análisis multivariado. Los resultados de estas pruebas se pueden ver en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. PRECISION Y EXACTITUD DE LAS MEDICIONES**

CABEZA	PRECIS MACHOS	EXACT MACHOS	I	P	S	PRECIS HEMBRAS	EXACT HEMBRAS	I	P	S
a	0.86	11.11	49±2	49±2	50±2	0.74	12.50	49+2	50+1	50+2
b	1.00	16.67	25±1	25±1	25±1	0.95	12.50	26+1	26+1	26+1
c	0.60	16.67	31±2	31±1	31±1	0.63	14.29	31+1	32+1	32+1
d	1.42	6.67	69±3	70±3	71±3	1.42	9.09	72+2	72+1	73+2
e	1.42	14.29	20±1	21±1	21±1	1.40	12.50	21+1	22+1	22+1
f	2.21	5.56	111±4	111±4	112±4	1.95	5.56	114+4	115+4	116+4
g	0.95	12.50	32±1	32±1	33±2	0.89	14.29	32+1	32+1	33+1
h1	2.05	6.67	39±4	40±2	41±2	2.11	7.69	41+2	42+2	42+2
h2	1.83	5.56	65±3	64±3	65±3	1.32	6.67	67+2	67+3	67+3
h3	0.61	25.00	22±1	22±1	22±1	0.58	27.78	22+1	22+1	23+1
i	1.40	6.67	31±2	31±2	31±2	1.37	12.50	32+2	33+2	32+1
l	0.36	20.00	8±1	8±1	9±1	0.37	50.00	8+1	9+0.4	9+1
m	1.37	8.33	36±2	35±2	35±2	1.37	12.50	36+2	36+1	36+2
ALA DER										
ad	0.73	3.33	89+5	89+5	90+6	0.66	5.00	86+4	88+3	92+4
bd	0.73	4.17	67+4	67+4	68+5	0.66	5.88	65+4	67+3	69+4
cd	0.95	3.57	80+5	79+5	81+5	0.84	4.00	77+5	79+4	83+4
dd	0.70	3.33	90+5	89+5	91+6	0.74	3.85	87+5	89+4	94+5
ed	0.35	5.56	36+3	36+3	37+3	0.37	6.67	34+3	35+3	37+3
fd	0.65	11.11	21+2	21+2	22+2	0.63	8.33	20+2	20+2	22+2
gd	0.45	12.50	14+2	14+2	14+2	0.37	11.11	13+2	13+1	15+2
hd	0.55	7.69	37+3	37+3	38+3	0.47	6.25	35+3	36+3	39+3
ld	1.15	3.57	82+5	80+4	83+5	0.78	5.28	79+3	79+4	84+4
jd	1.15	3.85	77+4	74+4	77+5	1.00	4.55	74+4	74+4	78+3
kd	1.05	2.27	151+8	149+7	154+9	1.05	2.78	144+8	147+6	154+7
ALA IZQ.										
ai	0.70	3.45	88+5	88+5	90+5	0.69	4.76	86+4	87+2	91+4
bi	0.60	4.17	66+4	66+4	67+4	0.63	5.56	65+4	66+3	68+4
ci	1.00	3.70	79+5	78+4	80+5	1.00	4.00	76+5	78+4	82+4
do	0.53	3.45	89+5	89+5	91+6	0.55	3.70	86+5	88+4	93+5
ei	0.43	5.00	36+3	36+4	37+3	0.45	6.67	35+3	35+3	37+3
fi	0.40	10.00	21+2	21+2	22+2	0.37	9.09	19+2	20+2	22+2
gi	0.30	10.00	14+2	14+2	14+2	0.26	12.50	14+2	14+2	15+2
hi	0.35	7.69	38+3	38+2	39+3	0.32	6.67	36+3	37+3	39+2
ii	0.90	3.70	82+5	80+4	83+5	0.89	5.56	79+4	79+3	83+4
ji	0.95	4.17	76+4	75+4	78+5	0.95	4.55	75+4	74+4	78+3
ki	1.10	2.27	151+8	149+7	154+9	1.16	2.78	145+7	146+6	155+7

Se tomaron como válidos los resultados de precisión y exactitud que más se acercaban a las siguientes características en cuanto a precisión ser menores a la unidad y de exactitud ser menores a 10.

### 6.3.2 Perfil de Guillaumin

Para representar todos los caracteres medidos se escogió el Perfil de Guillaumin, que representa de forma gráfica el tamaño general de cada población y permite ver las variables que pueden servir para diferenciar las tres poblaciones al realizar el análisis multivariado. Se grafican los valores que resultan de aplicar la siguiente fórmula:  $(Mg - Mt) / SD$ . Estas representaciones gráficas se realizaron utilizando todos los caracteres medidos, tanto de alas como de cabeza.

#### 6.3.2.1 Cabezas:

Los datos de machos y hembras analizados por separado se pueden ver en las Figuras 9 y 10

Figura 9

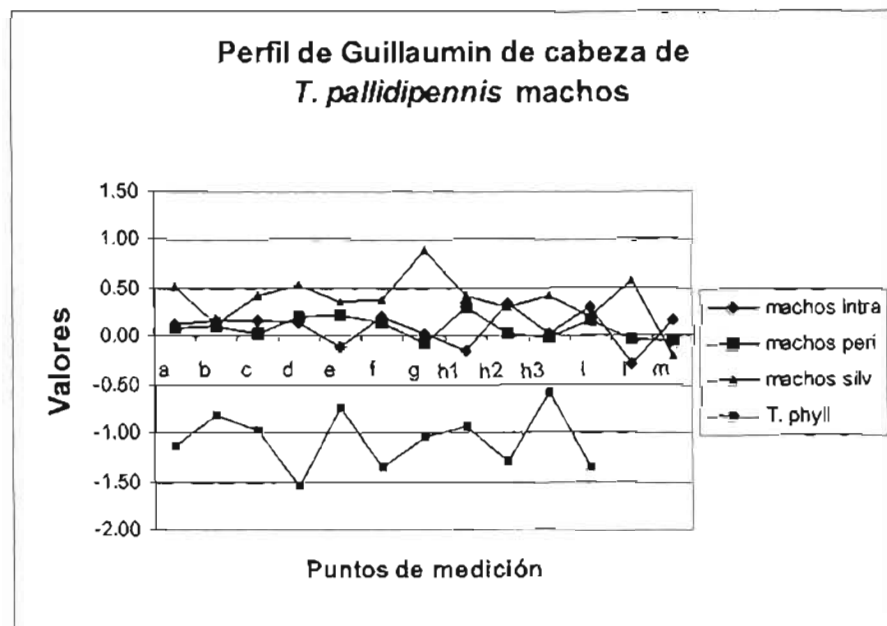
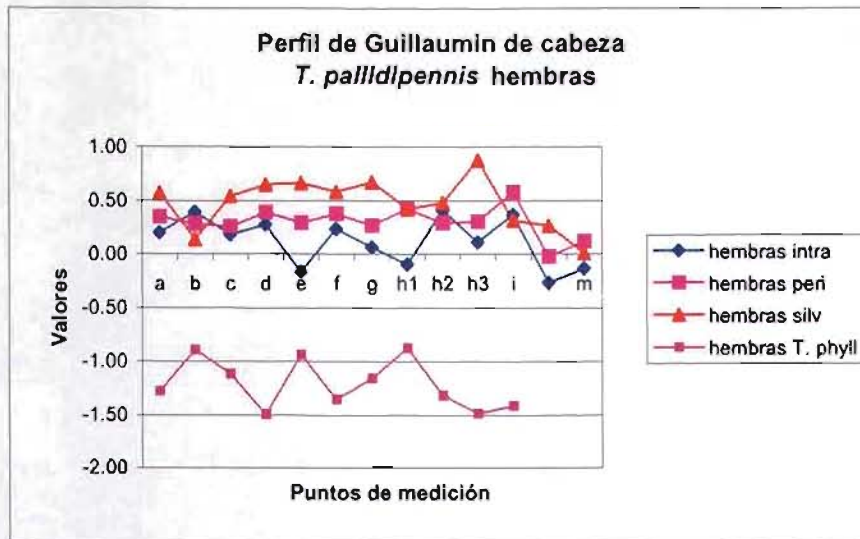


Figura 10



Los valores de cabeza de *T. pallidipennis* macho con habitat silvestre son los más grandes y los de *T. phyllosoma* son los más pequeños (Figura 9). Las diferentes mediciones de cabeza de *T. pallidipennis* intradomiciliario y peridomiciliario son muy parecidas, no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, entre las poblaciones intradomiciliaria y silvestre se encontraron diferencias significativas en las mediciones g, h3, l y m, entre las poblaciones peridomiciliaria y silvestre se encontraron diferencias significativas en las mediciones a, c, g, h3 y l.

Los datos de cabeza de *T. pallidipennis* hembra fueron similares a los de machos, con la diferencia de que el tamaño de las mediciones de la población intradomiciliaria es menor al de la peridomiciliaria (Figura 10). Entre la población intradomiciliaria y peridomiciliaria se encontraron diferencias significativas en las mediciones e y h1; entre las poblaciones intradomiciliaria y silvestre se encontraron diferencias significativas en d, e, f, g, h1 y h3, mientras que entre las poblaciones peridomiciliaria y silvestre solo se encontró diferencia significativa en h3.

6.3.2.2 Alas.- El perfil de Guillaumin para el ala izquierda y el ala derecha se analizó por separado en machos y hembras (figuras 11, 12, 13 y 14)

Figura 11

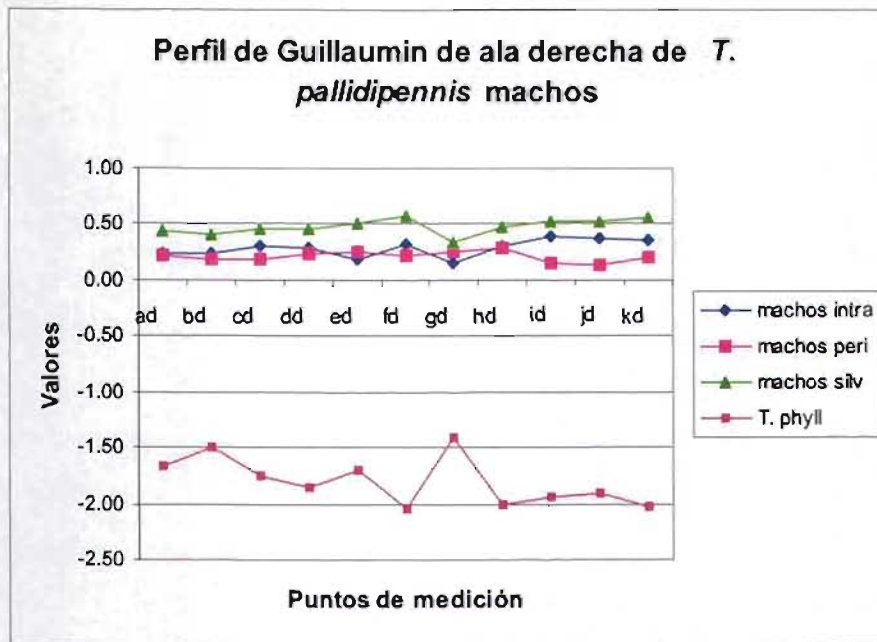


Figura 12

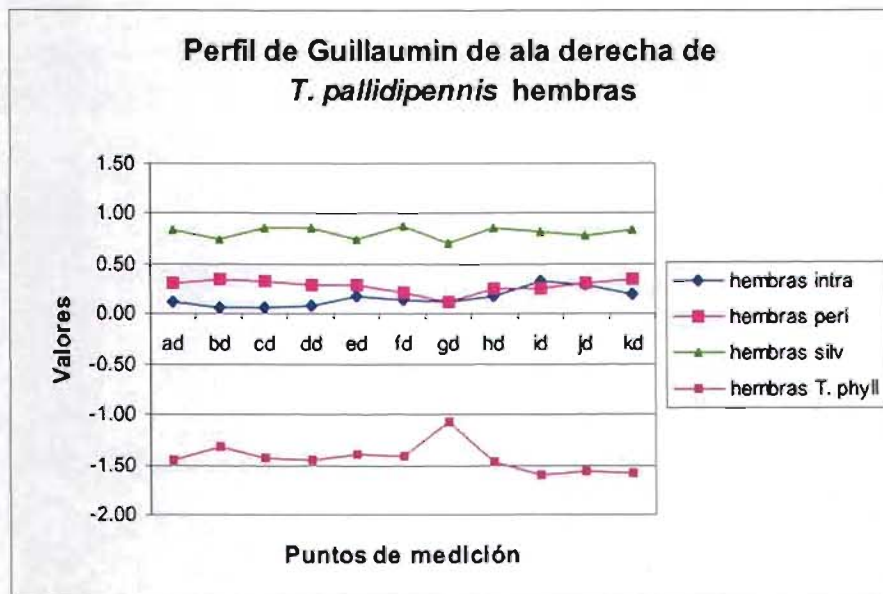


Figura 13

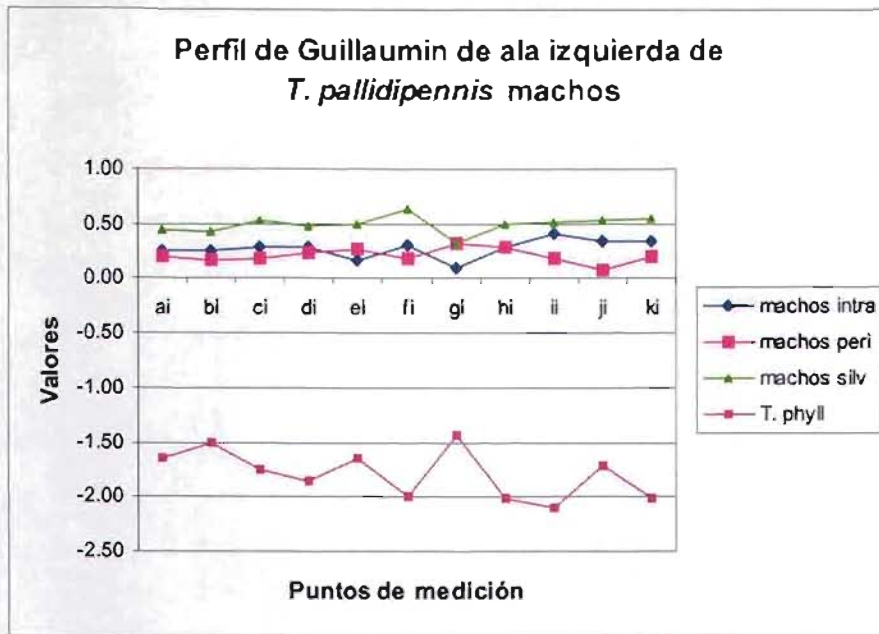
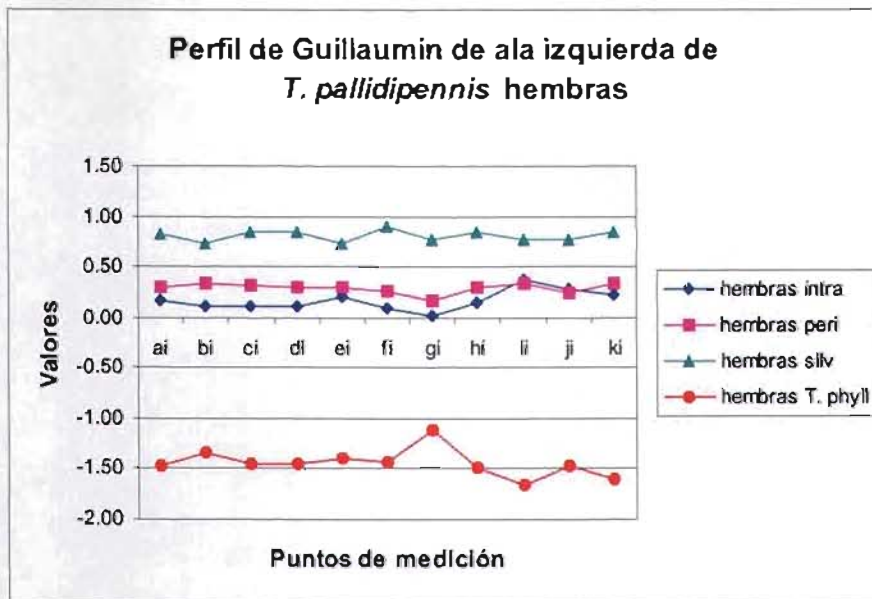


Figura 14



Los valores de alas de *T. pallidipennis* machos silvestres son los más grandes y los de *T. phyllosoma* son los más pequeños (Fig11 y 13). Los valores de las alas izquierda y derecha de las 3 poblaciones de *T. pallidipennis* son muy parecidos. Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones intradomiciliarias y peridomiciliarias en los puntos id y jd del ala derecha, y en los puntos ii, ji del ala izquierda. Entre las poblaciones intradomiciliaria y silvestre no se encontraron diferencias significativas en las mediciones del ala derecha, sin embargo se encontraron diferencias significativas en las mediciones ei y fi del ala izquierda. Entre las poblaciones peridomiciliarias y silvestres se encontraron diferencias significativas en las mediciones fd, id, jd y kd del ala derecha y en las mediciones fi, ii, ji y ki del ala izquierda.

Los valores de alas de *T. pallidipennis* hembras silvestres son los más grandes y los de *T. phyllosoma* son los mas pequeños (Fig 12 y 14). Los valores de las alas de *T. pallidipennis* intradomiciliario, y peridomiciliario son muy parecidos. No hubo ninguna diferencia significativa entre las poblaciones intradomiciliaria y peridomiciliaria de ambas alas, pero si hubo diferencias en todas las mediciones entre las poblaciones intradomiciliarias y silvestres, y peridomiciliarias y silvestres para ambas alas.

Tomando en cuenta los resultados de precisión y exactitud, así como los perfiles de Guillaumin, el resultado de la prueba t de Student y de la exclusión de puntos redundantes de cabeza que son "b" y "f", y de alas "g", se seleccionaron los siguientes caracteres para realizar el análisis multivariado:

En los machos: a, g, m, fd, id, jd, kd, ei, fi, ii, ji, ki

En las hembras: a, g, h1, ad, bd, cd, dd, ed, fd, hd, id, jd, kd, ai, bi, ci, di ei fi, hi ii,ji, ki.

## 6.4 RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIADO

### 6.4.1 Análisis de Componentes Principales Multigrupo

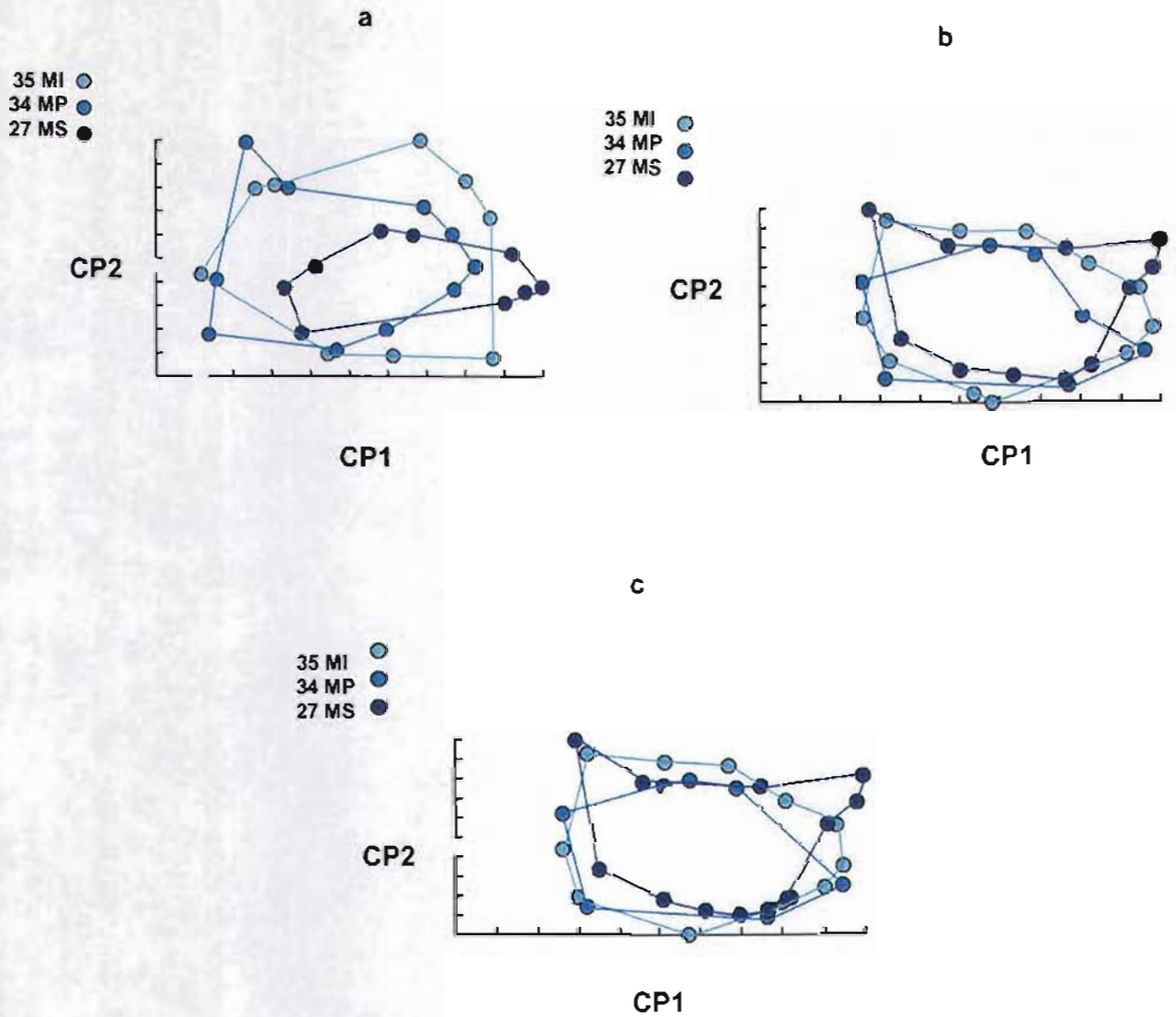
Se realizó un análisis por componentes principales multigrupo (ACPmG) separando a las poblaciones por género. Para hacer este análisis se tomaron en cuenta los puntos seleccionados y se proyectaron en mapas factoriales en base al primero (CP1) y segundo componente principal (CP2), (Figuras 15 y 16). El análisis se realizó: a) para las mediciones de cabeza, b) para las

mediciones de alas y c) mezclando las mediciones de alas y cabeza. El componente principal 1 se muestra en el eje de las abscisas y nos da la información del tamaño de la población y el componente principal 2 se muestra en el eje de las ordenadas y en él se resumen el resto de las características de la población.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

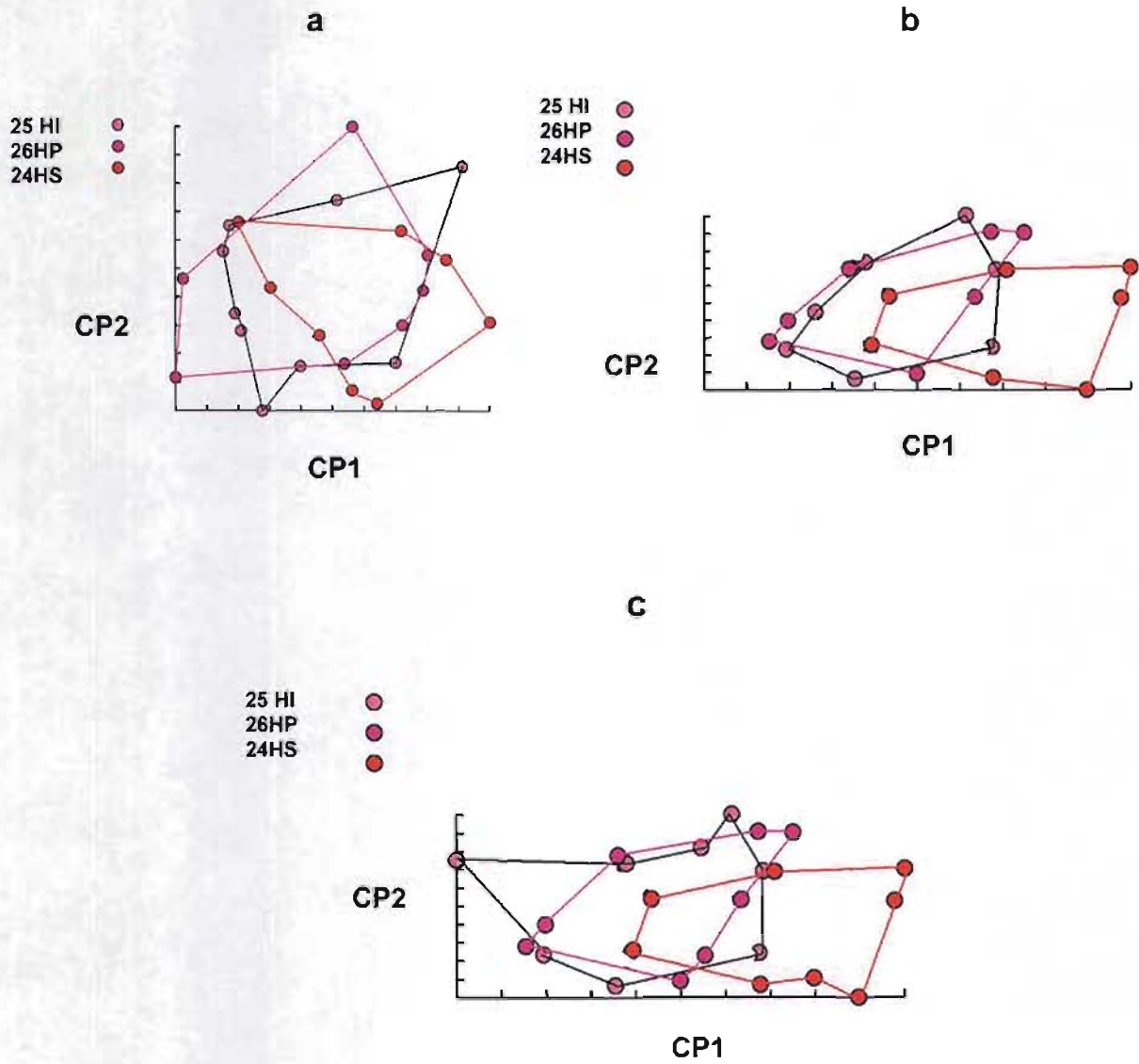


Figura 15. Análisis por componentes principales multigrupo de *T. pallidipennis* macho; (a) mediciones de cabeza, (b) mediciones de alas, (c) mediciones de cabeza y alas



En la figura 15 se representan los datos obtenidos para *T. pallidipennis* macho. El tamaño total (CP1) de las alas de las 3 poblaciones es similar (Fig 15a), mientras que en el de cabeza (Fig 15b) la población silvestre resultó ligeramente (no significativo) más grande que las poblaciones domésticas (intradomiciliaria y peridomiciliaria). Al combinar las mediciones de cabeza y alas las poblaciones se comportaron de una manera similar a cuando solamente se incluyen los datos de alas (Fig 15c)

Figura 16. Análisis por componentes principales multigrupo de *T. pallidipennis* hembra; (a) mediciones de cabeza, (b) mediciones de alas, (c) mediciones de cabeza y alas



En la figura 16 se representan los datos de *T. pallidipennis* hembra. El tamaño total de la cabeza (Fig 16a) es muy parecido en las poblaciones domiciliadas (intradomiciliaria y peridomiciliaria) mientras que el de la población silvestre es mayor. En lo que se refiere a las alas (Fig 16b) hay una mayor diferenciación en el tamaño entre las poblaciones domiciliadas y silvestre. Como en el caso de los machos al combinar las mediciones de cabeza y alas las poblaciones se comportaron de una manera similar a cuando solamente se incluyen los datos de alas (Fig 16c)

### 6.5 Análisis Discriminante con Tamaño Excluido

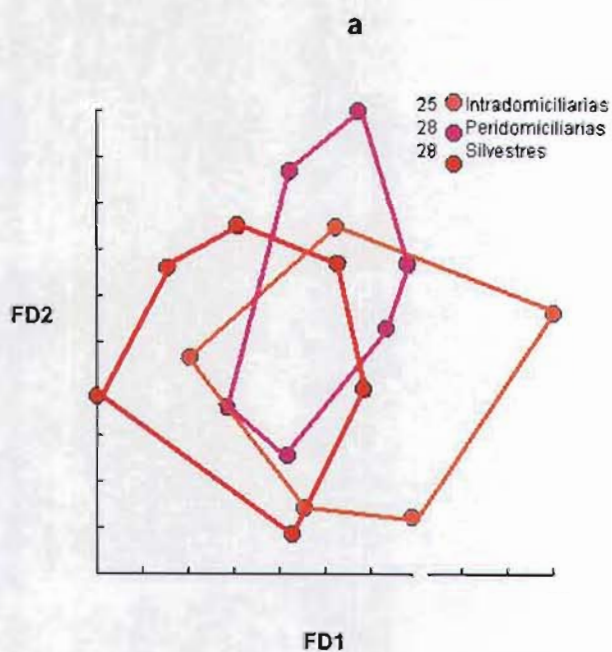
Se realizó el análisis discriminante (AD) excluyendo el tamaño, el cual informa sobre diferencias libres de tamaño, es decir, diferencias de forma.

La figura 17 representa los polígonos obtenidos después de aplicar el análisis discriminante a las tres poblaciones separándolas por género: hembras 17a, 17b y machos 17c, 17d. Se utilizaron los caracteres seleccionados de alas y cabeza (17a y 17 c) de las tres poblaciones de *T. pallidipennis* y se incluyó a *T. phyllosoma* como grupo externo (17b y 17d). Se observa que el Factor Discriminante 1 (FD1) separa el grupo externo de los demás grupos (b, d).

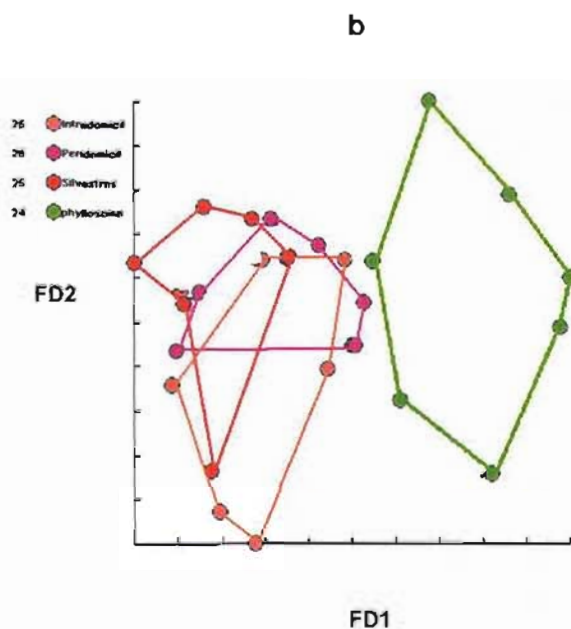
En el caso de las hembras cuando están las tres poblaciones de *T. pallidipennis* solas (17a) se empieza a ver una ligera separación entre ellas con el Factor Discriminante 1 y con el 2 (FD1, FD2), cuando se agrega al análisis el grupo externo también se ve que empieza a haber una ligera separación de las tres poblaciones (17b) con el factor discriminante 2.

No sucede lo mismo con las poblaciones de machos (17c, 17d) ya que no se ve ninguna separación entre las tres poblaciones con y sin grupo externo.

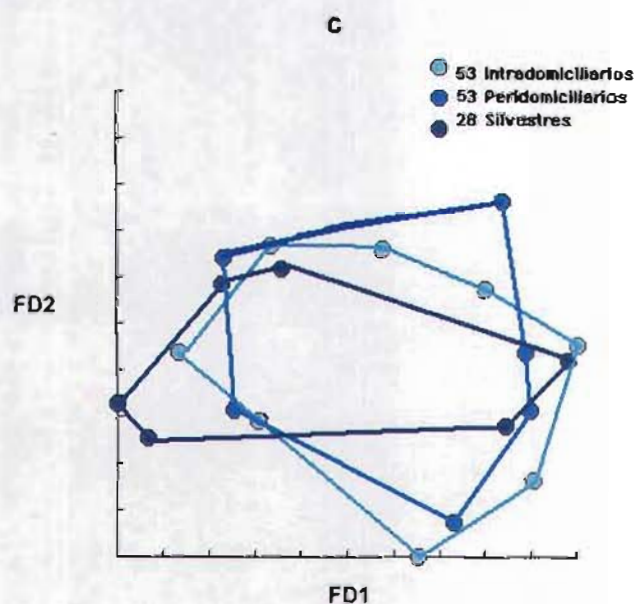
Fig. 17 Análisis discriminante tamaño excluido de *T. pallidipennis* hembras y machos; (a) hembras sin grupo externo, (b) hembras con *T. phyllosoma* como grupo externo, (c) machos sin grupo externo, (d) machos con *T. phyllosoma* como grupo externo



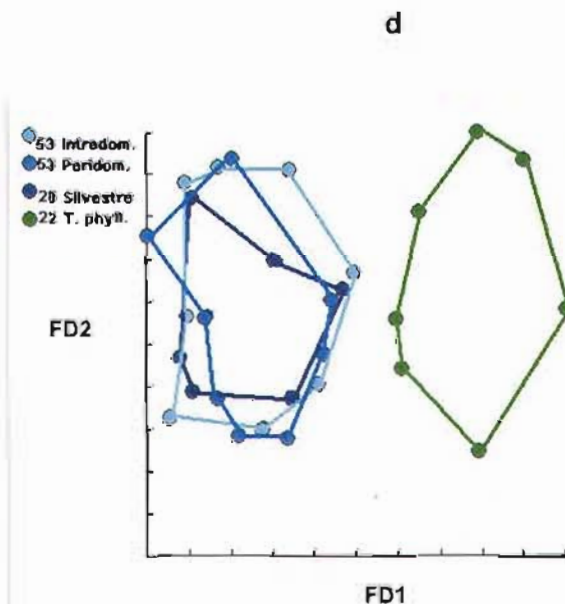
Factor 1 = desde -3.575 a 4.254 - Factor 2 = desde -3.265 a 2.528



Factor 1 = desde -3.725 a 5.954 - Factor 2 = desde -3.508 a 3.118



Factor 1 = desde -2.431 a 2.706 - Factor 2 = desde -3.005 a 4.099



Factor 1 = desde -3.384 a 7.057 - Factor 2 = desde -3.595 a 2.782

## 6.6 DIMORFISMO SEXUAL

Los resultados del dimorfismo sexual en las tres poblaciones de *T. pallidipennis* se presenta en el cuadro 5.

Cuadro 5. Dimorfismo sexual en *T. pallidipennis* del estado de Morelos

### a) Población Intradomiciliaria

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
T.pall hembra	Promedio	86.20	64.98	76.44	86.64	34.46	19.36	13.56	35.64	79.42	74.43	144.52
	Desv. St.	4.14	4.28	4.69	5.03	2.64	2.01	1.61	2.79	3.39	3.79	7.15
T.pall macho	Promedio	88.52	66.51	79.13	89.42	35.79	21.04	13.65	37.45	81.67	76.10	150.56
	Desv. St.	4.91	4.11	4.92	5.32	3.17	2.05	1.64	2.88	4.76	4.53	7.52
Macho=hembra	Prueba F	S	S	S	S	S	S	NS	S	S	S	S

S= diferencias significativas

NS= diferencias no significativas

### b) Población peridomiciliaria

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
T.pall hembra	Promedio	87.47	66.45	78.36	88.42	34.95	19.82	13.71	36.23	78.91	74.36	146.48
	Desv. St.	2.61	2.97	3.76	4.10	2.63	2.27	1.58	3.07	3.53	3.80	5.77
T.pall macho	Promedio	88.30	66.14	78.36	88.96	36.13	20.66	13.96	37.38	79.75	74.41	148.54
	Desv. St.	4.82	4.01	4.37	4.67	3.40	1.50	1.60	2.37	4.15	4.14	7.39
Macho=hembra	Prueba F	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	S	NS	NS	S

S= diferencias significativas

NS= diferencias no significativas

### c) Población silvestre

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
T.pall hembra	Promedio	91.53	68.80	82.48	93.36	36.97	22.21	14.93	39.16	83.46	77.88	154.43
	Desv. St.	4.28	3.70	4.34	4.84	2.55	2.20	1.89	2.46	3.92	3.31	6.54
T.pall macho	Promedio	89.91	67.46	80.54	90.91	37.19	22.02	14.04	38.30	82.64	77.20	153.48
	Desv. St.	5.38	4.29	5.24	5.63	2.97	2.17	1.68	2.97	5.03	4.51	8.70
Macho=hembra	Prueba F	NS	S	S	S	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS

S= diferencias significativas

NS= diferencias no significativas

El tamaño de las alas de *T. pallidipennis* hembras y machos es mayor en las poblaciones silvestres que en las poblaciones domiciliadas

(intradomiciliarias y peridomiciliarias) (Cuadro 5). Esta diferencia a simple vista es mayor entre hembras que entre machos.

En la población de *T. pallidipennis* intradomiciliaria (cuadro 5a) el tamaño de las alas de los machos es mayor que el de las hembras, y las diferencias que existen son significativas para todos los caracteres excepto para el carácter G en el que no hay diferencia significativa entre los dos géneros. En la población peridomiciliaria (Cuadro 5b) no hay diferencias significativas entre las mediciones de las alas de machos y hembras, excepto para las mediciones E, F, H y K para las cuales existe una diferencia significativa, siendo el tamaño de estas mediciones mayor en machos que en hembras. En la población silvestre (Cuadro 5c) el tamaño de las alas es mayor en hembras que en machos y esta diferencia es significativa para las mediciones B, C, D y G.

## 6.7 ASIMETRIA

En el cuadro 6 se presentan los resultados de asimetría de alas obtenidos después de aplicar la prueba de Kruskal-Wallis.

Cuadro 6. Asimetría de alas de *T. pallidipennis* del Estado de Morelos

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Hembras Intradomicil.	NO	NO	NO	AD	AS	AD	NO	NO	NO	NO	NO
Hembras Peridomicil.	AD	AD	AD	AD	AS	AF	AD	AD	AD	NO	NO
Hembras Silvestres	AD	AD	AD	AD	AF	NO	AD	NO	AD	NO	NO
Machos Intradomicil.	AD	AD	AD	AD	AS	AF	AF	NO	AD	NO	NO
Machos Peridomicil.	AD	AD	AD	AD	AF	NO	NO	NO	AD	NO	NO
Machos Silvestres	AD	AD	AD	NO	AF	AD	AD	AD	AD	NO	NO

NO- no hubo ningún tipo de asimetría

AD- asimetría direccional

AS- asimetría no direccional, antisimetría

AF- asimetría no direccional, fluctuante

Se encontró asimetría, en las 3 poblaciones de *T. pallidipennis* machos y hembras, para la mayor parte de los caracteres de alas: a) asimetría direccional para los caracteres A, B, C, D e I para todas las poblaciones excepto para hembras intradomiciliarias, b) asimetría no direccional en el carácter E en todas las poblaciones, c) asimetría direccional y no direccional en el carácter F y G a excepción de las hembras intradomiciliarias que no presentaron asimetría en G y los machos peridomiciliarios que no presentaron asimetría en ninguno de los dos caracteres, d) en el carácter H solamente se encontró asimetría direccional en las poblaciones de hembras peridomiciliarias y machos silvestres, e) no se encontró asimetría en los caracteres J y K en ninguna de las poblaciones.



## 7.- DISCUSIÓN

En cada estado de la República Mexicana existen especies y poblaciones de triatomíneos con características epidemiológicas propias. En el estado de Morelos, *T. pallidipennis* es el vector más importante de la enfermedad y se ha encontrado tanto en hábitats domiciliados (intradomiciliarios, peridomiciliarios) como silvestres. En el presente estudio se caracterizaron a las poblaciones domiciliadas (intradomiciliaria y peridomiciliaria) y silvestres de *T. pallidipennis* provenientes de localidades con características geográficas (altitud >800 msnm) similares en el estado de Morelos mediante citogenética y morfometría. En ciertas especies de triatomíneos, se han observado cambios morfológicos y genéticos asociados con la adaptación del vector al hábitat silvestre o al hábitat domiciliado. Estos cambios pueden involucrar simplificación genética y morfológica, junto con una reducción en el tamaño y en el grado de dimorfismo sexual y una relajación de la simetría bilateral. (92,97,182,131,133,180)

En este estudio no se encontró ninguna diferencia significativa, en la infectividad por *T. cruzi*, entre las 3 poblaciones de *T. pallidipennis* estudiadas. Las tres poblaciones tuvieron altos porcentajes de infectividad: la intradomiciliaria 54.2%, la peridomiciliaria 51.8% y la silvestre 60.5%. Estos resultados indican que todas las poblaciones tienen alta capacidad para transmitir la enfermedad de Chagas, y son diferentes con lo encontrado por Cortés Jiménez (106) quien reporta 88% de infectividad en Cuernavaca. La infectividad por *T. rangeli*, fue también similar entre las poblaciones ya que no se encontró en las poblaciones intradomiciliaria o silvestre y solamente resulto infectada 4.9% de la población peridomiciliaria.

Mediante el análisis del comportamiento cromosómico durante la meiosis, se puede ver que las tres poblaciones estudiadas tienen las mismas características citogenéticas, y éstas son similares a las descritas anteriormente: a) un complemento citogenético  $2n=20+X_1X_2Y$  (144,156,183); b) un cromocentro heteropicnótico, visible durante la profase meiótica, formado por los cromosomas sexuales y un autosoma bivalente; c) un par autosomal que presenta bloques C terminales, d) un cromosoma sexual Y más grande ya

que es completamente heterocromático y los cromosomas sexuales X mas pequeños y negativos a heterocromatina C que se puede ver mediante la técnica de bandeado C (144).

La caracterización de esta especie reportada anteriormente (144) había sido realizada en ejemplares de *T. pallidipennis* provenientes de insectario. En un estudio citogenético, (Panzera, comunicación personal) realizado recientemente en poblaciones de *T. pallidipennis* provenientes del estado de Colima se ha encontrado un patrón citogenético diferente al de la población proveniente del estado de Morelos ya que no se encontraron autosomas con heterocromatina C. Las diferencias con las poblaciones reportadas aquí son posiblemente debidas a la dispersión genética y no características asociadas a caracteres de domesticación. En estudios realizados por Panzera (99,125) en diferentes poblaciones de *T. infestans* y de *T. sordida* provenientes de Brasil, con características geográficas, hábitat y capacidades vectoriales distintas, las poblaciones eran polimórficas en cuanto a la cantidad y disposición de heterocromatina C en los autosomas.

Se han realizado pocos estudios morfométricos de especies de triatomíneos mexicanas y ninguno se ha enfocado en poblaciones domésticas o silvestres de *T. pallidipennis* provenientes de las mismas zonas geográficas. En el presente estudio, se han utilizado las alas y las cabezas de los insectos para el estudio de morfometría porque son estructuras esenciales para los triatomíneos, además de que tienen las características de ser rígidas, se pueden preservar fácilmente después de disectarse, y dan puntos de medición precisos (184).

Los perfiles de Guillaumin demostraron que las poblaciones de *T. pallidipennis* de Morelos silvestres son mas grandes que las domiciliadas. El análisis de componentes principales multigrupo (ACPmg) no logró separar estos grupos, pero evidenció la tendencia hacia el mayor tamaño de las alas y de la cabeza de las poblaciones silvestres, seguidas por las peridomiciliarias y las intadomiciliarias. Se encontró que con la cabeza se diferenciaba mejor el tamaño de las 3 poblaciones en los machos. Mediante el análisis de componentes principales multigrupo (ACPmg), en el cual el CP1 nos refiere el tamaño de los individuos, se encontró lo mismo que con los perfiles de Guillaumin, lo que está de acuerdo con un estudio realizado por Harry (140)

con poblaciones de *Rhodnius prolixus*. En este último estudio se encontró que los organismos silvestres presentan dimensiones de alas, de cabezas y totales más grandes que los domésticos. Un tamaño menor puede reflejar un estado de adaptación más avanzado al ambiente doméstico.

El Análisis Discriminante (AD) en el que se utilizó tanto tamaño incluido como tamaño excluido, no revela diferencias de forma y conformación entre los individuos de las tres poblaciones lo que señala que las tres poblaciones son todavía muy similares. Estos resultados son diferentes con los obtenidos para *T. nítida* en Guatemala (185) y para *T. infestans* en Uruguay (186). Las diferencias pueden explicarse como el resultado del aislamiento derivado de condiciones geográficas, como diferencias en altitud o separaciones por barreras naturales que existen en el caso de las poblaciones de *T. nítida* y *T. infestans*. No existen estas barreras para *T. pallidipennis* de Morelos, lo que resulta en una hibridación frecuente entre poblaciones y por lo tanto las diferencias específicas son mucho menos aparentes.

Excluyendo el tamaño del individuo, no se encontró una diferenciación por FD1 ni por FD2 al analizar las alas o la cabeza por separado entre las 3 poblaciones de machos. De hecho, se logró una mejor diferenciación cuando se usaron los caracteres de alas y cabeza juntos; lo mismo sucedió con las hembras y en ellas es más clara esta diferenciación. Esto no está de acuerdo con lo reportado por Casini (179) y por Lehman (187), quienes estudiando especímenes de *Triatoma infestans* en Uruguay y de *Triatoma dimidiata* en México, respectivamente, encontraron que cuando se usan los caracteres de alas en un análisis discriminante en el que se excluye el tamaño alométrico, no es posible diferenciar poblaciones. Sin embargo, si se utilizan los caracteres de cabeza por sí solos, la distinción entre poblaciones es más clara. Esta polarización de grupos poblacionales no se manifestó en *T. pallidipennis* estudiada aquí, probablemente debido a que aún no existe suficiente diferenciación entre ellas.

En un estudio llevado a cabo analizando 3 poblaciones de *T. pallidipennis* del estado de Morelos con el gen NADH deshidrogenasa (ND4) y la subunidad ribosomal grande (16S rRNA) no se encontró una divergencia genética entre las poblaciones domésticas y silvestres, y se llegó a la conclusión de que las poblaciones domésticas (intradomiciliarias y

peridomiciliarias) y las silvestres siguen teniendo intercambio genético (188). Las pequeñas diferencias de tamaño y de forma, encontradas entre las poblaciones intradomiciliarias, peridomiciliarias y silvestres, que se ve principalmente en las hembras, sugieren que estas poblaciones se están empezando a diferenciar a pesar de mantener un flujo genético entre ellas. Esto se apoya en el estudio realizado por Ramsey (176) en el que encontraron que en el estado de Morelos, los ciclos silvestre y doméstico de *T. pallidipennis* se traslapan en los peridomicilios de las viviendas, en donde roedores pequeños mantienen poblaciones estables dentro de los nidos, y ofrecen posibilidad de continuidad para el flujo de triatomíneos entre áreas aledañas a la comunidad y el intradomicilio.

El dimorfismo sexual se manifiesta en muchas especies de triatomíneos, siendo las hembras más grandes que los machos (12). Cuando se analiza el tamaño total de los individuos de cada una de las 3 poblaciones de *T. pallidipennis* por separado, efectivamente las hembras son más grandes que los machos. Sin embargo, cuando se realiza el análisis solo de alas, se encuentra que el dimorfismo sexual para *T. pallidipennis* está relacionado con el hábitat de esta especie. En la población intradomiciliaria el tamaño de los caracteres de alas en los machos es mayor que en las hembras y las diferencias son significativas para todos los caracteres excepto uno (G). En la población peridomiciliaria, no se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos, para la mayor parte de los caracteres, excepto para E, F, H y K para los cuales las alas de los machos fue mayor que el de las hembras. En lo que se refiere a la población silvestre se encontró que el tamaño de las alas de las hembras es mayor que el de los machos y las diferencias son significativas para los caracteres B, C, D y G. Esta observación se hace por primera vez en poblaciones provenientes del mismo sitio geográfico con tres hábitats diferentes, ya que antes solamente en un trabajo realizado en *T. infestans* se encontró un dimorfismo sexual reducido al pasar de un hábitat silvestre a uno domiciliado (128). Otro estudio realizado en *Rhodnius domesticus* (131) encontró una reducción significativa en el dimorfismo de la cabeza debido a una disminución en el tamaño, que fue mayor en las hembras que en los machos. Lo mismo se encontró en *R. pallescens* (181). Estos datos nos indican que cuando la población es silvestre, es la hembra la que tiene una

mayor necesidad de utilizar sus alas para la búsqueda de alimento y pareja y al llegar al hábitat domiciliado ya no las necesita ya que tiene alimento y pareja en el mismo lugar por lo que hay un relajamiento en la presión evolutiva de las características de las alas. En contraste con lo anterior, en poblaciones silvestres de *P. geniculatus* criadas en el laboratorio no se encontró modificación del dimorfismo sexual de cabeza ni de alas después de 5 generaciones (189).

En el presente estudio, se encontró que en las tres poblaciones de *T. pallidipennis* del estado de Morelos, se presenta asimetría de alas, en ambos géneros, en la mayoría de los caracteres estudiados excepto en los caracteres J y K, los cuales son simétricos en las tres poblaciones. Estas poblaciones presentan en la mayor parte de los caracteres una asimetría direccional, lo que nos indica una asimetría de origen genético, y en pocos caracteres una asimetría fluctuante que es la que se ha reportado que aumenta con la domesticación de las especies (128). Probablemente la domiciliación de *T. pallidipennis* en Morelos sea muy reciente y por lo tanto todavía no encontramos asimetría de origen ambiental como es la asimetría fluctuante. Estos datos se pueden interpretar como que esta especie en general ha ido perdiendo su capacidad de vuelo, aún cuando se ha reportado que estos insectos llegan a entrar a los domicilios volando cuando hay fuertes corrientes de aire. En un estudio similar (Ramsey JM, comunicación personal) realizado con *T. pallidipennis* proveniente de los estados de Jalisco, Colima, Michoacán, Estado de México y Oaxaca, se encontró principalmente una asimetría direccional tanto en hembras como en machos, aunque en estas últimas poblaciones, se encontró una mayor cantidad de caracteres sin asimetría o con asimetría fluctuante.

La domiciliación reciente de esta especie en Morelos se refleja en que no se han encontrado diferencias entre las sensillas de las tres poblaciones (Catalá S, comunicación personal), como lo ha reportado Catalá para otras especies de triatomíneos. Se postula que la variación en el número de quimiorreceptores en las sensillas de los triatomíneos adultos está influenciado por factores que pueden ser externos, como el hábitat o la disponibilidad del alimento. En poblaciones de *T. infestans*, se ha encontrado una separación de

las formas silvestres de Cochabamba de Bolivia de las intradomiciliarias y peridomiciliarias de otras regiones de Bolivia (190).

La falta de diferenciación entre las poblaciones domésticas y silvestre tanto de infectividad por *T. cruzi*, citogenética y morfometría indica un flujo genético continuo, a pesar de poder medir ligeras diferencias con una infectividad mayor y un dimorfismo sexual acentuado especialmente en las hembras de hábitats silvestres.

## 8.- CONCLUSIONES

En poblaciones geográficamente discretas de *T. palidipennis* se encontró la siguiente:

- La citogenética no nos da información sobre un proceso de domesticación.
- El análisis de morfometría de alas y cabeza no logra diferenciar entre las poblaciones silvestres y domésticas, por lo tanto todo indica que las poblaciones domésticas de comunidades rurales y urbanas tienen un flujo genético continuo con las poblaciones silvestres.
- Los datos de infectividad con *T. cruzi* correlacionan con lo anterior y confirman que aún en ámbitos domésticos las chinches tienen una relación estrecha con reservorios silvestres.
- Si la domesticación implica una evolución de poblaciones vs oportunismo para ocupar un hábitat, todavía no hay barreras físicas o genéticas en las poblaciones estudiadas.

## 9.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- WHO. 1997. Progress 1995-1996: Thirteenth programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 112-123
- 2.- World Bank. World Development Report 1993. Investing in Health. New York, USA. Oxford University Press, 1993:329pp.
- 3.- Schmunis GA (1999). Iniciativa del Cono Sur. In Proceedings of the Second International Workshop in Population Biology and Control of Triatominae (Schofield CJ and Ponce C eds) pp.26-31. INDRE. Mexico City.
- 4.- Schmunis GA (1997) Tripanossomiase Americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminacao. In: Dias JCP & Coura JR (orgs) Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Um Manual Prático para o Clínico Geral. FIOCRUZ Editora, Rio de Janeiro. pp 11-24, World Bank (1993) World Development Report 1993. Investing in Health. Oxford University Press, New York 347 pp.
- 5.- Schofield CJ & Dias JCP 1991. A cost-benefit of Chagas disease control. Mem Inst Oswaldo Cruz 86:285-295.
- 6.- Dias JCP, Schofield CJ. 1999. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 94(Suppl.1):103-121.
- 7.- Guzmán-Bracho C. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. Trends Parasitol 17(8):372-376.
- 8.- Zeledón T, Rabinovich J. 1981. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vector Annu Rev Entomol 26:101.
- 9.- Briceño-León R. 1990. La casa enferma. Sociología de la enfermedad de Chagas. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana y Consorcio de Ediciones Capriles C.A., Caracas, Venezuela 149pp.
- 10.- Salvatella R, Rodríguez MEF, Curto de Casas SI, Barata JMS, Carcavallo RU. 1998. Habitats and related fauna. B:Human environment: dwellings in peridomiliary sites, pp. 601-619 en (Carcavallo RU, Galindez Girón I, Jurberg J, Lent H eds) Atlas of Chagas disease vectors in America. Vol II, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.



- 11.- Moreno AR, Carcavallo RU. 1999. An ecological approach to Chagas disease epidemiology pp 981-1016. Feeding sources and patternspp:561-600 en (Carcavallo RU, Galindez Girón I, Jurberg J, Lent H eds) Atlas of Chagas disease vectors in America. Vol II, Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.
- 12.- Lent H, Wygodzinsky P. 1979 Revisión of the Triatominae (Hemiptera:Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. Bulletin of the American Museum of Natural History 163: 127-520.
- 13.- Schofield CJ 1988. Biosystematics of the Triatominae in: Biosystematic of Haematophagous Insects. (Ed M.W. Service) Systematics Association Special Volume 37. Clarendon Press, Oxford pp 284-312.
- 14.- Miles MA et al. 1981. Chagas disease in the Amazon basin III. Ecotopes of the triatomine bug species (Hemiptera:Reduviidae) from the vicinity of Belen. Para State, Brazil. J Med Entomol 18:266-278.
- 15.- Monteiro FA, Escalante AA, Beard B. 2001. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. Trends Parasitol 17(7):344-347.
- 16.- Dias JCP. Recursos e Estratégias da Luta Anti-Chagásica nas Américas. Visao Crítica, Situacao Atual e Perspectivas. 1999. En: Proceedings of the Second International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae, Tegucigalpa, Honduras. INDRE, Mexico City, 131pp; pag 13-24 Ed. Schofield & Ponce C (editors).
- 17.- Dias JCP. Las Iniciativas Intergubernamentales y el presente contexto del control de la enfermedad de Chagas.2002 En:Proceedings of the Fourth International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae, . CIMPAT Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia 194pp pag; 63-72. Ed. Guhl F & Schofield CJ (editors).
- 18.- Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America. A review. Mem Inst Oswaldo Cruz 97(5):603-612.

- 19.- Aguilar VHM, Abad-Franch F, Racines VJ, Paucar CA. 2001. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(suppl 1):387-393.
- 20.- Dujardin JP, Schofield CJ, Panzera F. 2000. Les Vecteurs de la Maladie de Chagas. *Recherches Taxonomiques, Biologiques et Génétiques, Académie Royale des Sciences d'Outre Mer, Classe des Sciences Naturelles et Médicales. N.S.*, 24(5): 162pp.
- 21.- Mazzotti L. 1940. Dos casos de enfermedad de Chagas en el estado de Oaxca. *Gac Med Mex* 70:417-420
- 22.- Díaz E, Perrin TG, Brenes N. 1947. Nota previa sobre las primeras comprobaciones serológicas de la enfermedad de Chagas en México. *Arch Inst Cardiol Mex* 17:20-24.
- 23.- Mazzotti L, Dias E. 1949. Resumen de los datos publicados sobre la enfermedad de Chagas en México. *Rev Soc Mex Historia Natural* X:103-111.
- 24.- Aceves S. 1950. Un caso probable de miocarditis chagásica. Primer caso presentado en México. *Acad Natl de Medicina*.
- 25.- Tay J. 1980. La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Salud Publica Mex* XXII: 409-450.
- 26.- Biagi FF, Arce-Gómez E. 1965. Los dos primeros casos de miocarditis chagásica comprobados en México. *Arch Inst Cardiol Mex* 35:611-619.
- 27.- Rotberg T, Bassoti R, Caffroni J, Gorodezky M, Estandía A. 1976. Miocardiopatía Chagásica. Caso Clínico. *Arch Inst Cardiol Mex* 46:336-341.
- 28.- González-Hernández A, Serafín F, Rosano-Pérez F. 1972. Un nuevo caso de enfermedad de Chagas en México. *Gac Med Mex* 103:167.
- 29.- Quintanal AR, Zavala BJ, Rodríguez LM. 1975. La enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán, México. *Rev Invest Clin* 27:255.
- 30.- SSA, DGMP, 1994
- 31.- Velasco-Castrejón O, Guzmán-Bracho C. 1986. Importancia de la enfermedad de Chagas en México. *Rev Latinoam Microbiol* 28:275-283

- 32.- Tay J, Schenone H, Sánchez JT, Robert L. 1992. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. *Bol Chil Parasitol* 47:43-53.
- 33.- Vallejo AM, Reyes PA. 1996. Tripanosomiasis americana: ¿un problema sociomédico en México? *Arch Inst Cardiol* 66:95-97.
- 34.- Cortez JM, González-Hermosillo JA, Reyes PA, Martínez-Ríos MA, Velasco-Castrejón O, De la Torre R. 1986. Cardiomiopatía chagásica en México. *Arch Inst Cardiol Mex* 56:499-505.
- 35.- Salazar-Schettino PM, Ruíz-Hernández AL, Haro-Arteaga I, Tay-Zavala J, Gutiérrez-Quiroz M. 1989. Serología y electrocardiografía en jóvenes de área endémica de enfermedad de Chagas. *Rev Med IMSS (Mex)* 27:59-65.
- 36.- Huante-Magaña R, Piza-Bernal R, Tabárez-Hernández J, Liera-Romero F, Mata-Carbajal E, Matadamas N. 1990. Enfermedad de Chagas en Guerrero. Reporte de dos casos confirmados con xenodiagnósticos. *Salud Publica Mex* 32:320-324.
- 37.- Barrera-Pérez MA, Rodríguez-Félix ME, Guzmán-Marín E, Zavala-Velázquez JE, 1992. Prevalencia de la enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán. *Rev Biomed* 3:133-139.
- 38.- Velasco-Castrejón O, Valdespino JL, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Guzmán-Bracho C, Magos C. 1992. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Publica Mex* 34(2):186-196.
- 39.- Guzmán Bracho García L, Verdugo J, Guerrero S, Torres M, Ramírez C. 1998. Riesgo de Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea en México. *Rev Panam Salud Publica* 4(2):94-99.
- 40.- Moreno RM, Sánchez L, Muñoz L, Monteón VM, Reyes PA. 2001. Cardiopatía chagásica en Tehunatepec. Informe Preliminar. *Arch Cardiol Mex* 71(1):43-49.
- 41.- Monteón-Padilla VM, Vargas-Alarcón G, Vallejo-Allende M, Reyes PA. 2002. Miocardiopatía dilatada específica. La cardiopatía chagásica ríñonica en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. *Arch Cardiol Mex* 72(Supl 1):S148-S152.

- 42.- Trujillo CF, Lozano KF, Soto GMM, Hernandez GR. 1993. The prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors in the state of Jalisco, México. *Rev Soc Bras Med Trop* 26(2):89-92.
- 43.- Trujillo CF, Villanueva YMA, Soto GM, Raygoza MA, Jiménez CA. 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(6):591-596.
- 44.- Ramsey JM, Alvear AL, Ordóñez R, Muñoz G, García A, López R, Leyva R. Risk factors associated with infestation by *Triatoma pallidipennis* in the Cuernavaca metropolitan area, México. *Med Vet Entomol* (en prensa).
- 45.- Goldsmith R, Kegan L, Zárate R, Reyes-González M, Cedeño J. 1979. Estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca México. *Bol Sanit. Panam* 87:1-17.
- 46.- Gloss G, Barrera MR, Monteon VM, Reyes PA. 1990. American trypanosomiasis and chronic Chagas cardiopathy at the "Ignacio Chaves" National Institute of Cardiology. *Arch Inst Cardiol Mex.* 60(3): 261-266.
- 47.- Becerril-Flores MA, Valle-de la Cruz A. 2003. Descripción de la enfermedad de Chagas en el Valle de Iguala Guerrero, México. *Gac Med Mex* 139(6):539-544.
- 48.- Ramsey JM, Ordóñez R, Tello-López A, Pohls JL, Sánchez-Cordero V Peterson AT. Chagas disease in Mexico: morbidity, mortality, transmission risk areas, and disease burden. *Emerg Dis* (enviado).
- 49.- Gilles H.M. 1999. Protozoal diseases. Arnold Publishers. Great Britain. 9: 306-375.
- 50.- González CS, Durante IE. Agente Etiológico: *Trypanosoma cruzi*. 1984 En: Storino R y Milei J. Eds. Enfermedad de Chagas. Mosby-Doyma. Buenos Aires. Pag: 31-40.
- 51.- De Souza W, Porto CI, Mimada K, Cunha ESL. 2000. Two special Organelles found in *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cien* 72(3):421-432.

- 52.- Devera R, Fernandes O, Rodriguez CJ. 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex?. A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in Vitro culturing and mice infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 98(1):1-12.
- 53.- Miles MA, Lanham SM, De Souza AA, Póvoa M. 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Trans R. Soc Trop Med Hyg 74:221-237.
- 54.- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc Natl Acad Sci USA 83:115-119
- 55.- Souto RP, Fernandes O, Macedo C, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 83:141-152.
- 56.- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. 2000. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. Parasitology 120:513-526.
- 57.- Barnabé et Brenière, 1999, In Chagas La Enfermedad en Bolivia, Conocimientos Científicos al Inicio del Programa de Control, 1998-2002, Julio R. Alfred Cassab et al. Copyright, Ediciones Gráficas "E. G.", La Paz, Bolivia, p 209-215.
- 58.- Brisse S, Barnabe C, Banuls AL, Sidibe I, Noel S, Tibayrenc M. 1998. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Mol Biochem Parasitol. 1998 May 1;92(2):253-63
- 59.- Bosseno MF, Barnabé C, Magallón-Gastélum E, Lozano-Kasten F, Ramsey J, Espinoza B, Breniere SF. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. J Clin Microbiol 40(2): 627-632.
- 60.- Espinoza B, Vera-Cruz JM, González H, Ortega E, Hernández R. 1998. Genotype and virulence correlation within Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients. Acta Tropica 70:63-72
- 61.- Lauria-Pires L, Teixeira ARL. 1996. Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. Am J. Trop. Med. Hyg 55:304-310.

- 62.- Solari A, Wallace A, Ortíz S, Venegas J, Sánchez G. 1998. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean insect vectors, *Exp Parasitol* 89:312-322.
- 63.- Revollo S, Ourry B, Laurent JP, Bernabe C, Quesney V, Carriere V. 1998, *Trypanosoma cruzi*: Impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp Parasitol* 89:30-39
- 64.- Pereira M,; Does *Trypanosoma cruzi* modulate infection by inherent positive and negative control mechanisms?. En "The Biology of Parasitism ". MBL lectures in biology, Vol 9, p. 105, 1988. Eds. England, P.; Sher, A. Alan R.. Liss. Inc, New York.
- 65.- Isola DE González CS. 1994. Vectores Transmisores: Triatomíneos, "Vinchucas" en: Enfermedad de Chagas. Rubén Storino-José Milei. Ed. Mosby-Doyma, Buenos Aires, pp41-50.
- 66.- Brack C: Elektronmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. Untr besonderes Verucksichtigung der Entwicklungsformen im ubertrager *Rhodnius prolixus*. 1968 *Acta Tropica* (Basel)25:289.
- 67.- D'Alessandro A: Relación huésped-parásito en *T. rangeli*. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Cap XXI p. 269. 1985. En factores biológicos y ecológicos de la enfermedad de Chagas. Eds. Carcavallo R; Rabinovich J, Tonn R.; Tomo II (Public. Serv. Nac. Chagas) Argentina.
- 68.- The Protozoa. Introduction to protozoology. John N. Farmer. The C.V. Mosby Company. St. Louis. Toronto, London. 1980.
- 69.- OPS/WHO. 1998. Tratamiento etiológico de la Enfermedad de Chagas. Conclusiones de una Consulta Técnica. Fundación Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil).
- 70.- Marseden PD 1996. Manson's tropical diseases. 20<sup>th</sup>, edition. London:WB Saunders Company; 1197-1212
- 71.- Reyes P.1984. Enfermedad de Chagas en México. *Arch. Inst. Cardiol Mex.* 54:1-2.

- 72.- Carrasco HA, Alarcon M, Olmos L, Burguera J, Burguera M, Dipaolo A. 1997. Biochemical characterization of myocardial damage in chronic Chagas' disease. *Clin Cardiol* 20:865-869.
- 73.- Baig MK, Salomone O, Caforio AL, Goldman JH, Amuchastegui M, Caiero T. 1997. Human chagasic disease is not associated with an antiheart humoral response: *Am J Cardiol* 79:1135-1137.
- 74.- Kalil J, Cunha-Neto E. 1996. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitol Today* 12:396-399.
- 75.- Ferrar I, Levin MJ, Wallukt G, Elies R, Lebsgue D, Chiale P et al. 1995. Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein PO of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor. *J Exp. Med* 182:59-65.
- 76.- Cunha-Neto E, Coehlo V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. 1996. Autoimmunity in Chagas' disease: Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiopathy patient. *J Clin Invest* 98:1709-1712
- 77.- Vermelho AB, de Meirelles M d N, Pereira MC, Pohlentz G, Barreto-Bergter E. 1997. Heart muscle cells share common neutral glycosphingolipids with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 64:131-143
- 78.- Gazzinelli RT, Talvani A, Cmargo MM, Santiago HC, Oliveira MA, Vieira LQ. 1998. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. *Braz J Med Biol Res* 31:89-104.
- 79.- Reed SG. 1998 Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. *Chem Immunol.* 70:124-143.
- 80.- Carcavallo RV; Rabinovich JE; Tonn RJ: 1985 Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas en Enfermedad de Chagas. Rubén Storino-José Milei. Mosby. Doyma Argentina, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS
- 81.- WHO, 2002 World Health Organization. Control of Chagas disease, WHO Technical Report Series, 2002. 905:108pp.
- 82.- Schmunis GA. 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease: Status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion.* 31:547-557.

- 83.- Figueroa DR. 1998; Riesgos de transición de enfermedades infecciosas por transfusión. *Ginecol Obstet Mex.* 66:277-283.
- 84.- Schmunis, G. 1984. Chagas´disease and blood transfusion. En "Infection, immunity and blood transfusion". Eds. Dodd R.; Barker L New York, Alan R. Liss p. 127.
- 85.- González Cappa, S; López Blanco O.; Múller L; Cavalli N; Niño R; Freilij H: 1991. Chronic intracellular protozoan infections and kidney transplantation. *Transplantation* 52: 377.
- 86.- WHO (1991) Chagas Disease Control. WHO Technical Report Series 811, 69pp
- 87.- Tonn, R. 1988. Review of recent publications on the ecology, biology and control of vectors of Chagas´disease. *Rev Arg Entomol* 20 (Supl):4.
- 88.- Del Ponte E. 1958. Manual de Entomología Médica y Veterinaria Argentina. Ediciones Librería del Colegio. Buenos Aires, CapXI, p. 84.
- 89.- Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvao C. 2000. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera :Reduviidae). Proposals for Taxonomic arrangements. *Entomología y Vectores* 7(Suppl1):30.
- 90.- 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.
- 91.- Schofield CJ. 1994. Triatominae. Biology and Control. W. Sussex: Eurocommunica Publications,77pp.
- 92.- Marcilla A, Bargues MD, Ramsey JM, Magallon-Gastelum E, Salazar-Schettino PM, Abad-Franch F, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. 2001. The ITS-2 of the nuclear rDNA as a molecular marker for populations, species and phylogenetic relationships in Triatominae (Hemiptera:Reduviidae), vectors of Chagas disease. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 18(1):136-142.
- 93.- Payne F. 1909. Some new types of chromosome distribution and their relation to sex. *Biol. Bull.* 16:119-166
- 94.- Lyman DF, et al. 1999. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med and Hyg* 60:377-386.



- 95.- Ryckman RE, Archbold EF. 1981. The Triatominae and Triatominae-borne trypanosomes of Asia, Africa, Australia and the East Indies. Bull Soc Vector Ecologists 6:143-166.
- 96.- Zeledón, R. 1975. Effects of Tiatomine behavior on trypanosoma transmission. In: New approaches in American tripanosomiasis research. PAHO Sci. Publ. N° 318.
- 97.- Dujardin JP, Bermudez H, Casini C, Schofield CJ, Tibayrenc M (1997a). Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) in Bolivia. J Med Entomol 34:544-552.
- 98.- Dujardin JP, Tibayrenc M, Venegas E, Maldonado L, Desjeux P, Ayala F. (1987) Isoenzyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteropetra:Reduviidae) in Bolivia. J med Entomol. 24:40-45.
- 99.- Panzera F, Alvarez F, Sánchez-Rufas J, Pérez R, Suja JA, Scvortzoff E, Dujardin JP, Estramil E, Salvatella R. 1992. C-heterochromatin polymorphism in holocentric chromosomes of *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae). Genome 35:1068-1074.
- 100.- Tay J, de Biagi AM. 1964. Localidades nuevas de triatominos mexicanos y su infección natural por Trypanosoma cruzi. Rev Fac Med (Mex) 6:305-311.
- 101.- Ibañez-Bernal S, Paz-odríguez R.1999. En: Schofield CJ, Ponce C (editors). Proceedings of the Second Internatinal Workshop on Population Genesticas and Control of Triatominae, Tegucigalpa, Honduras. INDRE, Mexico City, 131pp.
- 102.- Ramsey J, Ordóñez R, Cruz-Celis A, Alvear AL, Chavez V, López R, Pintor JR, Gama F Carrillo S; 2000. Distribution of domestic Triatominae and stratification of Chagas Disease transmisión in Oaxaca, México. Med Vet Entomol 14:19-30.
- 103.- Ramsey JM. 2002. México: La tansmisión de la enfermedad de Chagas en México. En: Proceedings Fourth Internatinal Workshop on population genetics and control of Triatominae. Ed. Felipe Guhl, CJ Schofield. Pub CIMPAT, Universidad de los Andes, Bogota, 184pp.
- 104.- Guzmán-Marín E. 1990. Los transmisores de la enfermedad de Chagas. Rev. Biomed I.144-153.

- 105.- Magallón-Gastélum E, Magdaleno-Peñaloza NC, Katthain-Duchateau G, Trujillo-Contreras F, Lozano-Kasten FJ, Hernández-Gutiérrez RJ. 1998. Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera:Reduviidae:Triatominae), en el estado de Jalisco, México. Rev. Biomed 9:151-157.
- 106.- Cortés-Jiménez M, Noguera-Torres B, Alejandre-Aguilar R, Isita-Tornell L, Ramírez-Moreno E. 1996. Frequency of triatomines infected with *Trypanosoma cruzi* collected in Cuernavaca city, Morelos, México. Rev Latinoam Microbiol 38:115-119.
- 107.- Ramsey JM, Alvear AL, Ordóñez R, Muñoz G, García A, López R, Leyva R. Risk factors associated with infestation by *Triatoma pallidipennis* in the Cuernavaca metropolitan area, México. Med Vet Entomol (en prensa).
- 108.- Domínguez Vazquez A, Ricardez Esquinca JR, Espinoza Medinilla E. 1990. Estudio de reservorios silvestres del *Trypanosoma cruzi* en la reserva ecológica de "El Zapotal", Chiapas, México. Bol Chil Parasitol 45:3-8.
- 109.- Zavala-Velázquez J, Barrera-Pérez M, Rodríguez-Félix ME, Guzmán-Marín E, Ruiz-Piña H. 1996. Infection by *Trypanosoma cruzi* in mammals in Yucatán, Mexico: a serological and parasitological study. Rev. Inst. Med Trop Sao Paulo 38:289-292.
- 110.- Ruiz-Piña HA, Abán Cauich AS, Rosado-Barrera ME, Arjona-Torres AD, Mendoza-Camargo LA. 1997. Natural infection by *Trypanosoma cruzi* in *Didelphis virginiana* in Yucatan, Mexico. Proc Seventh Int Theriological Congress, Acapulco. México: 286.
- 111.- Velasco-Castrejón O et al. 1994. Enfermedad de Chagas. In: Enfermedades Tropicales en México, Diagnóstico, Tratamiento y Distribución Geográfica (Valdespino J.L. et al eds) pp:279-292. INDRE.SSA.
- 112.- Species differentiation in the phyllosoma complex (Hemiptera, Triatominae).
- 113.- Alejandre-Aguilar R, Noguera-Torres B, Cortés-Jiménez M., Jurberg J, Galvao C, Carcavallo R. 1999. *Triatoma bassolsae* sp n do México, com

- uma chave para as espécies do complexo "phyllosoma" (Hemiptera:Reduviidae). Mem Inst. Oswaldo Cruz; 94(3):353-359).
- 114.- Mazzotti L, Osorio MT. 1942. Cruzamientos experimentales entre varias especies de Triatomas. Rev. Mex. Med. XXII(412): 215-222.
  - 115.- Flores A, Magallón GE, Bosseno MF, Ordóñez R, Lozano KF, Espinoza B, Ramsey J, Brenière FS. 2001. Isoenzyme variability of five principal triatomine vector species of Chagas disease in Mexico. Infection, Genetics and Evol 1:21-28.
  - 116.- Brenière SF, Taveira B, Bosseno MF, Ordóñez R, Lozano-Kasten F, Magallón-Gastélum E, Ouaiissi A, Ramsey J. 2003. Preliminary Results of Tandom Amplification of Polymorphic DNA among Triatominae of the *phyllosoma* Complex (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 98 (8):1033-1038.
  - 117.- García AL, Carrasco HJ, Schofield CJ, Stothard JR, Frame IA, Valente SAS, Miles MA (1998) Random amplification of polymorphic DNA as a tool for taxonomica studies of triatomine bugs (Hemiptera:Reduviidae). Journal of Medical Entomology 35:38-45
  - 118.- Savage JM. Evolución, 2a Ed. Compañía Editorial Continental. México 175pp.
  - 119.- Mettler LE, Gregg TG.1079. Genetica de las Poblaciones y Evolución. Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana S. A. De C. V. México. 245 pp
  - 120.- Mayr E. 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
  - 121.- Van Valen L. 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. Taxon 25(2/3):233-239.
  - 122.- Ridley M. 1989, The cladistic solkution to the species problem. Biology and Phylosophy 4:1-16.
  - 123.- Abalos JW, 1949. Sobre híbridos naturales y experimentales de Triatoma. An. Inst. Med. Regional 2(2):209-223.
  - 124.- Gorla DE, Jurberg J, Catala SS, Schofield CJ. 1993. Systematics of Triatoma sordida, T. guasayana and T. patagonica (Hemiptera, Reduviidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 88(3):379-85

- 125.- Panzera F, Homos S, Pereira J, Cestau R, Canale D, Diotaiuti L, Dujardin JP, Perez R (1997) Genetic variability and geographic differentiation among three species of triatomine bugs (Hemiptera:Reduviidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57: 732-739.
- 126.- Noireau F, Perez R, Macedo C, Panzera F. 1998. Genetic Variability in *Triatoma sordida* populations-role in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias ECLAT IV*. 105-108.
- 127.- Dujardin JP, Forgues G, Torrez M, Martínez E, Córdoba C, Gianella A (1998a). Morphometrics of domestic *Panstrongylus rufotuberculatus* in Bolivia. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92:219-228.
- 128.- Dujardin JP. 1998d. Population genetics and the natural history of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(Suppl II): 34-36.
- 129.- Catalá S. 1997. Antennal sensilla of Triatominae (Hemiptera, Reduviidae): a comparative study over five genera. *Intern J Insect Morphol Embriol* 26:67-73.
- 130.- Dujardin JP, Casini C. 1996b. Morphometry. pp 81-83. In Schofield CJ, Dujardin JP & Jurberg J. (eds), , *Proceedings of the International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*, Santo Domingo de los Colorado, Ecuador, Mexico, City, INDRE.
- 131.- Dujardin JP, Steindel M, Chávez T, Machane M, Schofield CJ. 1999. Changes in the head size sexual dimorphism of triatominae in the transition from natural to artificial habitats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:565-569.
- 132.- Pereira J, Dujardin JP, Salvatella R, Tibayrenc M. 1996. Enzymatic variability and phylogenetic relatedness among *Triatoma infestans*, *T. platensis*, *T. delpontei* and *T. rubrovaria*. *Heredity* 77:47-54.
- 133.- Dujardin JP, Panzera F, Schofield CJ. 1999b. Triatominae as a Model of Morphological Plasticity under Ecological Pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1):223-228.
- 134.- Monteiro FA, Perez R, Panzera F, Dujardin JP, Galvao C, Rocha D, Noireau F, Schofield C, Beard CB. 1999. Mitochondrial DNA variation of

- Triatoma infestans populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma* Mem Inst Oswaldo Cruz 94(Suppl1):229-38.
- 135.- Monteiro FA, Costa J, Sole-Cava AM. 1998. Genetic confirmation of the specific status of *Triatoma petrochii* (Hemiptera:Reduviidae: Triatominae). Ann Trop Med Parasitol 92(8):897-900.
- 136.- Guhl F (editor). 2002. Proceedings of the Fourth International Workshop on Population genetics and Control. Cartagena de Indias, Colombia. Universidad de los Andes, Bogota. 184pp.
- 137.- Almeida-Artigas RJ, Barges MD, Más-Coma S . 2000. ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. J. Parasitol 86:537-544.
- 138.- Jarne P, Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends Ecol. Evol 11:424-429.
- 139.- Barges MD, Marcilla A, Ramsey JM, Dujardin JP, Schofield CJ, Mas-Coma S. 2000. Nuclear rDNA-based Molecular Clock of the Evolution of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae), Vectors of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 95(4):567-573.
- 140.- Harry M. et al 1992. Isozyme variability and differentiation between *Rhodnius prolixus*, *R. robustus* and *R. pictipes*, vectors of Chagas disease. Am J. Trop. Med Hyg 60:377-386
- 141.- Harry M, 1993. Isozymic data question the specific status of some blood-sucking bugs of the genus *Rhodnius*, vectors of Chagas disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87:492-493.
- 142.- Carlier L, et al. 1996. RAPD protocol for Triatominae. In Proceedings of the International Workshop on Population Biology and Control of Triatominae (Schofield CJ, et al eds) pp:81-83, INDRE, Mexico City.
- 143.- Pérez R, Panzera Y, Scafiezso S, Mazzella MC, Panzera F, Dujardin JP, Scvortzoff E. 1992b. Cytogenetics as a tool for triatomine species distinction (Hemiptera-Reduviidae). Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 87:353-361.

- 144.-Panzera F, Hornos S, Cestau R, Panzera Y, Pérez R. 1994. Comparative análisis of four mexican species of triatomines (Hemiptera:Reduviidae). Abstract XI Congreso Latinoamericano de Genética, México p.330
- 145.- Panzera F, Pérez R, Panzera T, Alvarez F, Scvortzoff E, Salvatella R. 1995a. Karyotype evolution in holocentric chromosomes of three related species of triatomines (Hemiptera:Reduviidae). *Chromosome Research* 3:143-150.
- 146.- Panzera F, Pérez R, Nicolini P, Hornos S, Costa J, Borges E, Diotaiutu L, Schofield JS. 2000. Chromosome homogeneity in populations of *Triatoma brasiliensis* Neiva 1911 (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). *Cad. Saúde Pública* 16(sup.2):83-88.
- 147.- Perez R, Panzera Y, Scafiezso S, Mazzella MC, Panzera F, Dujardin JP, Scvortzoff E. (1992), Cytogenetics as a Tool for Triatomine Species distinction (Hemiptera:Reduviidae). *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 87(3): 353-361.
- 148.- Pérez R (1996) Análisis cariológico de especies del género *Triatoma* (Hemiptera:Reduviidae), con énfasis en *Triatoma infestans*, principal vector de la enfermedad de Chagas en el Uruguay. Tesis de Maestría, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, 130 pp.
- 149.- Pérez R, Panzera F, Page J, Suja J, Rufas J (1997) Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* 5:47-56.
- 150.- Pinto-Soares RP, Barbosa SE, Dujardin JP, Schofield CJ, Moura A, Diotaiuti L. 1999. Characterization of *Rhodnius neglectus* form two regions of Brazil using isoenzymes, genitalia morphology and morphometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(2):161-166.
- 151.- Dujardin JP, et al. 1996a. Genetic analysis of *Triatoma infestans* following insecticide control interventions in central Bolivia. *Acta Tropica* 61:263-266.
- 152.- Santos Guerra M. *Introducao à Citogenética Geral*. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro pp 142. 1988.
- 153.- Schrader HS, Ris H. 1941. The diffuse spindle attachment of coccids verified by the mitotic behaviour of induced chromosoma fragment. *J. Exp. Zool* 87:429-456.

- 154.- Hughes-Schrader S, Schrader F. 1961. The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12:327-350.
- 155.- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- 156.- Ueshima N 1966. Cytotaxonomy of the Triatominae (Reduviidae :Hemiptera). *Chromosoma* 18:97-122.
- 157.- Ueshima N (1979) *Insecta* 6. Hemiptera II:Heteroptera. In: *Animal Cytogenetics* (Ed. B. John) Gebruder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- 158.- Panzera F, Scvortzoff E, Pérez R, Panzera Y, Hornos S, Cestau R, Nicolini P, Delgado V, Alvarez F, Mazzella M, Cossio G, Martínez M, Salvatella R (1998) Citogenética de Triatomos in *Atlas of Chagas Disease Vectors in the America* vol II (Eds. Carballo RU, Galindez Girón, Jurberg J, Lent H) FIOCRUZ, Rio de Janeiro pp 621-664.
- 159.- Panzera F, Pérez R, Hornos S, Panzera Y, Cestau R, Delgado V, Nicolini P. 1996. Chromosome Number in the Triatominae (Hemiptera-Reduviidae): a Review. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 91(4):515-518.
- 160.- Dujardin JP. *Curso: Morfometría Tradicional, Morfometría Geométrica y Biología Evolutiva*. Del 27 de septiembre al 7 de octubre de 1999 CRILAR, Anillaco Argentina.
- 161.- Falconer DS. 1981. *Introduction to quantitative genetics*.-Longman, London and New York, 300pp.
- 162.- Dos Reis SF, Pessoa LM, Strauss RE. (1990). Application of size-free canonical discriminant analysis to studies for geographic differentiation. *Brazilian Journal of Genetics* 13:509-520.
- 163.- Guillaumin M 1972. Etude biométrique des populations naturelles de *P. carlinar* Rbr et *P. ciazii* Rbr (Lep. Hesperidae). I. Estimation du taux de chevauchement des distributions statistiques de deux populations en relation avec la notion de distance taxonomique. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 115:505-548).
- 164.- Sokal RR, Rohlf JF. 1995. *Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3<sup>rd</sup>. Ed. New York: W.H. Freeman.
- 165.- Roussel Uclaf (1983) deltamethrin. Roussel Uclaf, Paris 414pp.

- 166.- Schofield CJ, Maudin I. 2001. Trypanosomiasis Control. International Journal for Parasitology 31:615-620.
- 167.- Segura E; Pérez A; Yanovsky J; Andrade J; Martini G.W. 1986 Disminución de la infección por *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) en jóvenes de Argentina. Bol Of. Sanit. Panam. 100:495.
- 168.- Salvatella R (1991) Aspectos de la introducción de *Triatoma infestans* (Klug 1834) en Uruguay. X Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP), Montevideo, Uruguay p.208.
- 169.- Dujardin JP, Bermudez H, Schofield CJ (1997b). The use of morphometrics in entomological surveillance of silvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. Acta Tropica 66:145-153.
- 170.- Dujardin JP, Bermudez H, Gianella A, Cardozo L, Ramos E, Saravia R, Quiroz K, Forgues G, Carazas R, Hervas D, Chavez T, Machane M, Martinez E, Torres M. 1999f. Uso de marcadores genéticos en la vigilancia entomológica de la enfermedad de Chagas pp 1157-169. En: Cassab JA, Noireau F, Guillén G (eds). La Enfermedad de Chagas en Bolivia. Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control 1998-2002. Ministerio de Salud y Previsión social OMS/OPS, IRD& IBBA; La Paz, 259pp.
- 171.- Almeida CE, Pacheco RS, Noireau F, Costa J. 2002. *Triatoma rubrovaria* (Blanchard,1843) (Hemiptera :Reduviidae) Isoenzymatic and chromatic patterns of five populations from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 97(6):829-834.
- 172.- Abalos J. 1972. En: Enfermedad de Chagas. Rubén Storino-José Milei. Mosby. Doyma Argentina.
- 173.- Zárate LG, Zárate RJ. A checklist of the Triatominae (Hemiptera:Reduviidae) of Mexico. Int J of Entomology. 1985. 27(1-2):102-127.
- 174.- Vidal-Acosta V, Ibañez-Bernal S, Martínez-Campos C, Infección Natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. Salud Pública de México 2000, 42(6): 496–501.
- 175.- Bautista N L, García de la Torre GS, de Haro AI, Salazar SP. (1999) Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera:Reduviidae) as a vector of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida:Trypanosomatidae) in the State of



- Morelos, Mexico, and possible ecotopes. *J of Medical Entomology* 36(3):233-235.
- 176.- Ramsey JM, Cruz-Celis A, Salgado L, Espinosa L, Ordóñez R, López R, Schofield CJ. 2003. Efficacy of Pyrethroid Insecticides against domestic and peridomestic populations of *Triatoma pallidipennis* and *Triatoma barberi* (Reduviidae:Triatominae) vectors of Chagas´disease in Mexico. *J Med Entomol* 40 (6): 912-920.
- 177.- Panzera F, Pereira J, Pereira A, Alvarez F, Dutour R, Pérez R, Salvatella R, Scvortzoff E (1988). Genetic polymorphism in triatomine species from Uruguay. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 83 (suppl I) p.191.
- 178.- Koshy TK. 1979. Chromosomes of Triatomine III: Karyotypes studies of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera:Reduviidae). *Acta Cient Venezolana* 30:196-198.
- 179.- Cassini CE, Dujardin JP, Martínez M, Pereira AB, Salvatella R (1995). Morphometric differentiation evidenced between two geographic populations of *Triatoma infestans* in Uruguay. *Research and Reviews in Parasitology* 55:25-30.
- 180.- Dujardin JP, Chavez T, Machane M Solis S. 1999a. Size shape and genetics. Sexual dimorphism and environment in *Proceedings of the Second International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae*, Tegucigalpa, Honduras. INDRE, Mexico City, 131pp. Pag 53-62 Ed. Schofield & Ponce C (editors).
- 181.- Jaramillo N. 2000. Partición en tamaño y forma de los caracteres métricos y su interés en los estudios poblacionales aplicados a los Triatominae. PhD thesis, Universidad de Antioquie, Medellín, 125 pp.
- 182.- Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin J. 1999. The process of domestication in Triatominae, *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 94(Suppl 1):375-378.
- 183.- Schreiber G, Pellegrino J. 1950. Eteropicnosi do autosomi come posible mecanismo di speciazione (Ricerche citologiche su alcuni Emitteri neotropici) *Sci. Genet.*3:215-226.
- 184.-De la Riva J, Le Pont F, Ali V, Matias A, Mollinedo S, Dujardin JP. 2001. Wing shape of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) complex. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96(8):1089-1094.

- 185.- Monroy C, Bustamante DM, Rodas A, Rosales R, Mejía M, Tabaru Y. 2003. Geographic distribution and morphometric differentiation of *Triatoma nitida* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) in Guatemala. Mem Inst Oswaldo Cruz 98(1):37-43.
- 186.- Dujardin JP, Schofield CJ, Tibayrenc M (1998b). Population structure of Andean *Triatoma infestans*: allozyme frequencies and their epidemiological relevance. Medical and Veterinary Entomology 12:20-29.
- 187.- Lehmann P, Ordoñez R, Ojeda R, Mendez de Lira J, Hidalgo, Monroy C, Ramsey JM. Morphometric analysis of *Triatoma dimidiata* (Reduviidae:Triatominae) populations from Mexico and Guatemala, (enviado).
- 188.- Harris KD, Ramsey JM, Ordóñez R, Cordon-Rosales C, Monteiro FA, Dotson EM, Beard CB. Genetic divergence of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera:Reduviidae) in México, (en prensa).
- 189.- Jaramillo ON, Castillo D, Wolff EM. 2002. Geometric Morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. Mem Inst Oswaldo Cruz 97(5):667-673.
- 190.- Catala S, Carbajal A, Torres M, Moreno M, Ordóñez R, Montaña F, Esteban L, González N. 2002. In: Proceedings of the Fourth International Workshop on Population Genetics and Control of Triatominae, ECLAT 4, Cartagena, Colombia. Corcas Editores Ltda, 194pp. Pag 125-132 Ed. CJ Schofield & Felipe Guhl (editors).