



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Análisis filogenético de especies de triatóminos (Hemiptera: Reduviidae) presentes en México”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE: BIÓLOGA

PRESENTA: GUIEHDANI VILLALOBOS CASTILLEJOS



DIRECTORA DE TESIS: DRA. BERTHA ESPINOZA GUTIÉRREZ
CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MARÍA CÉVALLOS GAOS



2005

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m. 342458



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

“Análisis filogenético de especies de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) presentes en México”

realizado por el pasante **Villalobos Castillejos Guiehdani**

con número de cuenta **9715795-7**, quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Co-director de Tesis
Propietario

Dra. Ana María Cevallos Gaos

Propietario

Dr. Ricardo Alejandro Aguilar

Suplente

Dr. Luis Medrano González

Suplente

Biól. Itzia Eréndira Nieto López

Consejo Departamental de Biología

M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ CHÁVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por brindarme su confianza, apoyo y orientación durante mi trabajo de tesis.

A la Dra. Ana María Cevallos Gaos por su gran ayuda en todo el proceso experimental y por compartir conmigo parte de su gran experiencia en este campo.

Al Dr. Ricardo Alejandro Aguilar por haberme proporcionado el material biológico y estar siempre disponible para colaborar en este proyecto.

Al Dr. Luis Medrano González por su ayuda en el procesamiento de los datos y por su valiosa contribución como parte de mi comité de sinodales.

A la Biol. Itzia E. Nieto López por sus comentarios y sugerencias que fueron de gran ayuda en la realización de esta tesis.

A la Dra. Rosalía Lira por sus sugerencias en ciertos aspectos de la parte experimental de esta tesis.

Agradezco la beca que me otorgó el programa PAPIIT de DGAPA, proyecto IN226402.

DEDICATORIA

A las personas que más quiero, que me han dado toda la confianza para decidir lo que deseo hacer en la vida y han permanecido a mi lado apoyándome y brindándome todo su amor a pesar de la distancia, esta tesis representa un regalo para ustedes que me han dado todo: gracias papás.

A mi hermano, por caminar conmigo y siempre apoyarme en todos mis proyectos, gracias por todas tus enseñanzas.

A mi tía Tencha por estar siempre a mi lado y cada día enseñarme nuevas cosas de la vida.

A mis abuelitos que son mi gran fuente de sabiduría y consejos. A toda mi familia, que de una u otra manera han estado siempre conmigo.

A Peper, gracias por tu apoyo y todas tus enseñanzas, por tu gran amor y enorme comprensión, día a día aprendo grandes cosas de ti, eres una persona extraordinaria.

A Nelly, Yajaira, Yessi, Yazmín, Vane, Marci, Melina, Chabe, Fabiola y Jacob por su incondicional apoyo en todos los aspectos ya que más que amigos son mis hermanos de vida.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Fernando, Edgar, Andrea J., Elsa, Deyanira, Ma. Luisa, Ignacio, Andrea V. y Oralia.

CONTENIDO

I. Resumen	1
II. Introducción	2
II.1. Enfermedad de Chagas	2
II.2. Agente etiológico	4
II.3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
II.4. Formas de transmisión	6
II.4.a. Infección por el triatómino	6
II.4.b. Infección por transfusión sanguínea.....	7
II.4.c. Infección congénita y neonatal.....	7
II.5. Manifestaciones y Patogénesis de la enfermedad.....	7
II.5.a. Fase aguda.....	7
II.5.b. Fase crónica.....	8
Fase crónica indeterminada o asintomática.....	8
Fase crónica sintomática.....	8
II.6. El vector	9
II.6.a. Biología y comportamiento.....	9
II.6.b. Hábitos alimenticios.....	10
II.6.c. Ciclo biológico.....	11
II.6.d. Predadores	12
II.6.e. Factores poblacionales	12
II.6.f. Distribución.....	14
II.6.g. Clasificación taxonómica.....	20
Criterios de clasificación.....	20
Problemática taxonómica.....	23
II.7. Marcadores moleculares.....	25
II.7.a. Marcadores utilizados en triatóminos.....	27
II.7.b. Espaciador interno transcrito 2 (ITS-2).....	29
III. Justificación.....	33
IV. Objetivos.....	34
V.1. Objetivos generales.....	34

IV.2. Objetivos específicos.....	34
V. Material y métodos.....	35
V.1. Insectos.....	35
V.2. Extracción de DNA.....	36
V.3. PCR.....	36
V.4. Clonación.....	37
V.4.a. Ligación.....	37
V.4.b. Transformación.....	38
V.4.c. Extracción de DNA de plásmido.....	39
V.4.d. Digestión de DNA de plásmido.....	40
V.5. Secuenciación	40
V.6. Análisis de los datos.....	41
V.6.a. Alineamiento de las secuencias	41
V.6.b. Matriz de distancias	42
V.6.c. Análisis filogenético	43
VI. Resultados.....	46
VI.1. Extracción de DNA	46
VI.2. PCR y Secuenciación	46
VI.3. Análisis de las secuencias.....	50
VI.3.a. Variación intraespecífica.....	51
VI.3.b. Variación interespecífica	52
VI.3.c. Microsatélites.....	54
VI.4. Análisis filogenético.....	55
VII. Discusión.....	57
VIII. Conclusión.....	64
IX. Referencias	65
X. Anexos.....	76
X.1. Diseño del oligo interno.....	76
X.2. Alineamiento de la secuencia del ITS-2	77

I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria descubierta por el médico brasileño Carlos Chagas. El agente etiológico es el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por un insecto vector que al picar a la víctima al mismo tiempo deposita sus heces y orina contaminadas con el parásito. Los principales vectores que transmiten el parásito son insectos que pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Hemiptera: Reduviidae). Los estudios taxonómicos para estos insectos se basan principalmente en sus características morfológicas, lo que hace difícil su clasificación, sobre todo en especies con caracteres similares y en estadios ninfales. El empleo de marcadores moleculares en el estudio genético y poblacional de los triatóminos permitirá la caracterización de las especies así como la corroboración o modificación de las clasificaciones basadas en caracteres morfológicos. El objetivo del presente trabajo fue realizar estudios de clasificación y filogenia en especies del complejo *Phyllosoma* (C.P., *T. longipennis*, *T. pallidipennis*, *T. mazzottii*, *T. picturata* y *T. bassolsae*) y especies de complejos externos al *Phyllosoma* (*T. lecticularia*, *T. rubida* y *T. infestans*), así como corroborar la inclusión de *T. bassolsae* dentro del complejo *Phyllosoma*, analizando las secuencias de nucleótidos del segundo espaciador interno transcrito del rDNA (ITS-2). La comparación de las secuencias y los análisis de distancia y máxima verosimilitud indican que el ITS-2 es un marcador útil para resolver relaciones filogenéticas a nivel de géneros y especies, sin embargo no fue de gran utilidad a nivel de individuos estrechamente relacionados como en el caso de las especies del complejo *Phyllosoma*. En estas especies, se encontraron distancias genéticas pequeñas, lo que nos indica el reciente proceso de divergencia que están sufriendo. La gran similitud encontrada en la secuencia de *T. bassolsae* con las otras pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, nos corrobora la inclusión de esta especie dentro del grupo. Las especies pertenecientes a otros complejos diferentes del complejo *Phyllosoma*, *T. lecticularia*, *T. rubida* y *T. infestans*, fueron claramente agrupadas en clados diferentes. Finalmente, el análisis de microsátelites en las secuencias del ITS-2, nos proporciona una herramienta alternativa de identificación, ya que las encontradas en el complejo *Phyllosoma* son homogéneas, en tanto que para *T. lecticularia* y *T. infestans* estos eran más largos; mientras que para *T. rubida* y *R. prolixus* no se detectaron secuencias de microsátelites. Es importante mencionar que se analizaron por primera vez tres especies con este marcador molecular: *T. bassolsae*, *T. rubida* y *T. lecticularia*.

II. INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por *Trypanosoma cruzi*, protozoo parásito que se localiza exclusivamente en el Continente Americano. Recibe su nombre en honor al Dr. Carlos Chagas, médico brasileño quien describió la enfermedad por primera vez en 1909 e identificó tanto al parásito como al insecto que lo transmite. En la naturaleza, *T. cruzi* se mantiene principalmente en un ciclo selvático que involucra a diferentes especies de insectos triatóminos (Hemiptera: Reduviidae) que actúan como vectores y a varios mamíferos silvestres, como zarigüeyas, mapaches y tlacuaches que actúan como reservorios. Sin embargo, la constante invasión humana a la selva ha facilitado su contacto con los triatóminos y animales silvestres infectados, estableciéndose así un ciclo peri-doméstico e inclusive doméstico (Acha & Cifres, 1986).

II.1. Enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi causante de la Enfermedad de Chagas fue descubierto en el intestino de un hemíptero del género *Triatoma*, el cual se sabía que atacaba al hombre en muchas localidades de Brasil. Cuando se hicieron alimentar a las chinches con la sangre de monos, se pudieron identificar, semanas más tarde, en la sangre de estos primates la presencia de tripanosomas, éstos, fueron encontrados posteriormente en niños brasileños que presentaban síntomas como fiebre, vómito y diarrea (Piekarski, 1959). En la Medicina, es el único caso en el que el agente etiológico de una enfermedad y el insecto que lo transmite se descubrieron antes de ser reconocida la enfermedad (Schofield, 1995). La enfermedad de Chagas se localiza únicamente en América, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina (Figura 1). La Organización Mundial de la Salud estimó en 1991 que probablemente existían de 16-18 millones de personas infectadas en toda América, y 100 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad.

En México, se han realizado estudios de la enfermedad, reportándose que hasta 1990 existían alrededor de 300 casos (Velasco-Castrejón, 1991). En la Encuesta Serológica realizada a nivel nacional entre 1987 y 1989, se detectó anticuerpos específicos para *T. cruzi*, utilizando pruebas de hemaglutinación e inmunofluorescencia, encontrando que el 1.6 % de la población analizada era seropositiva, en tanto que los estados de Chiapas y Oaxaca mostraban los más altos porcentajes de seropositividad que oscilaban entre el 2 y el 5% (Velasco-Castrejón *et al.*, 1992). En 1998, Guzmán-Bracho y colaboradores determinaron una seroprevalencia de 1.5 % en un análisis a 18 bancos de sangre reportando las mayores seroprevalencias en los estados de Hidalgo y Tlaxcala (2.8% y 1.9% respectivamente) (Guzmán-Bracho *et al.*, 1998); los índices serológicos de infección por *T. cruzi* reportados en diferentes estados de la república son variables, por ejemplo, existe un 17.8 % para el estado de Jalisco (Trujillo *et al.*, 2000), un 20 % para Morelos (Rangel-Flores *et al.*, 2001), 4.8 % en Oaxaca, 12.5 % en Acapulco, Guerrero (Velasco-Castrejón, 1991) y 11.3 % en Chiapas (Mazariego-Arana *et al.*, 2001).



Figura 1. Distribución mundial de la Enfermedad de Chagas (Tomado de: www.who.int/ctd/chagas/geo.htm).

II.2. Agente etiológico

El agente etiológico de la Enfermedad de Chagas es *Trypanosoma cruzi*, parásito que posee un solo flagelo adherido al cuerpo por una membrana ondulante y como órgano característico la presencia del cinetoplasto, (una malla o red de DNA extranuclear localizada en un punto específico de la mitocondria). Presenta la siguiente clasificación taxonómica elaborada por Leedale y Vickerman en el 2000:

Phylum: Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)

Clase: Diplonemea (Cavalier-Smith, 1993)

Orden: Kinetoplastida (Honingberg, 1963)

Suborden: Trypanosomatina (Kent, 1980)

Familia: Trypanosomatidae (Duflein, 1901)

Género: *Trypanosoma* (Gruby, 1843)

Subgénero: Schizotrypanum (Chagas, 1909)

Especie: *T. cruzi* (Chagas, 1909)

Existen tres estados morfológicos principales de *Trypanosoma cruzi*: tripomastigote, epimastigote y amastigote. Estos diferentes estados se distinguen morfológicamente entre sí por la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante (World Health Organization, 1991):

- Durante el estadio de tripomastigote el cinetoplasto se encuentra localizado usualmente en la porción más posterior del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el cuerpo del parásito y emergiendo en forma libre en el extremo anterior. Es la forma infectiva del parásito.
- En el estadio de epimastigote, el cinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña

que la que se presenta en los tripomastigotes. Es la forma replicativa no infectiva dentro del intestino del triatoma.

- La forma de amastigote, no posee un flagelo libre, tiene una forma esférica. Es el estadio intracelular del parásito en tejidos del hospedero.

II.3. Ciclo de vida de *T. cruzi*

La infección es transmitida principalmente por chinches a más de 100 diferentes especies de animales silvestres y domésticos. El ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 2) se inicia cuando las chinches se alimentan de un animal infectado ingiriendo de esta manera al parásito, el cual se encuentra en su estadio de tripomastigote sanguíneo. Dentro la chinche los tripomastigotes sanguíneos pasan a su estadio de epimastigotes, los cuales se van a replicar en el intestino medio del insecto; posteriormente, los parásitos migran a la parte posterior del intestino, esta vez en su forma de tripomastigotes metacíclicos, los cuales son la forma infectiva del parásito.

La infección dentro del mamífero, se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando los tripomastigotes metacíclicos en el contenido intestinal (heces y orinas). Los tripomastigotes pueden atravesar la piel, entrar en el organismo a través del sitio de picadura, o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células del hospedero. Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes, los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando las células del hospedero se encuentran llenas de amastigotes, que se transforman en tripomastigotes, posteriormente lisan las células y son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes tiene la habilidad de invadir cualquier tipo de células, donde se transforman de nuevo en amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección cuando la chinche se alimenta de nuevo (WHO, 1991; Velasco-Castrejón, 1991; Tyler & Ehgman, 2001).

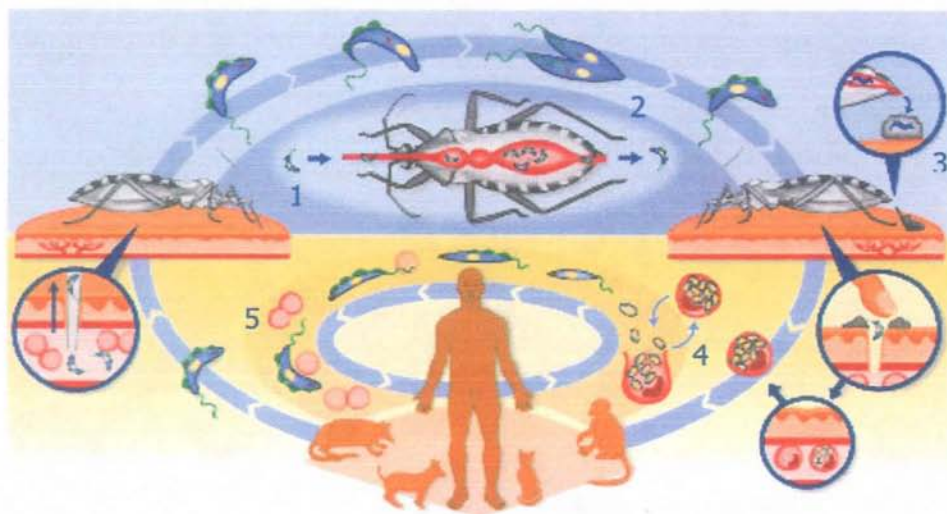


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*: ❶ la chinche se alimenta de un animal infectado, ingiriendo los tripomastigotes sanguíneos; ❷ dentro de la chinche, los tripomastigotes pasan a su forma de epimastigotes, los cuales se dividen dentro de la chinche; ❸ en su forma de tripomastigotes entran al hospedero a través del sitio de mordedura del insecto; ❹ dentro de las células hospederas, los tripomastigotes se transforman en amastigotes; ❺ al llenar las células los amastigotes se lisan y pueden invadir nuevas células o pasan a su forma de tripomastigotes, los cuales son liberados al torrente sanguíneo, donde pueden ser ingeridos por una chinche, comenzando de nuevo el ciclo. Tomado de www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm.

II.4. Formas de transmisión

Existen diferentes formas de adquirir una infección con *T. cruzi*, entre las que encontramos: infección por el triatómino, por transfusión sanguínea, por infección congénita y neonatal y por accidentes de laboratorio. Siendo las principales vías de transmisión las dos primeras.

II.4. a. Infección por el triatómino

Sin duda, es el principal mecanismo de infección en todo el Continente Americano, transmitiéndose a los mamíferos a través de las deyecciones de los insectos infectados con *T. cruzi*. Además, la constante invasión del hombre a áreas de distribución del vector ha facilitado que el insecto pueda invadir áreas peridomésticas y domésticas, haciendo al hombre más vulnerable a la infección con el parásito.

II.4.b. Infección por transfusión sanguínea

T. cruzi es un parásito que invade la sangre, por lo que también se transmite en transfusiones de sangre contaminada con el parásito, siendo este el segundo mecanismo más importante de transmisión. Más de 200 casos anuales de infecciones con *T. cruzi* son causadas por transfusiones sanguíneas sin contar aquellas que pasan desapercibidas (WHO, 1991). En México, se reportó un 1.5 % de prevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en 65,000 donadores de sangre de 18 centros gubernamentales, con una mayor incidencia en la región de la Huasteca Potosina y en áreas del sureste de México (Guzmán-Bracho et al., 1998).

II.4.c. Infección congénita y neonatal

El parásito también puede transmitirse de madre a feto (hasta en un 10%). La infección durante el embarazo puede resultar en abortos o nacimientos prematuros. Alrededor del 50 % de los casos de nacimientos prematuros mueren a causa de la infección (WHO, 1991).

La infección por leche materna contaminada a los niños es muy poco común. En un estudio parasitológico en donde se analizó la leche materna de 100 madres, de las cuales 22 presentaban la fase aguda de la enfermedad y 78 la fase crónica, sólo se detectó el parásito en 5 de ellas con enfermedad de Chagas en fase aguda (WHO, 1991)

II.5. Manifestaciones y Patogénesis de la enfermedad

La Enfermedad de Chagas se caracteriza por la presencia de dos fases: fase aguda y fase crónica, las cuales presentan las siguientes características:

II.5.a. Fase aguda

La fase aguda de la infección se caracteriza por la presencia del parásito en circulación, el cual se disemina pudiendo infectar todo tipo de células nucleadas, pero preferentemente a células musculares cardiacas, macrófagos, neuronas y tejido glial. Si la vía de entrada del parásito es por la conjuntiva del ojo, se forma un edema en

párpados y tejidos aledaños que se conoce como el signo de Romana, si el edema se produce en otra parte del cuerpo recibe el nombre de chagoma. La sintomatología clínica es variable, se pueden presentar vómitos, fiebre, diarrea, náuseas, anorexia, linfadenopatías y hepatomegalia. Además puede ser afectado el sistema nervioso y en algunos casos la presencia de cardiopatías y la muerte del individuo (WHO, 1991).

II.5.b. Fase crónica

1. Fase crónica indeterminada o asintomática

Se presenta de 8 a 10 semanas después de la infección. Durante esta etapa los enfermos no presentan síntomas ni manifestaciones clínicas y se detecta al parásito por la presencia de anticuerpos específicos. Y aunque no se detecta al parásito en circulación el xenodiagnóstico puede ser positivo. El individuo infectado puede permanecer de esta manera durante toda su vida o puede desarrollar la siguiente etapa de la enfermedad. La mayoría de las personas infectadas con *T. cruzi* presentan esta fase de la enfermedad (WHO, 1991).

2. Fase crónica sintomática

Aproximadamente el 30% de los casos de la fase crónica indeterminada de la infección desarrollan esta fase, presentando complicaciones en el corazón y en el tracto digestivo. Los problemas cardíacos son los más serios y se manifiestan principalmente con daño al tejido muscular y trastornos de la conducción de la señal eléctrica del corazón, en el caso del tracto digestivo hay dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon). En esta fase existe gran daño celular y no se sabe del todo si la inflamación y el daño celular están determinados por la persistencia del parásito o por la respuesta inmune (autoinmunidad) (WHO, 1991).

II.6. EL VECTOR

Aunque se han infectado experimentalmente una variedad de artrópodos con *T. cruzi*, sólo los triatóminos (Hemípteros) son epidemiológicamente importantes en la transmisión de la Enfermedad de Chagas (Lent & Wygodzinsky, 1979). La subfamilia Triatominae (Reduviidae) contiene numerosas especies que debido a su similar comportamiento y fisiología, pueden actuar como vectores reales o potenciales de la enfermedad (Schofield, 1994). Varias de las especies de triatóminos han colonizado viviendas humanas donde pueden transmitir la Enfermedad de Chagas tanto al hombre como a animales domésticos (Beard *et al.*, 2003).

II.6.a. Biología y comportamiento

La principal característica biológica de los triatóminos, es su obligada hematofagia, es decir, requieren alimentarse de sangre para su completo desarrollo, este tipo de alimentación incluye a todos los estadios ninfales hasta adultos y tanto a hembras como a machos. Sus hábitos naturales de alimentación se encuentran relacionados con mamíferos silvestres, tanto terrestres como arborícolas, especialmente didélfidos, edentados y roedores, y algunos se han encontrado asociados con aves, reptiles y murciélagos (Lent & Wygodzinsky, 1979, WHO, 1991; Moffitt *et al.*, 2003). Los triatóminos son insectos con metamorfosis incompleta¹ pasando por cinco estadios ninfales antes de llegar al estado adulto, los cuales difieren de las ninfas por la presencia de ocelos (ojos), genitales y alas anteriores y posteriores bien desarrolladas (Lent & Wygodzinsky, 1979).

¹ En estos insectos, durante su proceso de transformación para su desarrollo, las ninfas que eclosionan de los huevos, se parecen a las formas adultas y no hay estadios de pupa

II.6.b. Hábitos alimenticios

La mayoría de los triatóminos adultos son insectos grandes de aproximadamente 2.5 a 4.5 cm. de longitud, los cuales requieren considerables cantidades de sangre para alimentarse. Tanto los estadios ninfales como el adulto puede ingerir de 6 a 12 veces su peso corporal original (Kollien & Schaub, 2000). *T. infestans*, ingiere en promedio 1-2 gramos de sangre durante su desarrollo de huevo a adulto y cada hembra puede ingerir 10 gramos o más durante su vida reproductiva (Scholfield, 1994); los triatóminos más grandes que *T. infestans*, pueden ingerir dos veces esta cantidad. En una infestación doméstica, cada chinche se alimenta cada 4 a 9 días, por lo que cada persona puede ser picada de 20 a 30 veces por noche, representando una pérdida media de sangre de aproximadamente 2.5 gramos por noche (Ravinovich *et al.*, 1979; Scholfield, 1981; Schofield, 1994). Casi todas las especies de triatóminos se alimentan de noche, cuando sus huéspedes se encuentran dormidos y son más vulnerables a su picadura. (Schofield, 1994).

La reacción del huésped a la picadura del insecto varía, ya que depende tanto de la especie de triatómino como del hospedero. Los fluidos salivares y algunas estructuras que poseen los triatóminos pueden ser potenciales alérgenos, por ejemplo, se han encontrado altos niveles de IgE² a los extractos salivares de *T. protacta*, en las personas picadas por este insecto (Marshall *et al.*, 1986) y en *T. infestans* se encontraron seis diferentes tipos de esterases en la hemolinfa³, (Tavares *et al.*, 1998) las cuales podrían causar alergias al huésped, además, se ha visto que las picaduras de estos insectos son una de las principales causas de anafilaxis⁴ en algunos lugares de Estados Unidos (Moffitt *et al.*, 2003).

² Inmunoglobulina E

³ Líquido incoloro, que lleva además un pigmento con función respiratoria (hemocianina). Lleva células como son fagocitos (para digerir elementos extraños) y hemocitos (para transportar los pigmentos respiratorios).

⁴ Reacción alérgica violenta causada por la reacción entre un antígeno y un anticuerpo (Madigan *et al.*, 1998)

II.6.c. Ciclo biológico

Los triatóminos tienen un ciclo vital con metamorfosis incompleta, pasando desde el huevo por cinco estadios ninfales hasta el estadio adulto (Figura 3). Los huevos ovoides suelen ser blancos o rosados, y a menudo se tornan más oscuros conforme el embrión se va desarrollando. La ovoposición tiene una periodicidad circadiana y generalmente empieza de 10 a 20 días después de la primera cópula. Las hembras pueden copular varias veces, llegando a ovopositar de 100 a 600 huevos o más a lo largo de su vida; y los tiempos de eclosión de cada huevo pueden ir de entre 10 a 40 días. Sin embargo, el número de huevos, el tiempo de eclosión y en general el ciclo de desarrollo de los triatomas varía de acuerdo a la especie, a las condiciones ambientales específicas y su capacidad para alimentarse (Schofield 1984, Schofield, 1994, Guarneri *et al.*, 2000, Martínez-Ibarra *et al.*, 2003a).

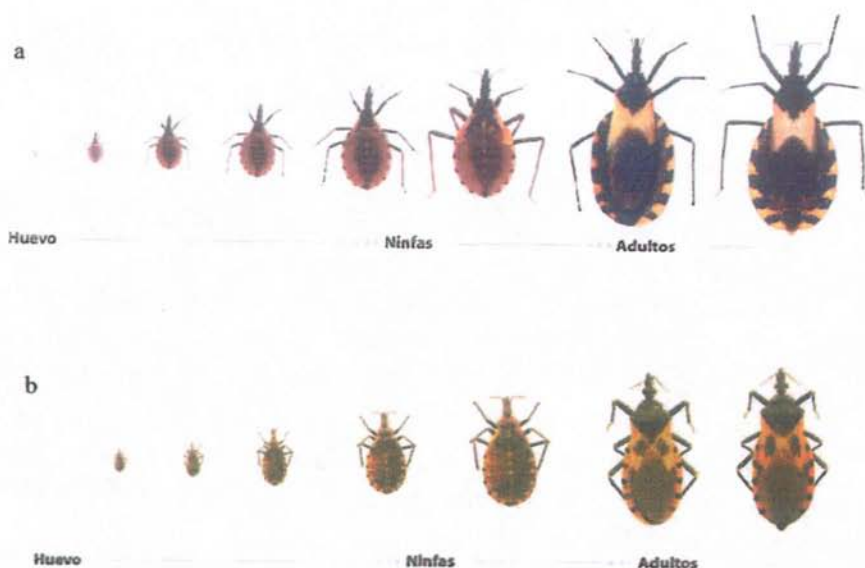


Figura 3. Ciclo de vida de dos diferentes especies de triatóminos. a) *Triatoma pallidipennis*; b) *Triatoma dimidiata*. Tomado del Instituto Nacional de Salud Pública.

II.6.d. Predadores

Los predadores naturales de los triatóminos incluyen especies de insectos y de microorganismos. Entre los predadores insectos están las arañas, pseudoescorpiones, ácaros, hormigas, cucarachas, hemípteros reducidos no triatóminos, roedores, lagartos, y algunas especies de avispas microhymenopteras que parasitan los huevos de los triatóminos, así como algunas especies de nemátodos y microorganismos como hongos y bacterias que atacan a las ninfas y a los adultos (WHO, 1991; Scholfield, 1994).

II.6.e. Factores poblacionales

Entre los factores más importantes que deben considerarse para entender la dinámica poblacional de la especie están: tiempo de desarrollo y mortalidad de los estados ninfales; número de hembras por prole, fertilidad y fecundidad, inicio de la maduración sexual, hábitat, longevidad y tasas de ovoposición con respecto a la frecuencia de alimentación (Martínez-Ibarra *et al.*, 2003a). Las mayores tasas de mortalidad en los triatóminos se dan entre el quinto estadio y el adulto, que ocurren principalmente durante sus procesos de muda (Zeledón *et al.*, 1970; Martínez-Ibarra & Kathain-Duchateau, 1999, Martínez-Ibarra *et al.*, 2003b). En la tabla 1 se presentan los tiempos de desarrollo en diferentes especies de triatóminos.

Tabla 1. Tiempos de desarrollo de diferentes especies de triatóminos

Especie	Tiempo de desarrollo (días)*	Forma de mantenimiento
<i>T. longipennis</i>	192.6 ± (rango 146- 241 días)	Alimentados semanalmente sobre gallinas / 27 ± 1°C / 75 ± 5% rh** (Martínez-Ibarra <i>et al.</i> , 2003b)
<i>T. nitida</i>	897.5	Alimentados semanalmente sobre ratones / 28 ± 1 °C / 80 ± 5% rh (Galvão <i>et al.</i> , 1995)
<i>T. dimidiata</i>	240 (rango 180-336 días)	Alimentados cada dos semanas sobre conejos / 26.5 ± 0.5°C / 50 ± 5% rh (Zeledón <i>et al.</i> , 1970)
	161.7 (rango 88-325 días)	Alimentados semanalmente sobre conejos / 27 ± 3°C / 665 ± 5 % rh (Martínez-Ibarra, 2001a)
<i>T. mazzottii</i>	235.77	Alimentados semanalmente sobre conejos / 27 ± 2°C / 70% rh (Malo <i>et al.</i> , 1993)
<i>T. picturata</i>	196.8 ± 15.8	Alimentados semanalmente sobre gallinas y conejos / 27 ± 1°C / 75 ± 5% rh (Martínez-Ibarra <i>et al.</i> , 2003a)
	189.5 ± 22.9	
<i>T. pallidipennis</i>	185.6(rango 148-226 días)	Alimentados semanalmente sobre conejos / 27 ± 1°C / 755 ± 5% rh (Novelo-López & Martínez-Ibarra, 2002)
	168 (rango 131-199 días)	Alimentados semanalmente sobre conejos / 27 ± 2°C / 60 ± 5% rh (Martínez-Ibarra & Kathain-Duchateau, 1999)
<i>T. barberi</i>	143.7 días ♀	Alimentados cada 4.2 días sobre conejos / 27°C / 60 ± 10% rh (Zárate, 1983)
	205.3 días ♂	

* Tiempo de desarrollo: Tiempo promedio de la transformación de huevo a adulto.

** rh: humedad relativa (relative humidity)

II.6.f. Distribución

El área de distribución de los triatóminos se encuentra limitada a las regiones neotropicales y neoárticas, que van desde Salt Lake City en Estados Unidos a 41° latitud norte hasta el sur del continente americano a 46° latitud sur (De La Merced, 1987; WHO, 1991). Brenner y Stoka (1987) reportaron triatóminos en latitudes con temperaturas frías, como en la región de la Patagonia en Argentina. Además se llegan a establecer a altitudes entre 200 y 1500 msnm, aunque estas altitudes pueden variar por ejemplo, *T. infestans* puede permanecer de 0 hasta los 1800 msnm (WHO, 1991). A pesar de que Estados Unidos no es considerado un país endémico para la Enfermedad de Chagas se han reportado triatóminos en diferentes estados, por ejemplo, *T. gerstaeckeri*, en Texas y Nuevo México, mientras que *T. rubida* y *T. protacta* en regiones de Arizona y California, los cuales se han encontrado infectados con *T. cruzi* (Beard *et al.*, 2003).

México se encuentra entre la altitud y la latitud propicia para el establecimiento de los triatóminos, reportándose en la mayoría del territorio nacional. Debido a que los estudios de distribución de los insectos en el país no han sido minuciosos, no se descarta la posibilidad de encontrar nuevos lugares de establecimiento u otras especies no reportadas anteriormente. Existen en México 32 especies distribuidas en siete géneros (*Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma*, *Pastrongylus*, *Belminus*, *Triatoma* y *Rhodnius*), de las cuales, 28 especies son endémicas (Paredes *et al.*, 2001). El 67 por ciento de estas se han reportado infectadas con *T. cruzi*. *T. dimidiata* es uno de los más importantes vectores de la enfermedad de Chagas en la península de Yucatán (Yucatán, Campeche y Quintana Roo) de acuerdo a su gran distribución y predominancia en esta región, y altos indicadores entomológicos (Guzmán-Marín *et al.*, 1990, 1992; Dumontiel *et al.*, 2002; Dumontiel & Gourbiere, 2004). En la región de Baja California Sur, *Dipetalogaster maximus* es el vector más frecuentemente colectado, encontrándose tasas de infección con *T. cruzi* del 7.0% (Jiménez *et al.*, 2003).

Las especies del Complejo *Phyllosoma* (*T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. mazzottii* y *T. bassolsae*) se encuentran distribuidas

principalmente en el centro del país y se han reportado para algunas de estas sus porcentajes de infección con *T. cruzi*: para *T. phyllosoma* del 9.1 % al 66.7 % en el estado de Oaxaca (Ramsey *et al.*, 2000; Vidal-Acosta *et al.*, 2000); para *T. picturata* de 7.4 % en Jalisco (Magallón-Gastélum *et al.*, 1998), en tanto que en localidades de Nayarit del 52% (Flores, 2001) y 60 % (Martínez-Ibarra *et al.*, 2001a); para *T. longipennis* se ha reportado en estados como Jalisco, Nayarit y Zacatecas, con porcentajes de infección que van desde 18 a 55 % (Vidal-Acosta *et al.*; Flores, 2001; Martínez-Ibarra *et al.*, 2001a); para *T. mazzottii* porcentajes de 7 al 40 % en Oaxaca (Ramsey *et al.*, 2000; Vidal-Acosta *et al.*, 2000) y del 50% en Jalisco respectivamente (Magallón-Gastélum *et al.*, 1998). La figura 4 y la tabla 2 muestran la distribución de las especies de triatóminos presentes en México.

Tabla 2: Distribución de triatóminos (Hemiptera: Reduviidae) en México
(Revisión bibliográfica 1979-2004)

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	REFERENCIA
1.- <i>Belminus costaricensis</i> (Herrel, Lent & Wygodzinsky, 1954)	Veracruz	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.
2.- <i>Dipetalogaster maxima</i> (Uhlr, 1894)	B.C.S.	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Guzmán-Bracho, 2001; Jiménez <i>et al.</i> , 2003.
3.- <i>Eratyrus cuspidatus</i> (Stal, 1859)	Veracruz y Chiapas	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Velasco-Castrejón y Guzmán-Bracho, 1986.
*4.- <i>E. mucronatus</i> (Stal, 1859)	Chihuahua y Veracruz	Velasco-Castrejón y Guzmán-Bracho, 1986.
5.- <i>Paratriatoma hirsuta</i> -sinonimias: <i>kamiensis</i> , <i>papagoensis</i> , <i>yomanesis</i> - (Ryckman, 1967)	B.C.N., B.C.S. y Sonora	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.
6.- <i>Panstrongylus rufotuberculata</i> (Champion, 1899)	Veracruz, Chiapas y B.C.S.	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000.
7.- <i>Rhodnius prolixus</i> (Ryckman, 1967)	Chiapas y Oaxaca	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Schofield, 1994; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Ramsey <i>et al.</i> , 2000.

8.- <i>Triatoma barberi</i> (Usinger, 1939)	Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Querétaro, Puebla, Tlaxcala y Veracruz	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; De La Merced, 1987; Cortés Jiménez <i>et al.</i> , 1996; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Ramsey <i>et al.</i> , 2000; Flores <i>et al.</i> , 2001.
9.- <i>Triatoma bassolsae</i> (<i>Meccus bassolsae</i>) (Alejandre <i>et al.</i> , 1999)	Puebla	Alejandre <i>et al.</i> , 1999.
10.- <i>Triatoma brailosky</i> Martínez <i>et al.</i> , 1984)	Colima, Hidalgo, Jalisco y Nayarit	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.
11.- <i>Triatoma bolivari</i> (Carcavallo <i>et al.</i> , 1987)	Hidalgo, Oaxaca	Aguirre-Pequeño, 1947; Ramsey <i>et al.</i> , 2000
12.- <i>Triatoma dimidiata</i> (Latreille, 1811)	Campeche, Colima, Guanajuato, Hidalgo Chiapas, Querétaro Oaxaca, Jalisco, Morelos, Tabasco, Veracruz, Yucatán, San Luis Potosí, Sonora, Quintana Roo, Puebla y Guerrero	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; De La Merced, 1987; Guzman-Marín <i>et al.</i> , 1992; Cortés Jiménez <i>et al.</i> , 1996; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Ramsey <i>et al.</i> , 2000; Flores <i>et al.</i> , 2001; Dumontiel <i>et al.</i> , 2002, 2004).
13.- <i>Triatoma gerstaeckeri</i> (Stal, 1959)	Chihuahua, Coahuila, Hidalgo, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Martínez-Ibarra, 1992; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000.
14.- <i>Triatoma hegneri</i> (Mazzotti, 1940)	Quintana Roo	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.
15.- <i>Triatoma incassata</i> (Usinger, 1939)	Sonora y Edo. de México	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.
16.- <i>Triatoma indictiva</i> (Neiva, 1912)	Chihuahua y Sinaloa	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.
*17.- <i>Triatoma infestans</i> (Klug, 1834)	San Luis Potosí y Veracruz	Velasco-Castrejón y Guzmán-Bracho, 1986.
18.- <i>Triatoma lecticularia</i> (Stal, 1959)	Nuevo León	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Martínez-Ibarra, 1992.
19.- <i>Triatoma longipennis</i> (<i>Meccus longipennis</i>) (Usinger, 1939)	Aguascalientes. B.C.N. Chihuahua, Colima, Durango, Guanajuato. Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Yucatán y Zacatecas	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Flores <i>et al.</i> , 2001; Martínez-Ibarra <i>et al.</i> , 2001.
20.- <i>Triatoma mazzottii</i> (<i>Meccus mazzottii</i>) (Usinger, 1941)	Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Oaxaca	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Cortés-Jiménez <i>et al.</i> , 1996; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Ramsey <i>et al.</i> , 2000.
21.- <i>Triatoma mexicana</i> (Schaffer, 1848)	Guanajuato, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí.	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000.
22.- <i>Triatoma neotomae</i> (Neiva, 1911)	Nuevo León, Jalisco y Tamaulipas	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.

23.- <i>Triatoma nitida</i> (Usinger, 1939)	Yucatán, Oaxaca	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Ramsey <i>et al.</i> , 2000.
24.- <i>Triatoma pallidipennis</i> (<i>Meccus pallidipennis</i>) (Stal, 1872)	Colima, Guerrero, Jalisco, Oaxaca, Edo. México, Morelos, Michoacán, Puebla, Veracruz, Querétaro y Zacatecas	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Schofield, 1994; Jiménez <i>et al.</i> , 1996; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Bautista <i>et al.</i> , 1999; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Ramsey <i>et al.</i> , 2000; Flores <i>et al.</i> , 2001.
25.- <i>Triatoma peninsularis</i> (Usinger, 1940)	B.C.S.	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.
26.- <i>Triatoma phyllosoma</i> (<i>Mucus phyllosoma</i>) (Burmeister, 1835)	Guanajuato, Oaxaca, Nayarit y Jalisco	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Cortés-Jiménez <i>et al.</i> , 1996; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Ramsey <i>et al.</i> , 2000.
27.- <i>Triatoma picturata</i> (<i>Meccus picturatus</i>) (Usinger, 1939)	Colima, Jalisco, Nayarit y Oaxaca	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Magallón-Gastélum <i>et al.</i> , 1998; Vidal-Acosta <i>et al.</i> , 2000; Flores <i>et al.</i> , 2001; Martínez-Ibarra <i>et al.</i> , 2001.
28.- <i>Triatoma protracta</i> -sinonimias: <i>nahuatlæ</i> (Ryckman, 1962), <i>protracta</i> (Uhler, 1894), <i>woondi</i> (Usinger, 1939), <i>zacatecensis</i> (Ryckman, 1962)- (Ryckman, 1962)	B.C.N., Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas, Sinaloa y Sonora	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.
29.- <i>Triatoma recurva</i> (Stal, 1969)	B.C.N., B.C.S., Chihuahua, Guerrero, Nayarit, Sinaloa y Sonora	Zárate y Zárate, 1985; Paredes <i>et al.</i> , 2001
30.- <i>Triatoma rubida</i> -sinonimias: <i>cochimiensis</i> (Ryckman, 1967), <i>jaegeri</i> (Ryckman, 1967), <i>rubida</i> (Uhler, 1894), <i>sonoriana</i> (Del Ponte, 1930), <i>uhleri</i> (Neiva, 1911)- (Ryckman, 1967)	B. C. N., B. C. S., Chihuahua, Nayarit, Sinaloa y Sonora	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Cortés-Jiménez <i>et al.</i> , 1996; Paredes <i>et al.</i> , 2001;
*31.- <i>Triatoma sanguisuga</i> (Laconte, 1855)	Chiapas, Edo. México y Sinaloa	Aguirre-Pequeño, 1947
32.- <i>Triatoma sinaloenses</i> (Ruckman, 1962)	Sinaloa y Sonora	Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985.

+ Modificada de Martínez, 2003

*Especies dudosamente presentes en México, ya que sólo han sido reportadas una vez y además su distribución es sudamericana.



Fig 4. Diversidad y distribución de los triatóminos presentes en México (Fuente Tabla 2, Martínez, 2003).

Debido a diversos factores ambientales, nuestro país alberga numerosas especies endémicas, de las cuales, las pertenecientes al complejo *Phyllosoma* (Figura 5) son de particular importancia, por ejemplo *T. longipennis* es uno de los más importantes vectores de la enfermedad de Chagas en el occidente del país, de acuerdo a su distribución, alto grado de domiciliación y altos indicadores entomológicos, encontrándose en estados como Jalisco, Nayarit y Michoacán (Magallón-Gastélum *et al.* 1998, Martínez-Ibarra, 1998, 2001), mientras que *T. barberi* y *T. mazzottii* son los

vectores más importantes en el estado de Oaxaca debido a su gran distribución, abundancia y altas tasas de infección con *T. cruzi* (Ramsey *et al.*, 2000). *T. picturata* se ha reportado en estados como Nayarit y Jalisco con porcentajes de infección del 27.4%, además de encontrarse asociado en áreas domésticas, peridomésticas y silvestres (Flores *et al.*, 2001; Martínez-Ibarra *et al.*, 2001). En las regiones del norte y sur del país, se encuentra a *T. pallidipennis* (Colima, Morelos y Oaxaca) y aunque no se ha reportando que esta especie pueda ser uno de los vectores más importantes en el país, su distribución es amplia (Ramsey *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2001). De igual manera que *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma* y *T. bassolsae* han sido poco reportados. *T. phyllosoma* se encuentra en la región centro-sur de México (Guanajuato, Oaxaca, Nayarit y Jalisco), en tanto que *T. bassolsae* sólo ha sido reportado en Puebla (Magallón-Gastélum *et al.*, 1998; Alejandro *et al.*, 1999; Ramsey *et al.*, 2000; Vidal-Acosta *et al.*, 2000).



Figura 5.- Distribución del Complejo *Phyllosoma* a lo largo de la República Mexicana. Fuente Tabla 2.

II.6.g. Clasificación taxonómica

Criterios de clasificación

Las clasificaciones taxonómicas de los triatóminos están basadas en caracteres morfológicos. Para el género *Triatoma*, Ryckman en 1984 postuló los siguientes taxones:

Reino: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Mandibulata

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Hemiptera

Suborden: Heteroptera

Familia: Reduviidae

Subfamilia: Triatominae

Tribu Alberproseniini

Tribu Bolboderini

Tribu Cavernicolini

Tribu Linshcosteini

Tribu Rhodniini

Tribu Triatomini:

Género *Triatoma*

(Galvão *et al.*, 2003)

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

En 1979, Lent y Wygodzinsky dividieron al género *Triatoma* en grupos, subgrupos y complejos de especies, empleando algunas características de las ninfas de primero y de quinto estadios y en menor proporción características de los adultos, en algunas especies, en las cuales no se obtuvieron ejemplares jóvenes, se basaron en la similitud de las formas adultas y en su distribución geográfica (recopilado en Ibáñez-Bernal & Paz-Rodríguez, 1998):

- ◆ Grupo *Protacta* (especies cuyas ninfas de primer estadio carecen de pelos especializados en el metatarso)
 - Complejo *Protacta* (caracterizado por el cuerpo fusiforme y patas cortas del adulto). *T. barberi*, *T. neotomae*, *T. protacta*, por confirmar *T. incrassata*, *T. nitida*, *T. peninsularis* y *T. sinaloensis* de distribución mesoamericana.
 - Complejo *Lecticularia* (cuerpo más ancho y patas largas o de tamaño normal de los adultos). *T. indictiva*, *T. lecticularia* y *T. sanguisuga*, distribución al sur de Estados Unidos y norte de México.
- ◆ Grupo *Rubrofasciata* (especies cuyas ninfas de primer estadio presentan pelos especializados en el metatarso)
 - Subgrupo *Infestans* (presencia de gránulos conspicuos en la porción dorsal del abdomen de la ninfa en quinto estadio)
 - Complejo *Circummaculata*; especies sudamericanas
 - Complejo *Infestans*; especies sudamericanas
 - Complejo *Dispar*; Costa Rica y Panamá
 - Subgrupo *Rubrofasciata* (presenta la porción dorsal del abdomen lisa en ninfas de quinto estadio)
 - Complejo *Rubrofasciata* (distribución oriental)
 - Complejo *Spinolai* (especies sudamericanas)
 - Complejo *Flavida* (especies de las islas del Caribe)
 - Complejo *Nigromaculata* (especies sudamericanas)
 - Complejo *Recurva* (Sur de Estados Unidos y norte de México)
 - Complejo *Phyllosoma* (especies distribuidas sólo en MEXICO).

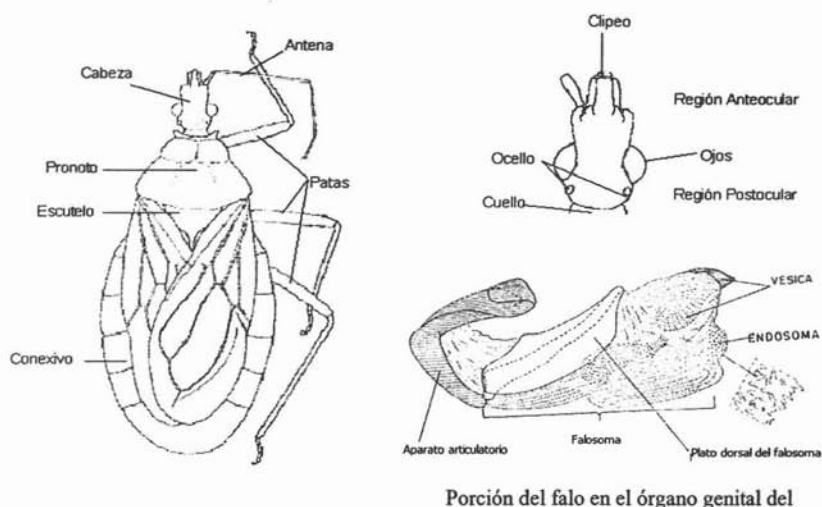


Figura 6. Principales características morfológicas de los triatóminos (Lent y Wygodzinsky, 1979).

La subfamilia Triatominae se reconoce de otros grupos por las antenas lateralmente insertadas, las articulaciones membranosas entre el segundo y tercer segmento del rostro y la ausencia de glándulas de esencia en el lado dorsal del abdomen. (De La Merced, 1987). Entre las estructuras que se utilizan para poder clasificar morfológicamente a estas especies se encuentran, el tamaño de las antenas, su segmentación y su posición a lo largo de la cabeza; también de importancia son las alas, los ojos y los genitales (Figura 6). Además el tamaño del insecto así como la coloración del cuerpo y el conexivo, pueden considerarse como otras características para identificarlos, por ejemplo, ciertas especies miden desde 2.5 a 4.5 cm. de longitud (Lent y Wygodzinsky, 1979), las coloraciones van desde amarillas hasta negras, con manchas de diferentes tonalidades, como son naranjas, cafés, amarillas, blancas, rojas, grises o verdes. Desafortunadamente el tamaño y el color del triatómino evolucionan rápidamente, dando como resultado pequeñas poblaciones domésticas o formas de color camuflajeadas de las misma especie (Miles *et al.*, 2003).

Problemáticas taxonómicas

Debido a que la mayoría de las especies de la subfamilia Triatominae son morfológicamente muy similares, estos presentan frecuentemente problemas de clasificación. El género *Rhodnius*, perteneciente a la tribu Rhodnini, presenta especies de difícil caracterización, por ejemplo, *R. prolixus* es casi indistinguible de *R. robustus*. Con el análisis de aloenzimas estas especies resultaron ser la misma (Harry, 1993), sin embargo con el análisis del DNA mitocondrial pudieron ser separadas (Monteiro, 2000). *R. robustus* ha sido sólo reportada en habitats silvestres, mientras que *R. prolixus* puede ser encontrado tanto en habitats silvestres como domésticos (Monteiro *et al.*, 2001; Miles *et al.*, 2003).

En tanto, la clasificación del género *Triatoma* es complicada, presentando grupos, subgrupos y complejos (Figura 6). Dentro de toda esta clasificación, uno de los complejos que presenta controversias en cuanto a las especies que lo integran es el complejo *Phyllosoma*, actualmente representado por *T. mazzottii*, *T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. picturata*, *T. phyllosoma* y *T. bassolsae*, debido probablemente a la reciente evolución de este grupo de especies (Bargues *et al.*, 2000). Además se han reportado fenómenos de hibridización entre estas especies (Mazzotti & Osorio, 1942; Ryckman, 1962), lo que ha dificultado el reconocimiento de especies diferentes o subespecies (Lent & Wygodzinsky, 1979). Por otro lado, *T. mexicana* y *T. dimidiata* fueron tentativamente incluidas a este complejo (Lent & Wygodzinsky, 1979). En 1994, Schofield propuso la inclusión de *T. dimidiata* al complejo *Phyllosoma*, el que se llamaría complejo Dimidiata. Dujardin y colaboradores propusieron en 1999, la inclusión adicional de *T. bolivari* (Carcavallo *et al.*, 1987), *T. brailoskyi* (Martínez *et al.*, 1984), *T. hegnery* (Mazzottii y Osorio, 1940) y *T. ryckmani* (Carcavallo *et al.*, 1987) al complejo *Phyllosoma*. En el 2001 Guzmán-Bracho incluyó *T. mexicana* en el complejo *Phyllosoma*. En 1999, Alejandre y colaboradores describieron una nueva especie *T. bassolsae*, la cual por características morfológicas se agrupó dentro del complejo *Phyllosoma*; las principales características que presentaba esta especie para ser considerada diferente a las otras pertenecientes al complejo *Phyllosoma* y en

especial de *T. phyllosoma* (morfológicamente similares) son: relaciones morfométricas de la cabeza (región anteocular y segundo segmento del rostro largos), largas y conspicuas pilosidades en diferentes áreas del cuerpo, en especial en la cabeza y los caracteres de los tubérculos anterolateral, lateral y distal del pronoto. Con el uso de sistemas isoenzimáticos y de marcadores nucleares (ITS-2), se corroboró la clasificación morfológica realizada por Lent y Wygodzinsky en el 1979 para las especies del complejo *Phyllosoma*, así como la exclusión de *T. dimidiata* de este complejo (Flores *et al.*, 2001; Marcilla *et al.*, 2001).

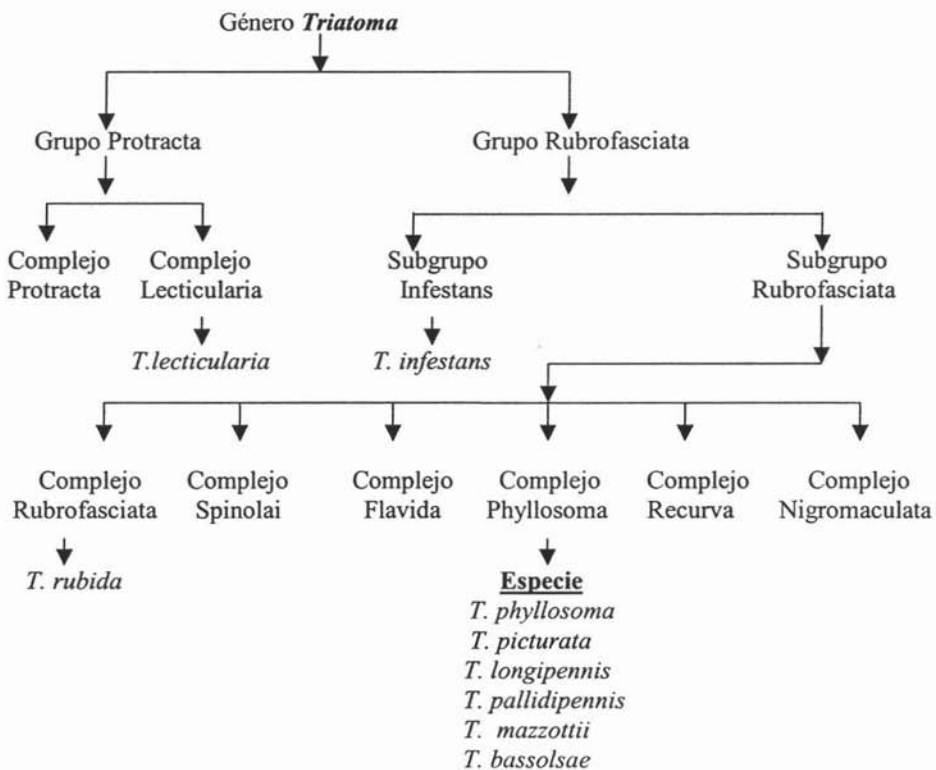


Figura 6.- Clasificación taxonómica para el género *Triatoma*, mostrando la ubicación taxonómica para las especies empleadas en este trabajo (Lent y Wygodzinsky, 1979).

II.7. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares neutrales nos dan una estimación de la diversidad genética neutral, es decir, aquella que no se ve afectada por la selección natural; en los caracteres neutrales, las frecuencias de las diferentes variantes son consecuencia de procesos aleatorios no direccionales, como la migración entre las poblaciones y la deriva genética⁵, mientras que el mantenimiento de nuevos fenotipos surgidos por mutación⁶ depende de su valor selectivo. Existen distintos tipos de técnicas para evaluar la diversidad genética, las cuales ofrecen información variada según las características de la molécula analizada.

De acuerdo al tipo de metodología utilizada, se pueden distinguir dos grandes grupos de marcadores (Tabla 3):

- Basados en el análisis de proteínas (análisis isoenzimático, polimorfismo posicional de péptidos).
- Basados en el análisis de DNA (hibridación⁷ con sondas marcadas, amplificación por PCR).

Además, los marcadores se pueden diferenciar como haploides⁸ o diploides⁹, dependiendo del tipo de genoma del que provengan y como dominantes o codominantes (Jiménez & Collada, 2000). En la tabla 3 se resumen algunas características de marcadores genéticos usualmente utilizados.

⁵ Fuerza evolutiva por medio de la cual hay fluctuaciones impredecibles de las frecuencias alélicas de una población.

⁶ Modificación hereditaria permanente de la secuencia de nucleótidos de un cromosoma, por lo general es un único gen; suele producir un cambio o la pérdida de la función normal del producto genético.

⁷ Formación natural o construcción artificial de una molécula de ácido nucleico dúplex por apareamiento de bases complementarias entre dos cadenas de ácidos nucleicos procedentes de distintas fuentes.

⁸ Organismo o célula que contiene una única dotación cromosómica.

⁹ En los eucariotas, organismo o célula con dos juegos de cromosomas derivados de cada uno de los gametos haploides.

Tabla 3. Características y aplicaciones de algunos marcadores genéticos (Hillis *et al.*, 1996)

Tipo de marcador		Genética	Aplicación		
			Diversidad	Evolución	Dif. de poblaciones
NUCLEAR Metabólico	Fenoles	Co-d, Ad	+	+	(+)
	Terpenos	Co-d, Ad	+	(+)	+
Proteína Isoenzimas		Co-d, N(/Ad)	+		(+)
DNA	RAPD	Dom, N	+	(+)	(+)
	LRND	Co-d, N/Ad	+		
	SSR	Co-d, N	+		
	ITS	Co-d, N	+	+	(+)
	AFLP	Co-d, N	+		
CITOPLÁSMATICO mtDNA	RFLP	Maternal, N		+	+
cpDNA	RFLP, SSR	Maternal/ Paternal, N	(+)	+	+

Abreviaturas: mtDNA - DNA mitocondrial; cpDNA - DNA de cloroplasto; RAPD - random amplified polymorphic DNA; LRND - low repeat number DNA; SSR - simple sequence repeats; ITS - internal transcribed spacer of ribosomal DNA; AFLP - amplified fragment length polymorphism; RFLP - restriction fragment length polymorphism; Co-d - co-dominante; Dom - dominante; Ad - adaptativo; N - neutral.

II.7.a. Marcadores utilizados en triatóminos

A pesar que existen estudios sobre análisis genéticos de los triatóminos desde principios de 1990 como por ejemplo, los estudios citogenéticos, esta área se encuentra en sus inicios comparados con otros grupos de vectores. El método más empleado para los estudios sistemáticos son las aloenzimas, representando aproximadamente el 65% de los trabajos publicados (Monteiro *et al.*, 2001).

En los últimos años, los métodos basados en el análisis del DNA, han tenido gran impacto en este campo, estos son frecuentemente utilizados para hacer estudios filogenéticos ya que no se ven afectados por variaciones ambientales, ni del desarrollo del organismo estudiado, además el número de polimorfismos detectados es ilimitado, se pueden seleccionar secuencias específicas en todo el genoma y se puede analizar lo que se expresa y lo que no se expresa. Entre algunos métodos empleados para el estudio de los triatóminos, basados en el análisis del DNA, se encuentran los RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), el SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) y la secuenciación del DNA tanto nuclear como mitocondrial (Monteiro *et al.*, 2001).

Al analizar la funcionalidad de los RAPD's, se encontró que estos marcadores son de gran utilidad para diferenciar individuos a nivel de géneros, por ejemplo en el caso de *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*, y en el caso de especies cercanamente relacionadas del género *Rhodnius* (*R. pictipes*, *R. ecuadorensis*, *R. neglectus*, *R. nasutus*, *R. robustus* y *R. prolixus*) se pudieron encontrar perfiles diferentes que podrían distinguir a las especies (García *et al.*, 1998). Sin embargo en el caso de algunas especies del complejo *Phyllosoma*, que al igual que las del género *Rhodnius* son muy cercanas (*T. longipennis*, *T. picturata* y *T. pallidipennis*), no se encontraron perfiles de bandedo que pudieran diferenciar a *T. longipennis* de *T. picturata*, en tanto que se observaron pocas bandas para diferenciarlas de *T. pallidipennis* (Breniere *et al.*, 2003). Por otro lado, analizando la variación genética de distintas especies representativas de

los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* empleando SSCP, se observó su utilidad para determinar variaciones inter e intraespecíficas. En este análisis, los géneros *Triatoma* y *Panstrongylus* estuvieron cercanamente relacionados, comparadas con el género *Rhodnius* (Stothard *et al.*, 1998).

Los análisis genéticos de los triatóminos empleando secuencias parciales de DNA, incluyen tanto secuencias de origen nuclear como mitocondrial. En el caso de secuencias mitocondriales, se ha empleado porciones de los genes del RNA ribosomal mitocondrial (12S y 16S), el citocromo oxidasa I (COI) y el citocromo B (mtCytB) principalmente. Diferentes especies de triatóminos han sido analizados con estos marcadores, como por ejemplo, algunas especies del género *Rhodnius* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. pictipes*, entre otros), *Panstrongylus* (*P. megistus*) y diferentes complejos de especies del género *Triatoma* (*T. infestans*, *T. protacta*, *T. dimidiata*, y otros), en el que solo se han trabajado con dos especies del complejo *Phyllosoma*, *T. mazzottii* (12S y 16S) (García *et al.*, 2001) y *T. pallidipennis* (CytB) (Lyman *et al.*, 1999). Los genes 12S, 16S y el COI, fueron utilizados para ver relaciones filogenéticas entre diferentes especies de complejos de triatóminos; los dos primeros marcadores presentaron un porcentaje de 32.7 y 32.2 % de sitios variables respectivamente, lo que nos indica que son buenos marcadores para distinguir a nivel de complejos, sin embargo no se analizaron especies de complejos muy estrechamente relacionados (complejo *Phyllosoma* y especies del género *Rhodnius*), a pesar de ello, se comparó a *T. dimidiata* con el complejo *Phyllosoma*, encontrando que esta especie tan polémica en cuanto a su clasificación, se encontraba relacionada cercanamente con *T. mazzottii* (García *et al.*, 2001).

En el caso del Cyt B y de mtl surRNA (mitochondrial large subunit ribosomal RNA), los análisis filogenéticos produjeron resultados que fueron consistentes con la taxonomía aceptada de la subfamilia Triatominae (se analizaron algunas especies de la tribu Rhodniini y la Triatomini), distinguiendo a las dos tribus así como los subgrupos de estas. En este estudio se analizaron especies del género *Rhodnius* que presentan

problemas de identificación, logrando separarlas y confirmando la taxonomía de este grupo, sin embargo, al igual que en el estudio con el 12S, 16S y COI no se analizaron especies del complejo *Phyllosoma* (Lyman *et al.*, 1999).

En los análisis de las secuencias del DNA de origen nuclear, también se han empleado diferentes tipos de marcadores. Los más empleados corresponden a marcadores del DNA ribosomal (rDNA), como la sub-unidad pequeña o 18S, con la cual se encontró una temprana divergencia entre las tribus Triatomini y Rhodniini, mostrando ser un buen marcador a nivel de poblaciones, sin embargo a nivel de géneros y de especies estrechamente relacionadas fue incapaz de resolver las afiliaciones genéticas (no pudiendo distinguir entre los géneros *Panstrongylus* y *Dipetalogaster* del género *Triatoma* y las especies del Complejo *Phyllosoma*) (Bargues *et al.*, 2002). El ITS-2 (Internal Transcribed Spacer 2), perteneciente al nrDNA ha sido de gran utilidad para resolver relaciones filogenéticas desde niveles superiores hasta sub-especies e híbridos (Marcilla *et al.*, 2001; Bargues *et al.*, 2002).

II.7.b. Espaciador Transcrito Interno 2 (ITS-2)

Una de las secuencias más usadas en eucariontes es el cistron ribosomal, el cual tiene dos espaciadores internos transcritos; éstos separan a las subunidades 18S, 5.8S y 28S. El ITS 1 (espacio interno transcrito 1) localizado entre la subunidad pequeña 18S y 5.8S región codificadora y el ITS 2 que se encuentra entre la subunidad 5.8S y la subunidad grande 28S. Todas estas subunidades son conocidas como la unidad transcrita del nrDNA (DNA ribosomal nuclear) y cada una de ellas se encuentra flanqueada por dos espaciadores externos transcritos (ETS) y separada por un espaciador no transcrito (NTS) (Fig. 7).

El rDNA constituye una familia multigénica de repeticiones en tandem, los cuales experimentan una rápida evolución concertada¹⁰ (Arnheim *et al.*, 1980) a través

¹⁰ La generación y manutención de la homogeneidad entre miembros de una familia de repeticiones de DNA dentro de una especie o población.

de conversión génica y por entrecruzamiento desigual (Dover, 1982), como resultado de esta evolución, todas las copias de las familias del rDNA son rápidamente homogenizadas dentro de individuos y especies, sin embargo la divergencia interespecífica puede ser alta (Hillis & Dixon 1991). La evolución concertada y la recombinación sexual tienden a promover la uniformidad del ITS dentro de individuos y entre individuos de poblaciones de la misma especie (Soltis & Kuzoff 1993). Por lo que en teoría, con pocos individuos se pueden establecer las relaciones filogenéticas entre distintas especies. Sin embargo, existe evidencia que sugiere la existencia de variación significativa entre secuencias de ITS de un organismo, la cual ocurre sólo dentro de organismos que son híbridos, tanto diploides como poliploides, de padres diferentes (Buckler *et al.*, 1997).

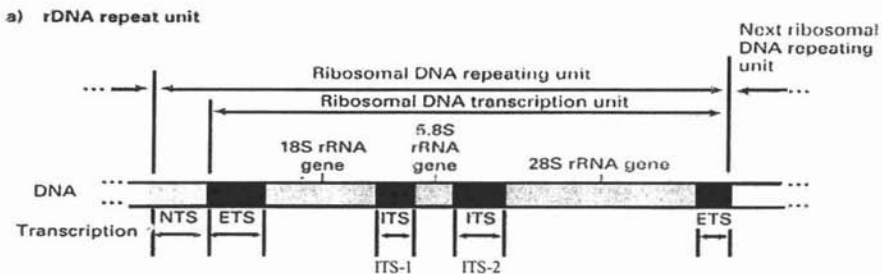


Figura 7. Diagrama del gen ribosomal presentando al ITS-2. (Tomado de Hillis *et al.*, 1996)

Los espaciadores tanto internos como externos contiene señales para procesar el rRNA (van Nues *et al.*, 1994); se ha observado que deleciones en ciertas regiones del ITS-1 inhiben la maduración de la subunidad pequeña y larga del rRNAs (Muster *et al.*, 1990), mientras que ciertas deleciones¹¹ o mutaciones puntuales en el ITS-2 impiden en procesamiento de la subunidad larga del rRNA (Sande *et al.*, 1992). Son varias las ventajas que proporciona el uso del ITS-2 como marcador molecular, por ejemplo, dado que la región del ITS se encuentra altamente representado en el genoma, se puede amplificar con cantidades pequeñas de DNA; las secuencias altamente conservadas dentro de la mayoría de los genes del nrDNA son muy útiles en el diseño de

¹¹ Pérdida de material genético de un cromosoma que puede ir desde la pérdida de un solo nucleótido (deleción puntual) hasta la pérdida de grandes regiones visibles.

oligonucleótidos¹² “universales”, lo cual facilita la amplificación del ITS, mediante el uso de la PCR. Estos marcadores despliegan bajos niveles de homoplasia¹³ (similitud no debida a parentesco), además detecta grupos monofiléticos (taxones derivados de un solo ancestro común) y polifiléticos¹⁴ (taxones con diferentes ancestros), con los que se puede obtener información valiosa acerca de la evolución y las relaciones entre taxa que divergieron relativamente hace poco tiempo, menores de 50 millones de años (Marcilla *et al.*, 2001).

A nivel de género y especie, diversos estudios que han empleado el ITS para reconstrucciones filogenéticas en diferentes eucariontes, reportando que este sitio es más informativo que las secuencias de genes del mismo organismo (Figura 8) (Coleman, 2003).

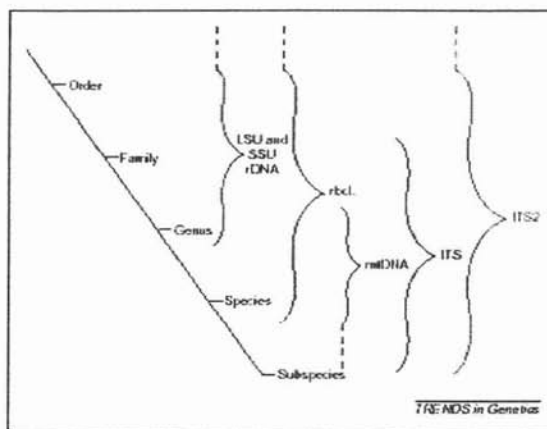


Figura 8. Diagrama de las diferentes categorías taxonómicas. Las ramas indican el rango aproximado de resolución de diferentes secuencias de DNA comúnmente utilizadas para comparaciones filogenéticas (Tomado de: Coleman, 2003).

En distintas especies del género *Triatoma* y *Rhodnius*, se ha empleado el ITS-2 como marcador molecular, siendo de gran utilidad para resolver relaciones

¹² Una cadena corta de nucleótidos, frecuentemente producida en el laboratorio.

¹³ Cuando un carácter se desarrolla independientemente a partir de ancestros diferentes.

¹⁴ Cuando los integrantes de un grupo taxonómico tiene varios antepasados diferentes.

supraespecíficas, específicas, subespecíficas y algunas veces a nivel de población entre una misma especie. En el caso particular de las especies pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, el marcador nuclear ITS-2 logró separar filogenéticamente a la mayoría de ellas, a excepción de *T. picturata* y *T. longipennis*, a las cuales no logró diferenciarlas. Al analizar las especies de *T. dimidiata*, se observa una variación entre los individuos de diferente procedencia (Marcilla *et al.*, 2000), indicando que este marcador puede diferenciar entre poblaciones de especies de lugares diferentes. Por otro lado, en el género *Panstrongylus*, se analizaron diferentes especies, utilizando este mismo marcador, logrando resolver problemas de ancestría, sugiriendo que este género es polifilético (Marcilla *et al.*, 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

La principal vía de infección con *T. cruzi* es a través de los insectos vectores, los triatóminos son insectos que se encuentran distribuidos en gran parte del territorio mexicano y dado que llegan a colonizar áreas peridomésticas y domésticas aumentan el riesgo de infección en los humanos.

México posee muchas especies de vectores diferentes a los conocidos en Sudamérica, entre ellas se encuentra las especies pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, que son especies endémicas de nuestro país, por lo que los resultados de estudios hechos en otros países no se pueden extrapolar para los vectores localizados en el país.

Un gran problema que presenta este grupo de insectos, es que sólo se pueden clasificar taxonómicamente hasta que se encuentran en su estadio adulto. Hace apenas unos años las clasificaciones taxonómicas se basaban exclusivamente en criterios morfológicos (tamaño de la cabeza, genitales, coloración, etc.), los cuales, entre otros problemas no podían ser usados para diferenciar a los triatóminos cuando se encontraban en estadios ninfales. Por otro lado, aproximadamente el 50% de las colectas de campo están constituidas por insectos que se encuentran en estos primeros estadios. Por lo que, a nivel epidemiológico no se puede saber cuales son los principales vectores transmisores de la Enfermedad de Chagas.

De esta manera es de vital importancia buscar mejores marcadores moleculares que permitan resolver los diferentes aspectos controversiales de este grupo de organismos, tales como, su identificación en estadios ninfales, la posible existencia de variedades, especies crípticas o híbridos, así como definir los vectores más importantes y conocer sus relaciones filogenéticas entre las especies de triatóminos presentes en el país.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Determinar las relaciones filogenéticas en especies del Complejo *Phyllosoma* con base a las secuencias del ITS-2.

IV.2. Objetivos particulares

- Estudiar genéticamente especies no analizadas anteriormente: *T. rubida*, *T. bassolsae* y *T. lecticularia*.
- Corroborar la posible inclusión de *T. bassolsae* dentro del Complejo *Phyllosoma*.
- Confirmar las clasificaciones morfológicas.
- Conocer las relaciones filogenéticas entre las diferentes poblaciones de triatóminos.

V. MATERIAL Y MÉTODO

V.1. Insectos

Se analizaron un total de nueve especies de triatóminos, los cuales incluyen especies del complejo *Phyllosoma* (*Triatoma mazzottii*, *T. longipennis*, *T. pallidipennis*, *T. bassolsae* y *T. picturata*), de complejos externos al *Phyllosoma* (*T. lecticularia* – complejo Lenticularia-, *T. rubida* –complejo Rubrofasciata- y *T. infestans* – complejo Infestans-) y de otro género (*R. prolixus*). Todos los insectos utilizados en este estudio provienen de colonias establecidas por el Dr. Ricardo Alejandr  de la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN. Todos los ejemplares utilizados se encontraban en estadio adulto. La procedencia de los insectos y su lugar de origen, así como el número de individuos analizados, se encuentran descritos en la tabla 4.

Tabla 4. Especies de triatóminos analizados.

Especie	Origen de la colonia	# de ejemplares analizados
<i>T. bassolsae</i>	Puebla	4
<i>T. mazzottii</i>	Guerrero	3
<i>T. longipennis</i>	Nayarit	2
<i>T. picturata</i>	Nayarit	3
<i>T. pallidipennis</i>	Morelos	2
<i>T. rubida</i>	Sonora	3
<i>T. lecticularia</i>	Nuevo León	4
<i>T. infestans</i>	Brasil	3
<i>R. prolixus</i>	Chiapas	3

V.2. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizaron las patas del insecto ya que están libres de contaminación por sangre del hospedero y simbiontes intestinales, los cuales podrían ser amplificados y alterar las relaciones taxonómicas de la especie (García *et al.*, 1998).

Del insecto se cortaron las seis patas, las cuales se congelaron en un tubo de 1.5 mL usando nitrógeno líquido, e inmediatamente se maceraron con ayuda de un micropistilo hasta pulverizarlas. Estas se resuspendieron en 1 mL de solución de extracción (50 mM de Tris-Cl (pH8), 50 mM de EDTA (pH8), 50 mM de NaCl, 20 µg/mL de RNAsa y 1% de SDS), se dejó incubando a 55°C por una hora. Al término, se agregó 150 µL de Proteinasa K (30 mg/mL), se agitó cuidadosamente y se incubó a 37°C toda la noche. Todo el material se pasó a un tubo de 2 mL y se adicionó 1 mL de fenol, se agitó en el vortex y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos. Se extrajo la fase superior (o fase acuosa) y se pasó a otro tubo de 2 mL al cual se le agregó 1 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25/24/1, y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos. Se extrajo la fase superior, se pasó a otro tubo de 2 mL y se le agregó 1 mL de cloroformo, se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos. Se extrajo la fase superior y se pasó a otro tubo de 2 mL; para precipitar el DNA se le agregó 1 mL de etanol frío y 100 µL de acetato de sodio 3M. Se mantuvo una hora a 70°C. Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos. Se tiró el sobrenadante y se quedó con la pastilla, la cual se lavó con etanol al 75% (Sambrook *et al.*, 1989). Finalmente se resuspendió la pastilla de DNA en 30 µL de agua previamente esterilizada, filtrada e irradiada. La concentración de DNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro de capilares, el cual nos proporciona además de la cuantificación, la pureza del DNA mediante lecturas de absorbancia de 260 y 280 nm, considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 µg/mL de DNA.

V.3. PCR

La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó en un volumen de reacción de 25 µL, el cual contenía 200 ng de DNA de cada individuo, 2.5 µL de solución para PCR 1X, 0.25 µL dNTPs a 50 mM, 1 µL de oligos a 100 pM, 1 µL

*Taq*polimerasa (*Taq gold* 5 U, Perkin elmer), 2.5 μ L de $MgCl_2$ a 50 mM y agua EUF. Los oligos utilizados para la amplificación del DNA fueron sintetizados a partir de publicados (Marcilla *et al.*, 2001), los cuales habían sido utilizados para amplificar la región del ITS-2 en triatóminos; las secuencias de los oligos son, directo 5' CTAAGCGGTGGATCACTCGG 3' y reversa 5'GCACTATCAAGCAACACGACTC 3'.

La PCR consistió en un paso inicial a 95 °C por 10 minutos para desprender el anticuerpo que viene acoplado a la polimerasa utilizada y que inhibe su funcionalidad, un segundo paso de desnaturalización a 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de amplificación, las cuales incluyen un minuto a 94°C (desnaturalización de las hebras de DNA), un minuto a 55°C (alineamiento de los oligos) y un minuto a 72°C (elongación); y un paso final de elongación por 7 minutos a 72°C (modificado de Wincker *et al.*, 1994). Los fragmentos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1.5% en solución de electroforesis TAE 1X, corridos a 120 volts por 90 minutos aproximadamente en una cámara de electroforesis horizontal; el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en el transiluminador.

V.4. Clonación

V.4.a. Ligación.

Los amplificados frescos se ligaron con el TA Cloning Kit, en el plásmido pCR® 2.1 (Invitrogen, No. Cat. K2040-40), el cual tiene genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina, así como el fragmento *lacZ α* (este fragmento codifica los primeros 146 aminoácidos de la β -galactosidasa) (Fig. 9), para ello se realizó una mezcla de ligación, la cual contenía, 1.5 μ L de producto de PCR fresco, 1.5 μ L solución de ligación 10X, 1 μ L del vector (25 ng/ μ l), agua estéril y la DNA ligasa T4 (4.0 Weiss units), esta mezcla se dejó incubando toda la noche a 14°C en el termociclador. La ligación se guardó a -20°C para su posterior uso.

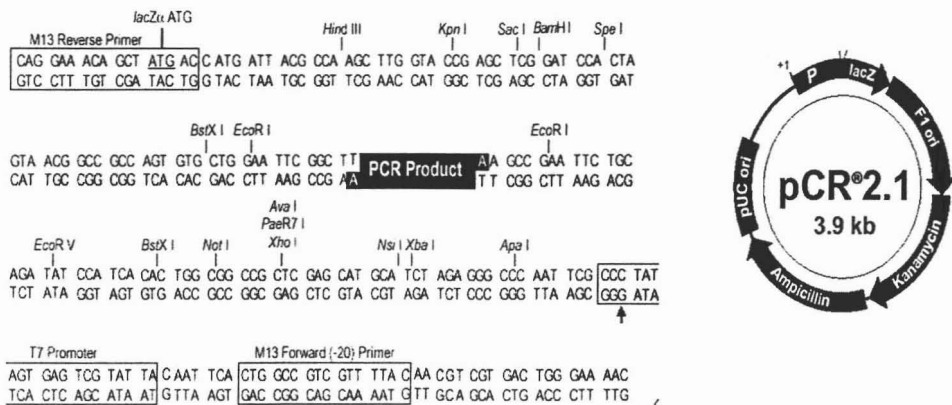


Figura 9. Se muestra la secuencia del vector de clonación, donde se ilustra el sitio de clonación y los sitios útiles para la escisión posterior del producto de clonación así como el lugar de los genes que le confieren resistencia a los antibióticos para su selección.

V.4.b. Transformación¹⁵

El producto de ligación se empleó para transformar células competentes (células TOP 10 de *E. coli*). Las células fueron descongeladas 5 minutos antes de su uso; al vial de células se le agregó 2.5 µL de producto de ligación y se incubó en hielo por 30 minutos. Posteriormente se le dio un choque térmico a 42°C por 30 segundos en un baño María. Las células se recuperaron, agregando al vial 250 µL de medio SOC (reactivo proveniente en el Kit de clonación, Invitrogen No. Cat. K2040-40) e incubando inmediatamente a 37°C por una hora. Las células se cultivaron en placas de cultivo con medio Luria-Bertani sólido más kanamicina (50 µg/mL), así como el reactivo X-Gal (stock 40 mg/mL, el cual se adiciona a las cajas del medio de cultivo 10 minutos antes de su uso). Finalmente se deja incubando a 37°C toda la noche.

En las placas que se sembraron, se vieron dos tipos de colonias, unas blancas y otras azules. Las colonias azules corresponden a las colonias en las que sí se ha producido la inserción del vector (puesto que han crecido en presencia de antibiótico),

¹⁵ Proceso de introducción de DNA exógeno en una bacteria por medios físicos o químicos (Madigan *et al.*, 1998).

pero no presenta el inserto de DNA, con lo cual el gen de la galactosidasa actúa en presencia de X-Gal y da lugar a un precipitado de color azul (cuando la β -galactosidasa, enzima codificada en el plásmido introducido, hidroliza a X-Gal, forma galactosa y un alcohol -Indol- que se oxida con el oxígeno, produciendo un color azul; cuando este gen está interrumpido por la presencia del inserto no se traduce la β -galactosidasa). Las colonias blancas, corresponden a colonias de células competentes en las que el vector o plásmido presenta el inserto. El punto de inserción está interrumpiendo el gen de la galactosidasa. Se seleccionaron tres colonias blancas de cada placa y se cultivaron en medio LB más kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), toda la noche a 37°C.

V.4.c. Extracción de DNA de plásmido¹⁶

La extracción de DNA de plásmido se realizó mediante la técnica de lisis alcalina. Se centrifugó el cultivo bacteriano en un tubo de 1.5 mL a 14 000 rpm por un minuto, para obtener la pastilla de células bacterianas. A la pastilla obtenida, se agregó 150 μL de solución I (500 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH8), se agitó fuertemente; se agregó 200 μL de solución II recién preparada (0.2 N NaOH, 1 % SDS), se mezcló por inversión de 4 a 6 veces; se agregó 100 μL de solución III (5 M de acetato de potasio, 11.5 mL de ácido acético glacial 99.7% de pureza, agua) y se mezcló por inversión de 4-6 veces. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos (4°C). Se extrajo todo el sobrenadante y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL, y se agregó 500 μL de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico en una proporción 25/24/1 y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos; se recuperó la fase superior (o fase acuosa) y se transfirió a otro tubo de 1.5 mL y se le agregó 500 μL de cloroformo, se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos. Se recuperó la fase superior y se pasó a otro tubo de 1.5 mL, al cual se le agregó 1 mL de etanol frío y se deja a -70°C por una hora. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos. Se tiró el sobrenadante y se quedó con la pastilla, la cual se lavó con etanol al 75%. Finalmente se resuspende la pastilla de DNA con 30 μL de solución TE con RNAsa [20 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

¹⁶ DNA circular extracromosómico que se autoreplica (Madigan *et al.*, 1998).

V.4.d. Digestión del DNA de plásmido

El DNA de plásmido se digirió con la enzima EcoRI. La digestión se realizó en un volumen de 20 μL , el cual contenía 2 μL de DNA de plásmido, 2 μL de solución de ligación 10X, 1 μL de EcoRI y 15 μL de agua estéril. Los controles de la digestión sólo contenían 2 μL del DNA de plásmido y 18 μL de agua estéril. Estas reacciones se dejaron incubando 3 horas a 37°C. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% con búffer TAE 1X a 120 volts por 90 minutos; el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en el transiluminador de rayos U.V., para verificar cuales clonas poseen el inserto esperado. Las clonas que tuvieron el inserto deseado se volvieron a sembrar en medio LB líquido con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37°C toda la noche. El DNA de plásmido se extrajo de nuevo, pero ahora con QIAprep® Miniprep Kit, QIAGEN, para tener una mejor pureza del DNA, el cual se extrajo siguiendo la metodología que establece el protocolo. El DNA se cuantificó en el espectrofotómetro de capilares.

V.5. Secuenciación

La región del ITS-2 que fue amplificado por la PCR fue secuenciada en el secuenciador automático Abi Prism 310 (Applied Biosystems). Los oligos utilizados para la mayoría de las secuenciaciones fueron el M13 Reverse y el T7 promoter, los cuales se encuentran dentro del vector de clonación y sólo en algunas secuencias se utilizó otro oligo sustituyendo al M13 Reverse, al cual se denominó oligo interno. Este oligo se diseñó porque el tamaño del fragmento a secuenciar es muy grande (aproximadamente 700 bases) y la resolución de la secuenciación es de aproximadamente 500 bases, por lo que, no se resolvían las secuencias de nucleótidos que se encuentra en el ITS-2. Para diseñar este oligo, se alinearon todas las secuencias hasta ese momento obtenidas y en la región del 28 S se diseñó la secuencia del oligo, la cual se encontraba aproximadamente a 70 nucleótidos del final del ITS-2 (Anexo 1). La secuencia del oligo interno fue 5' CTGTTGGTTTCTTTCCACC 3'.

Las secuencias obtenidas se procesaron por medio de dos programas, DNAMAN (Lynnon Corporation, 2001) y DNAsis (Hitachi Software Engineering Company, Ltd), siendo los pasos requeridos para ello los siguientes:

1) Con el programa DNAMAN, se cambió el formato en el que se encuentran las secuencias cuando son obtenidas del secuenciador (ABI Prism), el cual se presenta en formato de texto. Este programa nos agrupa a la secuencia en 6 columnas de 10 nucleótidos cada uno, de tal manera que se pueda trabajar con ella en el programa DNAsis.

2) Con el DNAsis, se identificaron los lugares donde se localizan los primers para eliminar la secuencia que corresponde al vector. Posteriormente se realizó un alineamiento de la secuencia directa y reversa por cada individuo para obtener una secuencia consenso y además verificar que los nucleótidos para ambas cadenas fueran los mismos. Estos últimos pasos son laboriosos, ya que se tiene que verificar la autenticidad de la secuencia.

V.6. Análisis de los datos

V.6.a. Alineamiento de las secuencias

Las secuencias fueron alineadas usando Clustal W Multiple Alignment versión 1.8 (Thompson *et al.*, 1994) contenido en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.0 (Hall, 1999). El Clustal W, está hecho para construir alineamientos pareados o múltiples de secuencias biológicas, el programa automáticamente alinea las secuencias basado en alineamientos progresivos. Los parámetros utilizados para este alineamiento fueron dados predeterminadamente por el programa (tres gaps de penalties de iniciación y uno de extensión), además para detectar probables errores se revisó manualmente el alineamiento. Para determinar la región del ITS-2, se alinearon las secuencias obtenidas en este trabajo con aquellas secuencias del ITS-2 para algunas especies de triatomas reportados en el GenBank (*Triatoma pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. picturata*, *T. phyllosoma*, *T. mazzottii*, *T. infestans* y *Rhodnius prolixus*),

de esta manera por homología, se determinó la secuencia del ITS-2 en nuestras secuencias.

V.6.b. Matriz de distancias

La distancia evolutiva entre un par de secuencias normalmente es medida por el número de sustituciones de nucleótidos que se dan entre ellas (Hillis *et al.*, 1996). Por lo que se realizó una matriz de distancias empleando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 3.0 (Kumar *et al.*, 2004), utilizando la opción “Distancia” contenida en el menú principal. El modelo de sustitución de nucleótidos escogido fue el de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), que se consideró ser el modelo más afín al comportamiento de las sustituciones entre nucleótidos (ver Resultados). El modelo de Tamura-Nei (1993), considera que existen diferentes tasas de sustitución entre los nucleótidos y que las frecuencias de cada uno de estos son desiguales. Además puede distinguir entre tasas de sustitución transicionales¹⁷ entre purinas (A y G) y entre pirimidinas (T y C) y tasas de sustitución transversionales¹⁸ entre purinas y pirimidinas (A y T o C; G y T o C) (Kumar *et al.*, 2004). La tabla 5 ilustra el modelo de Tamura-Nei.

Tabla 5. Modelo de sustitución de nucleótidos Tamura-Nei (Kumar *et al.*, 2004)

	A	T	C	G
A	-	βg_T	βg_C	$\alpha_1 g_G$
T	βg_A	-	$\alpha_2 g_C$	βg_G
C	βg_A	$\alpha_2 g_T$	-	βg_G
G	$\alpha_1 g_A$	βg_T	βg_C	-

α_1 y α_2 son las tasas de sustitución transicionales entre purinas y entre pirimidinas, respectivamente; β es la tasa de sustitución transversional y g_i indica la frecuencia de nucleótidos (A, T, C, G).

¹⁷ Transición: Mutación puntual que consiste en el cambio de un nucleótido por otro de su misma clase (purina por purina o pirimidina por pirimidina) (Hillis *et al.*, 1996).

¹⁸ Tranversión: Mutación puntual que consiste en el cambio de un nucleótido por otro de distinta clase (purina por pirimidina y viceversa) (Hillis *et al.*, 1996).

Para la realización de la matriz de distancias, además de elegir el modelo de Tamura-Nei, se consideró que la distribución entre las tasas de variación entre los sitios fueran uniformes, así como también el número de sustituciones de nucleótidos por base (transiciones y transversiones), empleando la siguiente fórmula:

$$d = -k_1 \log_e(w_1) - k_2 \log_e(w_2) - k_3 \log_e(w_3)$$

donde d es la distancia; P_1 y P_2 son las proporciones de las diferentes transiciones entre los nucleótidos A y G, y entre T y C, respectivamente; Q es la proporción de las diferentes transversiones; g_A, g_C, g_T, g_G son las frecuencias respectivas de A, C, T y G; $g_R = g_A + g_G$; $g_Y = g_T + g_C$, además

$$k_1 = 2g_{AG}/g_R$$

$$k_2 = 2g_{TC}/g_Y$$

$$K_3 = 2(g_R g_Y - g_A g_C g_Y / g_R - g_T g_C g_R / g_Y)$$

$$W_1 = 1 - P_1 / k_1 - Q / 2g_R$$

$$W_2 = 1 - P_2 / k_2 - Q / 2g_Y$$

$$W_3 = 1 - Q / 2g_R g_Y$$

V.6.c. Análisis filogenético

El método Bayesiano y de unión de vecinos (Neighbor-joining, NJ)¹⁹ fueron utilizados en la reconstrucción filogenética. Primero se sometieron las secuencias al análisis filogenético en el programa Mr. Bayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), el cual utiliza el método bayesiano para la realización del análisis. La inferencia bayesiana en el análisis filogenético esta basado en la distribución de la probabilidad posterior de los árboles, la cual es la probabilidad de un árbol condicionado a las observaciones, este condicionamiento esta basado en el Teorema de Bayes.

¹⁹ Un método heurístico para obtener un punto estimado de un árbol de evolución mínimo (Hillis *et al.*, 1996).

Las secuencias de ITS-2 se analizaron en el programa, empleando los siguientes parámetros:

- Grupo externo²⁰: *Rodnius prolixus*

- Nst=6 Número de tipos de sustituciones (Nst= number of substitution types).

Existen diferentes opciones en cuanto al número de tipos de sustituciones que se emplean, cuando Nst=1, las tasas de sustitución son las mismas (por ejemplo: parecido a un modelo JC²¹ o F81²²); Nst=2, considera que las transiciones y transversiones tienen potencialmente tasas de sustitución diferentes (por ejemplo: modelo K80²³ o HKY85²⁴); Nst=6, indica que todas las tasas de sustitución son diferentes, sometidas a un tiempo reversible (por ejemplo, el modelo GTR –General Time Reversible).

- Rates=gamma²⁵

Esta opción indica el modelo para las tasas de variación entre sitios; la tasa de sustitución en un sitio es esquematizada en este tipo de distribución, la cual tiene un solo parámetro que describe cuánto varían las tasas.

- mcmc ngen=1000000 nchains=4 samplefreq=1000;

Estas opciones inician el análisis de la cadena de Markov y Monte Carlo (MCMC), como ya se mencionó la probabilidad posterior de los árboles (y otros parámetros de los modelos de sustitución) no pueden ser determinados analíticamente, en cambio el MCMC es usado para aproximar la probabilidad posterior de los árboles por las

²⁰ Uno o más taxa que se considera se encuentran fuera del grupo interno o el grupo a analizar (Hillis *et al.*, 1996).

²¹ Este método fue desarrollado bajo la suposición que las tasas de sustitución de los nucleótidos es la misma para todos los pares de los cuatro nucleótidos (A, G, C, T) y está dado por la estimación de la máxima verosimilitud del número de sustituciones de nucleótidos entre dos secuencias (Jukes & Cantor, 1969).

²² Este modelo divide los procesos de sustitución en dos componentes: tasas de sustituciones generales capaces de producir todos los tipos de cambios, y las tasas de sustitución dentro del grupo que producen sólo transiciones (Felsenstein, 1984).

²³ El modelo K80 considera que la frecuencia de las bases son iguales y a la diferencia entre transiciones y transversiones como un solo parámetro: $\pi_i = 1/4 \forall i$, α transiciones=1.0, α transversiones= α_1 (Kimura, 1980).

²⁴ El modelo HKY85, asume que las frecuencias de las bases son diferentes y considera las diferencias entre transiciones y transversiones con un parámetro α transición=1.0, α transversiones = α_1 (Hasegawa-Kishino-Yano, 85).

²⁵ En estadística la distribución gamma es una distribución de probabilidad (F(x) es una función de la probabilidad que representa los resultados que se van obteniendo en un experimento aleatorio) continua con dos parámetros k y λ .

muestras esquematizadas desde la probabilidad posterior. Por lo que se realizó un análisis MCMC con cuatro cadenas. El número de ciclos para los algoritmos MCMC son de 1, 000,000 en tanto que cada 1000 ciclos la cadena es muestreada.

Basados en los resultados de las tasas de sustitución de nucleótidos obtenidos en el programa Mr. Bayes, se determinó que el modelo de sustitución de nucleótidos que podría ser más adecuado para las secuencias de ITS-2 era el de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) (ver resultados), por lo que se realizó un segundo análisis filogenético en el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Análisis) versión 3.0 (Kumar *et al.*, 2004), empleando el método de unión de vecinos (Neighbor-joining, NJ) y el modelo de Tamura-Nei, con la opción de bootstrap²⁶ de 1000 replicas. Finalmente para la visualización gráfica de los árboles obtenidos se utilizó el programa TreeView (Page, 1996)

²⁶ Método estadístico por el cual, las distribuciones que son difíciles de calcular exactamente pueden ser estimadas por creaciones repetidas y análisis de set de datos artificiales.

VI. RESULTADOS

VI.1. Extracción de DNA

El protocolo para la extracción del DNA fue modificado del protocolo original establecido por Sambrook y colaboradores en 1989, del cual, la principal modificación fue hecha en la concentración de Proteinasa K, la cual fue aumentada, debido a que las patas del insecto (del cual se extrae el DNA) poseen gran cantidad de quitina, lo cual requiere que esta proteína sea desnaturalizada y deje al descubierto el DNA, de tal manera que se obtuvieron mayores concentraciones de DNA de las que se habían obtenido (0.5 a 1.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con el protocolo original.

VI.2. PCR y Secuenciación

Se utilizaron 200 ng de DNA para la PCR y debido a que sólo conocíamos el tamaño del ITS-2 para algunas especies de triatóminos, teníamos un estimado del tamaño del producto de PCR a esperar, ya que los primers empleados además de amplificar la región del ITS-2, también amplifican fragmentos de los genes que limitan a esta región (5.8 S y 28 S rDNA). El primer protocolo de PCR experimentado, resultaba en un fragmento de aproximadamente 700 pb, sin embargo, estos resultados no eran reproducibles para todas las especies, por lo que se realizaron algunas modificaciones a este protocolo (ver Material y Método), logrando obtener bandas constantes y reproducibles; en el caso de las especies del género *Triatoma* se obtuvieron amplificadas de aproximadamente 950 pb, en tanto que para el género *Rhodnius*, se obtuvo un amplificado de 1200 pb.

En la figura 10, se observan los productos de amplificación de PCR para algunas especies de los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*, en el cual también se distinguió, que además de tener un amplificado de forma abundante (950 pb y 1200 pb para cada género respectivamente), se observan fragmentos de menor tamaño a estos. Los fragmentos de PCR fueron clonados y posteriormente se digirieron las clonas para determinar cuales se secuenciarían (ver Material y Método). La mayoría de las clonas presentaban el inserto esperado, sin embargo, para las especies *T. mazzottii* (individuos

Tmaz16 y Tmaz38), *T. bassolsae* (Tbal2) y *R. prolixus* (Rpro48) se encontraron clonas con insertos de tamaños diferentes a estos, los cuales correspondían a algunos fragmentos de menor tamaño encontrados en el PCR (Fig. 10). En el caso de *T. bassolsae* y *R. prolixus*, las secuencias que se obtuvieron de estas clonas, no mostraron diferencias significativas con aquellas secuencias de clonas con insertos esperados (datos no mostrados). Sin embargo, para las clonas de *T. mazzottii* se encontraron dos individuos con fragmentos clonados de diferentes tamaños (700 y 800 pb) (Fig. 11).

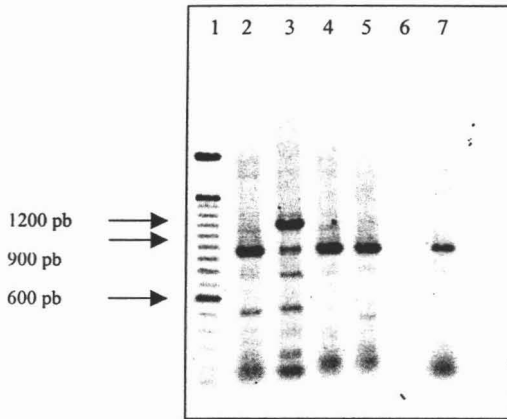


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los amplificados de PCR, teñido con bromuro de etidio y registrado en el transiluminador. En el carril 1, se encuentra el marcador de peso molecular (cada banda representa 100pb a excepción de la última banda de 2072pb); carril 2) *T. mazzottii* (Tmaz38); carril 3) *R. prolixus* (Rpro48); carril 4) *T. mazzottii* (Tmaz85); carril 5) *T. lecticularia* (Tlec62) carril 7) *T. bassolsae* (Tbal2).

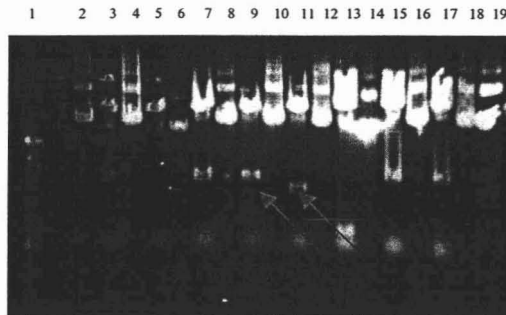


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para las clonas obtenidas. En el carril 1, se encuentra el marcador de peso molecular (cada banda representa 100pb a excepción de la última banda de 2072pb); carriles 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, clonas digeridas con EcoRI; carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, clonas sin digerir. Del carril 8 al 13 se encuentran las clonas para *T. mazzottii* (Tmaz38), marcados con flechas se observan los diferentes tamaños obtenidos en el individuo ITM38 (clona 1 y 2 -carriles 8 y 10, contra la clona 3 -carril 12).

Al analizar las secuencias de estas clonas, ambas presentaban menor número de nucleótidos, comparados con la secuencia de la clona que presentaban el tamaño de 900 pb (Tmaz38 clona 1) y que corresponde al estándar de los tamaños esperados para las diferentes especies de triatóminos. La secuencia obtenida para el individuo Tmaz38 clona 3 presentaba una delección de 142 pb al inicio del ITS-2. Dado que se secuenció parte del gen 5.8 S ribosomal, este fragmento también mostraba nucleótidos faltantes, encontrando que de las 151 pb secuenciadas del gen (5.8 S), sólo hay 77 pb, las cuales se encuentran al inicio de la secuencia del gen, teniendo una delección de nucleótidos de 74 pb (Figura 12). En el caso del individuo Tmaz16, este presentó la secuencia del 5.8 S ribosomal de manera completa y 13 pb correspondientes al inicio del ITS-2, posteriormente se observó una delección de la secuencia hasta encontrarse de nuevo a 246 pb del inicio del ITS-2 (Figura 12).

Las secuencias nos mostraron que estos nucleótidos faltantes son reales, ya que se encuentran delimitados por los genes ribosomales (5.8 S y 28 S), es decir, existen fragmentos (en el caso del individuo Tmaz38 clona 3) o todo el fragmento (para el individuo Tmaz16) del gen 5.8S, el cual delimita la región del ITS-2. El Southern blot realizado, usando como sonda el fragmento de 700 pb, que corresponde a la clona Tmaz16, nos confirmó que estas clonas y los nucleótidos faltantes son reales. Como vemos en la figura 13, la sonda hibridizó tanto con aquellas clonas que presentaban bandas con el tamaño esperado (900 pb), como con aquellas que presentaron un menor tamaño de banda. Se corroboró de esta manera que ambos fragmentos correspondieron al ITS-2 y que existen prevalencia de cistrones de diferentes tamaños en un mismo individuo. De esta manera corroboramos que los fragmentos de PCR con tamaños de 950 pb para *Triatoma* y de 1200 para *Rhodnius* son los que presentan el ITS-2 de manera completa, y con los cuales se trabajaron para los demás análisis.

Tmaz38 (Cl. 1)	CTAAGCGGTG	GATCACTCGG	CTCGTGGGTC	GATGAAAGAC	GCAGCAAAC	GCGCGTCGTC	ATGTGAACTG	} 5.8 S	
Tmaz38 (Cl. 3)	CTAAGCGGTG	GATCACTCGG	CTCGTGGGTC	GATGAAAGAC	GCAGCAAAC	GCGCGTCGTC	ATGTGAACTG		
Tmaz16	CTAAGCGGTG	GATCACTCGG	CTCGTGGGTC	GATGAAAGAC	GCAGCAAAC	GCGCGTCGTC	ATGTGAACTG		
Tmaz38 (Cl. 1)	CAGGACACAT	GAACATCGAC	ACTTTGAACG	CACATTGCGG	CCCTGGGATT	CTATCCAAGG	GCCACGCCTG	}	
Tmaz38 (Cl. 3)	CAGGACA-----	GAACATCGAC	ACTTTGAACG	CACATTGCGG	CCCTGGGATT	CTATCCAAGG	GCCACGCCTG		
Tmaz16	CAGGACACAT	GAACATCGAC	ACTTTGAACG	CACATTGCGG	CCCTGGGATT	CTATCCAAGG	GCCACGCCTG		
Tmaz38 (Cl. 1)	TCTGAGGGTC	G TTA	AAAAATA	AGAAATTTT	TTTTTAAAA	AAATTTCTAT	AAATTTTATA	TATATTTTAT	}
Tmaz38 (Cl. 3)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
Tmaz16	TCTGAGGGTC	G TTA	AAAAATA	AAAT-----	-----	-----	-----		
Tmaz38 (Cl. 1)	ATATATATTG	GAAATTTTCT	GTTGTCGACA	TTTATTTGTT	GGTAAAAACAG	TATTTCTAAA	TACATGTTTC	}	
Tmaz38 (Cl. 3)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
Tmaz16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
Tmaz38 (Cl. 1)	TTTTCTTTTG	GCAAATCTTA	TTTCTTGAT	ACTTGTGTG	AAATCTTAGT	TTCAATATG	GAAATTTGTA	}	
Tmaz38 (Cl. 3)	-----	---AATCTTA	TTTCTTGAT	ACTTGTGTG	AAATCTTAGT	TTCAATATG	GAAATTTGTA		
Tmaz16	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
Tmaz38 (Cl. 1)	ACTTGGTTAT	TGGTAATAAA	TCTCAAGTAT	AGTAGTGAAA	TGTTGATGAC	GGAAGAAAAA	TTTTTTCGCA	}	
Tmaz38 (Cl. 3)	ACTTGGTTAT	TGGTAATAAA	TCTCAAGTAT	AGTAGTGAAA	TGTTGATGAC	GGAAGAAAAA	TTTTTTCGCA		
Tmaz16	-----	-----	-----	-----	-----GAC	GGAAGAAAAA	TTTTTTCGCA		
Tmaz38 (Cl. 1)	TCTAGGCATT	GTCTGGGCGA	TTTTTTTACT	TCTTGATATA	AACAATGATC	TACAATTCAT	TTACTTTGAG	}	
Tmaz38 (Cl. 3)	TCTAGGCATT	GTCTGGGCGA	TTTTTTTACT	TCTTGATATA	AACAATGATC	TACAATTCAT	TTACTTTGAG		
Tmaz16	TCTAGGCATT	GTCTGGGCGA	TTTTTTTACT	TCTTGATATA	AACAATGATC	TACAATTCAT	TTACTTTGAG		
Tmaz38 (Cl. 1)	TTTACCAATT	TTATTATATG	TCTGTATTAA	ACTGGCTATG	CCAGTGCTTA	TACAGTAAAT	ATAATTTCAA	}	
Tmaz38 (Cl. 3)	TTTACCAATT	TTATTATATG	TCTGTATTAA	ACTGGCTATG	CCAGTGCTTA	TACAGTAAAT	ATAATTTCAA		
Tmaz16	TTTACCAATT	TTATTATATG	TCTGTATTAA	ACTGGCTATG	CCAGTGCTTA	TACAGTAAAT	ATAATTTCAA		
Tmaz38 (Cl. 1)	GTTTTTCAAA	TTTTTATATG	TGTCACACTAT	GTAATAAAG	TATGAAATAT	TGCAATAGAA	GAGAAGCACC	}	
Tmaz38 (Cl. 3)	GTTTTTCAAA	TTTTTATATG	TGTCACACTAT	GTAATAAAG	TATGAAATAT	TGCAATAGAA	GAGAAGCACC		
Tmaz16	GTTTTTCAAA	TTTTTATATG	TGTCACACTAT	GTAATAAAG	TATGAAATAT	TGCAATAGAA	GAGAAGCACC		
Tmaz38 (Cl. 1)	ATTTTTTTTT	CGACCTCAGA	TTAGGTGGGA					}	
Tmaz38 (Cl. 3)	ATTTTTTTTT	CGACCTCAGA	TTAG						
Tmaz16	ATTTTTTTTT	CGACCTCAGA	TTAG						

ITS-2

28 S

Figura 12. Secuencias de nucleótidos obtenidos para los diferentes individuos de *T. mazzottii*, los cuales presentaron diferentes tamaños de insertos al ser clonados en el plásmido pCR 2.1. Con el símbolo “-” se encuentran las regiones faltantes para cada clona. En el recuadro se encierra el ITS-2 según lo reportado en el GenBank para esta especie. La clona 1 del individuo Tmaz38 es utilizada como referencia para comparar a las otras clonas, ya que esta clona presenta el fragmento perteneciente al cistón ribosomal analizado de manera completa.

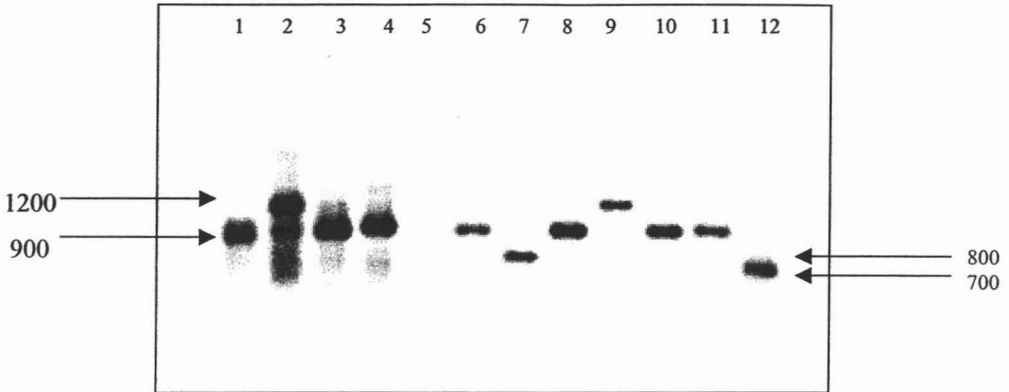


Figura 13. Southern blotting de los productos de PCR y de las clonas obtenidas en la transformación, utilizando como sonda el fragmento de 700 pb correspondiente al individuo Tmaz16 de *T. mazzottii*. Carril 1) Producto de PCR para *T. mazzottii* (Tmaz38); carril 2) Producto de PCR para *R. prolixus* (Rpro48); carril 3) producto de PCR para *T. mazzottii* (Tmaz85); carril 4) producto de PCR para *T. lecticularia* (Tlec62); carril 6) clona 1 para *T. mazzottii* (Tmaz38); carril 7) clona 3 para *T. mazzottii* (Tmaz38); carril 8) clona 1 para *R. prolixus* (Rpro48); carril 9) clona 2 para *R. prolixus* (Rpro48); carril 10) clona para *T. mazzottii* (Tmaz85); carril 11) clona para *T. lecticularia* (Tlec62); carril 12) clona para *T. mazzottii* (Tmaz16). Se observan los diferentes tamaños de clonas hibridizadas de la especie *T. mazzottii* (Carriles 6, 7 y 12).

VI.3. Análisis de las secuencias

Se analizaron nueve especies de triatóminos, de los cuales se emplearon de dos a cuatro individuos por especie para estudiar las variaciones a nivel intra-específico. Las características generales de las secuencias estudiadas se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Características generales de las secuencias analizadas

Especie	Clave	Tamaño del ITS-2	% T/A	ITS-2 accesado*
<i>T. pallidipennis</i>	Tpal22	470	77.7	AJ286882 (470)
	Tpal23	470	77.5	
<i>T. longipennis</i>	Tlon30	470	77.03	AJ286883 (470)
	Tlon66	470	77.24	
<i>T. picturata</i>	Tpic6	470	77.3	AJ286884 (470)
	Tpic7	471	77.8	
	Tpic8	467	77.1	
<i>T. bassolsae</i>	Tbal2	470	77.5	No reportado
	Tbal3	470	77.5	
	Tbal4	470	77.1	
	Tbal136	470	77.5	
<i>T. mazzottii</i>	Tmaz38	469	76.98	AJ286885 (468)
	Tmaz85	467	76.88	
<i>T. lecticularia</i>	Tlec56	470	77.5	No reportado
	Tlec62	469	77.4	
	Tlec64	470	77.5	
<i>T. rubida</i>	Trub93	492	77.3	No reportado
	Trub141	492	77.3	
	Trub142	493	77.3	
<i>T. infestans</i>	Tinf72	460	78.48	AJ289876 (458)
	Tinf74	454	78.2	AJ286874 (454)
<i>R. prolixus</i>	Rpro48	702	77.64	AJ286888 (694) AY345868 (702)

* Clave de la secuencia de ITS-2 accesado en el GenBank y entre paréntesis el tamaño de ITS-2 reportado para cada especie.

VI.3. Variación intraespecífica

La variación intraespecífica nos permite conocer qué tanto varía en nuestro estudio el ITS-2 entre individuos de la misma especie. Todos los individuos analizados presentaron un porcentaje de identidad mayor al 98%, que se correlaciona con las distancias genéticas obtenidas de una matriz de distancias utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos Tamura-Nei, las distancias genéticas que se encontraron fueron en promedio de 0.003. Estas variaciones se mantuvieron cuando se compararon con las secuencias accesadas para algunas de estas especies en el GenBank. Las

principales diferencias que se encontraron fue la presencia de mutaciones: inserciones, deleciones, transversiones y transiciones, siendo más frecuentes estas dos últimas.

VI.3.b. Variación interespecífica

Este tipo de variación nos permite conocer qué tanto se diferencian individuos de distintas especies, por lo que se realizó una matriz de distancias utilizando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 3.0 (Kumar *et al.*, 2004), utilizando la opción “Distancia” contenida en el menú principal. El modelo de sustitución de nucleótidos escogido fue el de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) (Tabla 7). Se encontraron distancias genéticas pequeñas entre todas las especies pertenecientes al complejo *Phyllosoma* comparadas con el resto de las especies, distancias genéticas que van desde 0 a 0.015. Para la especie *T. rubida* se encontraron distancias de 0.089 a 0.094 con respecto a las especies del complejo *Phyllosoma*; para *T. lecticularia* se encontraron distancias de 0.058 a 0.1, mientras que para *T. infestans* fue de 0.163 a 0.177. Finalmente, para *R. prolixus* se obtuvieron las distancias genéticas más distantes que van de 0.549 a 0.598.

Tabla 7. Matriz de distancia, utilizando el modelo de sustitución de nucleótidos Tamura-Nei, para un grupo de 22 secuencias de ITS-2 de diferentes especies de triatóminos. Los valores indican el promedio de las distancias genéticas más su desviación estándar.

	<i>T. pallidipennis</i>																				
<i>T. pallidipennis</i>																					
<i>T. longipennis</i>	0.004 ± 0.039																				
<i>T. picturata</i>	0.003 ± 0.0029	0.002 ± 0.001																			
<i>T. bassolsae</i>	0.006 ± 0.004	0.008 ± 0.003	0.007 ± 0.004																		
<i>T. mazzottii</i>	0.015 ± 0.005	0.015 ± 0.005	0.015 ± 0.005	0.013 ± 0.006																	
<i>T. lecticularia</i>	0.059 ± 0.002	0.059 ± 0.002	0.058 ± 0.002	0.060 ± 0.003	0.065 ± 0.003																
<i>T. rubida</i>	0.089 ± 0.004	0.093	0.092 ± 0.001	0.090 ± 0.003	0.094 ± 0.001	0.1 ± 0.001															
<i>T. infestans</i>	0.167 ± 0.005	0.174 ± 0.002	0.171 ± 0.002	0.169 ± 0.004	0.169 ± 0.003	0.177 ± 0.002	0.163 ± 0.001														
<i>R. prolixus</i>	0.567 ± 0.004	0.566 ± 0.003	0.563 ± 0.0004	0.561 ± 0.007	0.549 ± 0.005	0.593 ± 0.003	0.598	0.595 ± 0.003													

VI.3.c. Microsatélites

El DNA microsatélite consiste en unidades de cerca de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tandem dentro de un genoma. El análisis de variación en la secuencia de DNA mediante microsatélites ha demostrado ser una herramienta confiable y reproducible para distinguir a grupos de organismos.

Se analizaron los microsatélites de las diferentes secuencias, encontrándose que todas las especies pertenecientes al complejo *Phyllosoma* presentan la repetición (AT)₍₄₎ TTT (AT)₍₆₎, a excepción del individuo ITM38 de *T. mazzottii* que presentaba una repetición más de AT. Los microsatélites observados para este complejo son idénticos a los reportados en las secuencias del GenBank, con la excepción de *T. mazzottii*. En el caso de las especies *T. rubida*, *T. lecticularia* y *T. infestans*, los microsatélites son más largos. Para *T. infestans*, los microsatélites son diferentes para los individuos analizados, sin embargo esta variación concuerda con las reportadas en el GenBank, las cuales varían en el número de repeticiones de las primeras y últimas AT. Finalmente *R. prolixus* no presenta microsatélites (Tabla 8).

Tabla 8.- Tabla de microsatélites observados en las especies de triatóminos.

Especie	Microsatélites observados	Microsatélites reportados
<i>T. pallidipennis</i>	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₆₎	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₆₎ (Marcilla <i>et al.</i> , 2001)
<i>T. longipennis</i>	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₆₎	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₆₎ (Marcilla <i>et al.</i> , 2001)
<i>T. picturata</i>	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₆₎	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₆₎ (Marcilla <i>et al.</i> , 2001)
<i>T. bassolsae</i>	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₆₎	No reportada
<i>T. mazzottii</i> (Tmaz38)	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₅₎	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₅₎ (Marcilla <i>et al.</i> , 2001)
<i>T. mazzottii</i> (Tmaz85)	(AT) ₍₄₎ TTT (AT) ₍₆₎	
<i>T. rubida</i>	No presenta	No reportada
<i>T. lecticularia</i>	(AT) ₍₃₎ TTT (AT) ₍₁₎ AA (AT) ₍₄₎	No reportada
<i>T. infestans</i> (III72)	(AT) ₍₇₎ T (AT) ₍₁₎ AA (AT) ₍₈₎	(AT) ₍₆₎ T (AT) ₍₁₎ AA (AT) ₍₈₎ (Marcilla <i>et al.</i> , 2001)
<i>T. infestans</i> (ITI74)	(AT) ₍₆₎ T (AT) ₍₁₎ AA (AT) ₍₆₎	(AT) ₍₅₎ TTT (AT) ₍₁₎ AA (AT) ₍₆₎ (Marcilla <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. prolixus</i>	No presenta	No reportado

VI. 4. Análisis filogenético

Para la reconstrucción filogenética se utilizó el método bayesiano y el de unión de vecinos (Neighbor-joining, NJ). Los árboles filogenéticos fueron realizados con todos los individuos analizados, utilizando a *Rhodnius prolixus* como grupo externo.

La tabla 9, muestra los resultados obtenidos en el análisis filogenético realizado en el programa Mr. Bayes después de 1, 000,000 de ciclos algorítmicos:

Tabla 9.- Resultados del análisis filogenético en el programa Mr bayes.

Gen	1000000
lnL	-2165.992
TL	1.645
r (G<->T)	1.000000
r (C<->T)	1.325418
r (C<->G)	1.946440
r (A<->T)	0.529527
r (A<->G)	2.481113
r (A<->C)	1.764221
pi (A)	0.349294
pi (C)	0.108875
pi (G)	0.110833
pi (T)	0.430998
alpha	0.609186

lnL: Logaritmo natural de la verosimilitud

TL : Longitud del árbol (cambios por carácter)

r: Tasas de sustitución de nucleótidos

pi: Frecuencia de los nucleótidos

Alpha: Parámetro de la distribución gamma

Podemos distinguir que las frecuencias de los nucleótidos son muy variantes entre ellos, teniendo que existe una mayor frecuencia del nucleótido T y en menor frecuencia C; en cuando a la frecuencia entre transiciones y transversiones, se encontraron frecuencias diferentes entre cada uno de los tipos de transición o

tranversión, sin embargo existen más tranversiones que transiciones, lo que se ve corroborado por el valor de α (0.6) que nos indica cómo se está comportando la distribución gamma .

Por lo que, estas distribuciones se asemejan al modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), el cual considera que existen diferentes tasas de sustitución entre los nucleótidos y que las frecuencias de cada uno de estos son desiguales. Tomando en cuenta esto se realizó un árbol filogenético, con el método de unión de vecino (Neighbor-joining, NJ), empleando una matriz de distancia de Tamura-Nei, con un bootstrap de 1000 replicas, en el programa MEGA.

Con estos datos se construyeron los dos árboles filogenéticos (Fig. 14), en los cuales podemos ver la similitud en la topología de estos. Se identificó un clado exclusivo para las especies del complejo *Phyllosoma*, que las distingue de los otros grupos analizados. El grupo trabajado más relacionado al complejo *Phyllosoma* es el *Lecticularia*, seguida del *Rubida* y finalmente el *Infestans*. Dentro del complejo *Phyllosoma*, en ambos análisis fue difícil diferenciar a las diferentes especies, a pesar que si se separaron de los otros grupos, no se diferenciaron entre ellas, ya que las distancias genéticas de los brazos del árbol que lograron separar algunas especies de este complejo son pequeñas y sus valores de soporte son débiles.

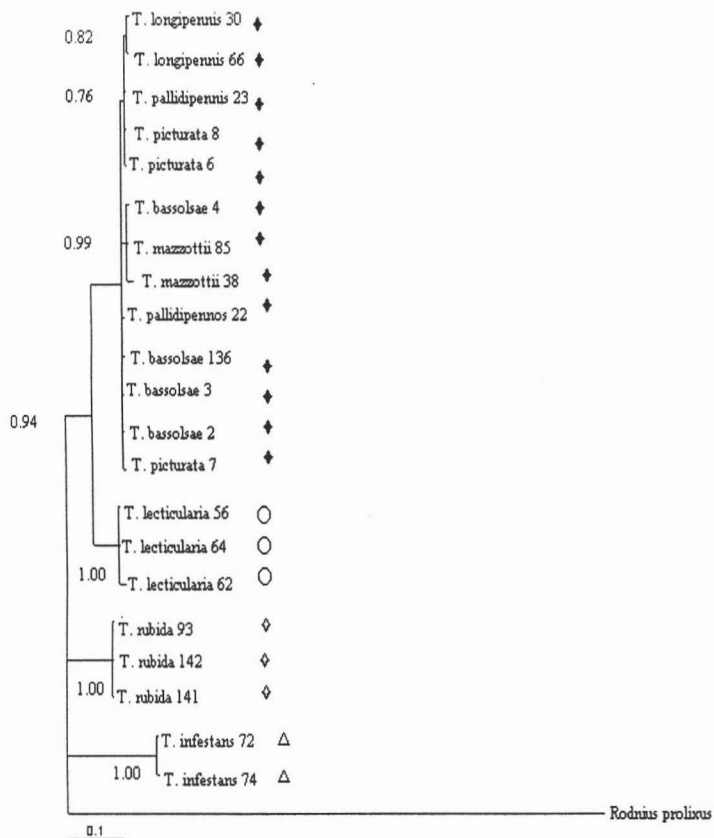
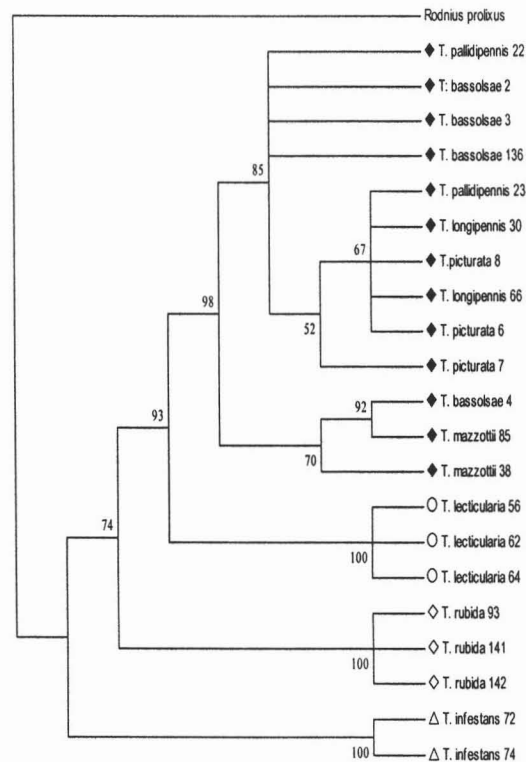
*illosoma*

Figura 14. Árbol filogenético de especies de triatóminos, empleando a *Rhodnius prolixus* como grupo externo. a) basado en el modelo bayesiano, con GTR (Tiempo General Reversible=6); b) con el método de unión de vecinos (Neighbor-joining, NJ) utilizando la matriz de distancia de Tamura-Nei. Los números en los nodos de la figura 3a, indican la probabilidad posterior; los números en los nodos de la figura 3b indican el valor de bootstrap.

VII. DISCUSIÓN

El análisis genético para las diferentes especies de triatóminos realizado en este trabajo, incluye tres especies que no habían sido estudiadas utilizando el ITS-2 como marcador genético. *T. bassolsae*, es una especie recientemente descrita por Alejandro y colaboradores en 1999, la cual por sus características morfológicas se agrupo dentro del complejo *Phyllosoma*. Utilizando marcadores isoenzimáticos *T. bassolsae* se incluyó dentro del complejo *Phyllosoma* (Martínez, 2003), sin embargo, es necesario corroborar esta clasificación utilizando otros tipos de marcadores. *T. lecticularia* perteneciente al complejo *Lecticularia* y *T. rubida* al complejo *Rubrofasciata*, son al igual que *T. bassolsae*, especies a las cuales no se les había analizado la región del ITS-2, ambas de gran importancia epidemiológica en la región norte de nuestro país, encontrándose en estados como Baja California Norte y Sur, Nuevo León, Sinaloa y Sonora (Aguirre-Pequeño, 1947; Lent y Wygodzinsky, 1979; Zárate y Zárate, 1985; Martínez-Ibarra, 1992; Cortés-Jiménez *et al.*, 1996; Paredes *et al.*, 2001).

Los análisis genéticos nos permiten conocer la variación intra-específica y nos dan una estimación de la variación existente entre los individuos de una misma especie. En el caso de los triatóminos, sólo se ha reportado este tipo de variación entre individuos de la misma especie provenientes de diferentes localidades, y perteneciente al género *Panstrongylus*. En este estudio, se encontraron diferencias en el tamaño de las secuencias, las cuales corresponden al número de repeticiones en los microsatélites, así como algunas mutaciones (transiciones o transversiones), por ejemplo, entre *P. rufotuberculatus* de Ecuador y Colombia se encontraron cuatro nucleótidos diferentes: dos mutaciones (una transición A/G y una transversión T/A) y en el tamaño de un microsatélite que corresponden a la inserción de dos bases, el de Ecuador tenía (AT)₅ y el de Colombia (AT)₆; sin embargo, estas diferencias no son mayores del 1% (Marcilla *et al.*, 2002).

En nuestro análisis, la variación intra-específica encontrada entre las diferentes especies no sobrepasa el 2%, a pesar que no se esperaba encontrar mucha diferencia

entre ellos, ya que los insectos trabajados provienen de colonias establecidas en el laboratorio y no de diferentes zonas como en el caso de *Panstrongylus*. En las secuencias analizadas, se encontraron más transiciones que transversiones (23 contra 18), así como muchas deleciones (21), lo que nos indica que la región del ITS-2 dentro de este grupo de organismos es muy variable. El ITS-2 como marcador molecular puede dar resoluciones diferentes dependiendo del grupo de organismos estudiados. Por ejemplo para especies de *Aeschynanthus* (Gesneriaceae) una epífita, se encontraron altas variaciones intra-individuales en las secuencias del ITS de las diferentes clonas analizadas, las cuales van de 0 a 5.01%; esta variación observada puede ser resultado de la lenta evolución concertada que ocurre en el ITS que no ha llegado a homogenizar las repeticiones del DNA ribosomal (Denduangboripant & Cronk, 2000); estos porcentajes de variación, son raras en las plantas, pero se han reportado en Winteraceas, coníferas, *Zea* y otras más. En el nematodo de la familia Trichostrongylidae la variación intra-específica encontrada es poca (< 1%) (Hoste *et al.*, 1993, 1995; Chilton *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 1998). En el caso de *Drosophila*, los polimorfismos observados entre las diferentes especies fueron mínimas (0-0.05%), en tanto que al compararlas con las secuencias reportadas en el GenBank, no se encontraron diferencias entre ellas, sugiriendo que la evolución concertada (Dover, 1982) ha homogenizado las copias del ITS-2 que se encuentran en los cistrones ribosomales, de tal manera que este marcador puede ser fácilmente empleado en análisis filogenéticos (Young & Coleman, 2004). Basados en estos reportes podemos sugerir que en el caso de las secuencias de ITS-2 de las especies del complejo *Phyllosoma* (las cuales al compararlas con las reportadas en el GenBank presentaron diferencias), se encuentran en una etapa reciente de divergencia, por lo cual la evolución concertada (la cual rige a esta familia de genes) no ha podido llegar a homogenizar al ITS-2, por lo que las secuencias son diferentes.

Una característica importante que observamos en estos insectos, es la presencia de diferentes cistrones dentro de un mismo individuo (Fig. 10), lo que nos sugiere la variedad de tamaños de ITS-2 que se pueden encontrar; en el caso específico de *T. mazzottii*, en el cual, aparte de que se observaron productos de PCR y clonas de diferentes tamaños (también presentes en *T. bassolsae* y *R. prolixus*), se encontraron

secuencias con deleciones de ITS-2 (Fig. 11) y aunque este fenómeno sólo se observó en esta especie, no descartamos la posibilidad de que este ocurriendo en las demás. Por otro lado, las deleciones que se encontraron en el ITS-2 en esta especies, no ha sido reportada en otros triatóminos ni en otros estudios que utilizan este marcador, no siendo el caso del ITS-1, en el cual se ha reportado la presencia de grandes variaciones y de mutaciones que impiden la maduración de las subunidades del rRNA (Muster *et al.*, 1990). El hecho de encontrar secuencias de ITS-2 con mutaciones, no nos dice si esto está afectando a los cistrones ribosomales, sin embargo se ha reportado que si existen deleciones o mutaciones puntuales en esta región, se impide el buen procesamiento de la subunidad larga del rRNA (Sande *et al.*, 1992).

La variación inter-específica observada pudo diferenciar claramente a las especies del complejo *Phyllosoma* de las otras especies, encontrándose valores de distancia de 0 a 0.8426, siendo la especie más lejana *R. prolixus* (perteneciente a otro género). En el caso de las especies del complejo *Phyllosoma*, las variaciones fueron < al 0.2%, lo que nos indica la gran cercanía de estas especies. Para *Panstrongylus* se reportaron variaciones mayores (aproximadamente >0.9%) (Marcilla *et al.*, 2002), para nematodos del 1.3 al 15 % (Hoste *et al.*, 1993, 1995; Chilton *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 1998). Por otro lado, exploramos la presencia de microsatélites en las secuencias de las diferentes especies; los microsatélites podrían ser una herramienta auxiliar para determinar la pertenencia de una especie dentro de un complejo o grupo. En este análisis se observaron secuencias de microsatélites específicas para el complejo *Phyllosoma* y a pesar que en la especie *T. mazzottii* la última repetición de AT es menor, se puede incluir sin problemas dentro de este complejo; estos resultados corroboran los ya reportados por Marcilla y colaboradores en el 2001. Por otro lado, en aquellas especies que no se habían analizado, se detectó una secuencia de microsatélites para *T. lecticularia*, a diferencia de *T. rubida* en la que no se detectaron microsatélites, esta característica es muy importante para poder diferenciar esta especie de las demás. Para *R. prolixus* tampoco se detectaron secuencias de microsatélites.

Marcilla y colaboradores (Marcilla *et al.*, 2001), analizaron 12 especies de insectos pertenecientes al género *Triatoma* y 3 pertenecientes al de *Rhodnius*; en su análisis encontraron que, el ITS-2 es un buen marcador para resolver relaciones supraespecíficas, específicas y subespecíficas en triatóminos, aunque los análisis filogenéticos algunas veces son incapaces de resolver relaciones a nivel de población. Sin embargo, en el complejo *Phyllosoma*, este marcador no pudo separar filogenéticamente a *T. longipennis* de *T. picturata*. Estos datos son similares a los obtenidos por Breniere y colaboradores (2003), en los cuales empleando RAPD's, analizaron tres especies del complejo *Phyllosoma*, los cuales aparte de incluir a las especies ya mencionadas, incluían a *T. pallidipennis*, en este análisis no se encontraron bandas específicas para cada especie (sólo 2 bandas constantes entre las tres especies y dos bandas comunes a *T. longipennis* y *T. picturata*); además, en el árbol filogenético existía un sobrelapamiento (homoplasia) entre *T. longipennis* y *T. picturata*; nuestro análisis corrobora que estas especies se encuentran cercanamente relacionadas. Estos resultados coinciden con la escasez de criterios morfológicos para diferenciar a ninfas de diferentes especies dentro del complejo *Phyllosoma* y a la pérdida de divergencia de sus secuencias (Marcilla *et al.*, 2001).

Cuando se realizó la construcción del árbol filogenético para los triatóminos, se utilizaron dos programas computacionales: MrBayes y MEGA. El MrBayes es un programa que recientemente ha sido publicado (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) y ha mostrado ser un buen programa para el análisis de secuencias. Dado que el modelo de sustitución de bases establecido en el programa fue Nst= 6 y este no se encuentra en el programa MEGA, decidimos analizar tanto las frecuencias de los nucleótidos así como las transiciones y transversiones, y sugerimos que el modelo que más se asemeja al comportamiento de estas secuencias es el Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993), el cual empleamos para analizar nuestros resultados en el programa MEGA, empleando el método de unión de vecinos. Ambos árboles obtenidos presentaron la misma topología, es decir, la distribución de los diferentes grupos de especies son similares, de esta manera los resultados obtenidos son consistentes con ambos modelos (ML y NJ). Los

árboles filogenéticos reportados para algunas especies de triatóminos, en los cuales se emplean varios modelos de sustitución, tales como, los modelos de Kimura de dos y tres parámetros (Marcilla *et al.*, 2001, 2002), no toman en cuenta el comportamiento de las sustituciones de los nucleótidos, por lo que nuestro análisis se fortalece al estar corroborando el modelo que se empleó.

Al analizar el árbol filogenético podemos distinguir un clado que separa a las especies del complejo *Phyllosoma*, de los otros grupos, sin embargo, a pesar que se logran diferenciar a las especies de otros complejos y subgrupos, no se logro separar filogenéticamente a las especies del complejo *Phyllosoma*, lo que sugiere que este grupo se encuentra en un proceso de divergencia temprana. Por otro lado, las diferencias de nucleótidos encontradas en este complejo fueron mínimas, pudiendo considerarse que estas especies tuvieran la capacidad de hibridización, y aunque no existen reportes recientes que aborden este tema, existe una publicación de Mazzotti & Osorio en 1942, en el cual realizan cruzamientos entre *T. pallidipennis* y *T. picturata*, logrando obtener la siguiente generación de manera exitosa. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Marcilla y colaboradores (Marcilla *et al.*, 2001) en los cuales tampoco encontraron grandes diferencias entre las especies del complejo *Phyllosoma*. Debido a la gran cercanía que presentan las especies ya incluidas dentro de este complejo, podemos afirmar que la especie *T. bassolsae* pertenece a este grupo. Con respecto a *T. lecticularia*, *T. rubida*, *T. infestans* y *R. prolixus*, todas las especies se agruparon en clados específicos, lo que nos corrobora la separación de estas especies del complejo *Phyllosoma*.

La clasificación obtenida en nuestro análisis coincide con lo obtenido por los análisis isoenzimáticos de las mismas especies (Martínez *et al.*, 2003), en los que *T. lecticularia* es la especie más relacionada a las pertenecientes al complejo *Phyllosoma*, seguida de *T. rubida* y finalmente *T. infestans*. Estos resultados podrían ser corroborados, empleando otros tipos de marcadores, los cuales aclaren la relación entre *T. lecticularia* y el complejo *Phyllosoma*, ya que al parecer *T. rubida* debería estar más cercana a este grupo.

Finalmente, se puede decir que, el marcador utilizado en este análisis (ITS-2), es un buen marcador que nos puede diferenciar a las especies de triatóminos a nivel de géneros y especies, sin embargo es incapaz de resolver las relaciones filogenéticas en el complejo *Phyllosoma*, por lo que se necesitaría emplear otro tipo de marcadores moleculares que posean la característica de evolucionar más rápidamente y logren detectar diferencias significativas en este grupo de individuos, de tal manera que los puedan separar, como por ejemplo, marcadores de DNA de origen mitocondrial como el cyt b (Lyman *et al.*, 1999; García *et al.*, 2001).

VIII. CONCLUSIONES

1. El análisis de las secuencias del ITS-2 permitió separar filogenéticamente al complejo *Phyllosoma* de los otros grupos.
2. El ITS-2 no es un buen marcador para resolver las relaciones filogenéticas en especies del complejo *Phyllosoma* (especies cercanamente relacionadas).
3. Las especies del complejo *Phyllosoma* se encuentran cercanamente relacionadas, encontrándose distancias genéticas muy pequeñas entre ellas, lo que nos indica el reciente proceso de divergencia en el que se encuentran.
4. Se encontraron microsatélites específicos para *T. lecticularia* y no se detectó microsatélites en *T. rubida* y *R. prolixus*.
5. Se comprobó genéticamente la inclusión de *T. bassolsae* dentro del complejo *Phyllosoma* a partir del análisis del ITS-2.
6. Se encontraron diferentes tamaños ITS-2 dentro de un individuo así como dentro de una misma especie.

IX. REFERENCIAS

- Acha F. & Cifres, B. (1986). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Ed. OPS/OMS. Publicación científica No. 503. Washington D.C. 590-600.
- Aguirre-Pequeño E. (1947). Presencia de *Trypanosoma cruzi* en mamíferos y triatomidéos de Nuevo León. México. *Archives Med Mex.* **5**: 350-358.
- Alejandro R., Noguera B., Cortéz M., Jumberg J., Galvao C. & Carcavallo, R. (1999). *Triatoma bassolsae* sp. n. do Mexico, com uma chave para as espécies do complexo "phyllosoma" (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* . **94**: 353-359.
- Arnheim NM., Cristal R., Shmickel G., Wilson G., Ryder O. & Zimmer E: (1980). Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**:7323-7327.
- Bargues 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**: 567-573.
- Bargues MD., Marcilla A., Dujardin JP. & Mas-Coma S. (2002). Triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi*: a molecular perspectiva based on nuclear ribosomal DNA markers. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **96**:159-164.
- Beard C., Pye G., Steurer F., Rodriguez T., Campman R., Peterson A.T., Ramsey J., Wirtz R. & Robinson L. (2003). Chagas disease in a domestic transmission cycle in southern Texas, USA. *Emerg Infect Dis.* **9**: 103-105.
- Breniere SF., Taveira B., Bosseno MF., Ordoñez R., Lozano-Kasten F., Magallón-Gastélum E., Ouaiissi A. & Ramsey J. (2003). Preliminary results of random amplification of polymorphic DNA among Triatominae of the phyllosoma Complex (Hemiptera, Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* . **98**: 1033-1038.

- Brenner R. & Stoka A. (1987). Chagas' Disease Vectors. Vol I: Taxonomis, Ecological and Epidemiological Aspect. CRC Press. Florida.
- Buckler ES 4th, Ippolito A. & Holtsford TP. (1997). The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics*. **145**: 821-832.
- Carcavallo RU., Jurberg J., Lent H., Noireau F. & Galvão C. (2000). Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol vectores*. **7**:1-99.
- Coleman AW. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet*. **19**: 370-375.
- Cortés-Jiménez M., Noguera-Torres B., Alejandre-Aguilar R., Isita-Tornelli L. & Ramírez-Moreno E. (1996). Frequency of Triatomines Infected with *Trypanosoma cruzi* Collected in Cuernavaca City, Morelos, Mexico. *Rev Latinoam Microbiol*. **38**: 115-199.
- Chilton NB., Gasser RB., Beveridge I. (1995). Differences in a ribosomal DNA sequence of morphologically indistinguishable species within the *Hypodonis macropi* complex (Nematoda: Strongyloidea). *Inter J Parasitol*. **25**: 647-651.
- Denduangboripant J. & Cronk QCB. (2000). High intraindividual variation in internal transcribed spacer sequence in *Aeschynanthus* (Gesneriaceae): implications for phylogenetics. *Pro. R. Soc. Lond*. **267**: 1407-1415.
- De La Merced SA. (1987). Chagas' disease vectors. Vol. I, II y III Anatomic and Physiological Aspects, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida.
- Dover G. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*. **299**: 111-117.
- Dujardin JP., Panzera P. y Schofield CJ. (1999). Triatominae as a model of morphological plasticity under ecological pressure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **94**: 223-228.
- Dumontiel E., Gourbière S., Barrera-Peréz M., Rodríguez-Félix E., Ruiz-Piña H., Baños-López O., Ramírez-Sierra J., Menu F. & Rabinovich JE. (2002). Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatán peninsula of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. **67**:176-183.

- Dumontiel E. & Gourbiere S. (2004). Predicting *Triatoma dimidiata* abundance and infection rate: a risk map for natural transmission of Chagas disease in the Yucatán peninsula of México. *Am J Trop Med Hyg.* **70**: 514-519.
- Flores A., Magallón-Gastélum E., France-Bosseno MF., Ordoñez R., Lozano-Kasten F., Espinoza B., Ramsey J. & Brenière SF. (2001) Isoenzyme variability of five principal triatomine vector species of Chagas disease in Mexico. *Infect Genet Evol.* **1**:21-28.
- Flores PA. (2001) Tesis de Maestría. Principales vectores de la enfermedad de Chagas en el occidente mexicano: estudios epidemiológicos y genéticos de poblaciones peridomésticas y domésticas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Galvão C., Jurber J., Conha V. & Pinto R. (1995). Biología do *Triatoma nitida* (usinger 1939) em laboratorio (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **90**: 657-663.
- García AL., Carrasco HJ., Schofield CJ., Valente SA., Frame IA., Stothard R. & Miles MA. (1998). Random Amplification of Polimorphic DNA as a tool for taxonomic studies of Triatomine bugs (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol.* **35**: 38-45.
- García BA., Moriyama EN. & Powell JR. (2001). Mitichondrial DNA sequence of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): phylogenetic Relationships. *J Med Entomol.* **38**:675-683.
- Guarneri AA., Pereira MH & Diotaiuti L. (2000) Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *J Med Entomol.* **37**: 373-379.
- Guzmán-Bracho C., García-García L., Florián-Verdugo J., Guerrero-Martínez S., Torres-Cosme M., Ramírez-Melgar C. & Velasco-Castrejón O. (1998) Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud Publica.* **4**: 94-99.

- Guzmán-Bracho C. (2001). Epidemiology of Chagas disease in México: an update. *Trends Parasitol.* **17**: 372-376.
- Guzmán-Marín E., Barrera-Pérez MA, Rodríguez-Félix ME., Escobedo-Ortegón FJ. & Zavala-Velázquez JE. (1990). Índices entomológicos de *Triatoma dimidiata* en el estado de Yucatán. *Rev Biomed.* **2**: 20-29.
- Guzmán-Marín E. (1992) Hábitos biológicos de *Triatoma dimidiata* en el estado de Yucatán México. *Rev Biomed.* **3**:125-131.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and análisis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- Harry, M. (1993). Isozymic date 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.
- Hillis DM. & Dixon MT. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* **66**:411-453.
- Hillis DM., Moritz C. & Mable B. (1996). Molecular systematics. Sinauer Associates. Canada.
- Hypsa V., Tietz D., Zivavy J., Rigo RO., Galvao C. & Jurberg J. (2002) Phylogeny and Biogeography of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae): molecular evidence of a New World origin of the Asiatic Clade. *Mol Phylogenet Evol.* **23**:447-457.
- Hoste H., Passer RB., Chilton NB., Mallet S. & Beveridge I. (1993). Lack of intraspecific variation in the second internal transcribed spacer (ITS-2) of *Trichostrongylus colubriformis* ribosomal DNA. *Int J Parasitol.* **23**: 1069-1071.
- Hoste H., Chilton NB, Gasser RB, Beveridge I. (1995). Differences in the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Int J Parasitol.* **25**: 75-80.
- Ibáñez-Bernal S. & Paz-Rodríguez R. (1998). Los Complejos de Especies de *Triatoma* en México y Centroamérica. II Taller Internacional de Genética Poblacional y Control de Triatóminos, Tegusigalpa Honduras. Ed. CJ Schofield Carlos Ponce.

- Jiménez P. & Collada C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Invest. Agr. Sist. Recur. For.* **2**:237-247.
- Jiménez ML., Llinas J., & Palacios C. (2003). Infection rates in *Dipetalogaster maximus* (Reduviidae: Triatominae) by *Trypanosoma cruzi* in the Cape region, Baja California Sur, México. *J Med Entomol.* **40**: 18-21.
- Jukes TH. & Cantor CR. (1969). Evolution of protein molecules pp. 21-132 in *Mammalian Protein Metabolism*, ed. H.N. Munro Academic Press, New York.
- Kimura M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* **16**: 111-120.
- Kollien A.H. and Schaub G.A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatominae*. *Parasitol Today.* **16**: 381-387.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics.* **5**:150-163.
- Leedale GF. & Vickerman K. (2000). An illustrated guide to the protozoa. Organisms Traditionally referred to a protozoa, or newly discovered groups: Society of Protozoologist, USA. Lawrence. 1432 pp.
- Lent H. & Wygodzinsky. (1979). Revision of de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vector of Chagas Disease. *Boll Am Museum Natural His.* **163**: 142-520.
- Lyman DF., Monteiro FA., Escalante AA., Cordon-Rosales C., Wesson DM., Dujardin JP. & Beard CB. (1999). Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* **60**: 377-386.
- Magallón-Gastélum E., Magdaleno-Peñaloza NC., Kathain-Duchateau G., Trujillo-Contreras F., Lozano-Kasten FJ., & Hernández-Gutiérrez R. (1998). Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), en el estado de Jalisco, México. *Rev Biomed.* **9**: 151-157.

- Malo EA., Ramírez-Novelo A., Cruz-López L. & Rojas JC. (1993). Life cycle and influence of age and feeding on the first mating of *Triatoma mazzottii* (Hemiptera: Reduviidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* . **88**: 203-206.
- Marcilla A., Bargues MD., Ramsey J., 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, Specie, and Phylogenetic Relationships in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectors of Chagas disease. *Mol Phylogenet Evol* . **18**: 136-142.
- Marcilla A., Bargues MD., Abad-Franch F., Panzera F., Carcavallo RU., Noireau F., Galvão C., Jurberg J., Miles MA., Dujardin JP. & Mas-Coma S. (2002). Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera:Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Genet Evol* . **1**:225-235.
- Marshall NA., Liebhaber M., Dyer Z. & Saxon A. 1986. The prevalence of allergic sensitization to *Triatoma protacta* (Heteroptera: Reduviidae) in a southern California, USA, community. *J Med Entomol* . **23**: 117-124.
- Martínez A., Carcavallo R.U. & Pelaez D. (1984). *Triatoma brailovskyi*, nueva especie de Triatominae de México. *Chagas*. **1**: 72-75.
- Martínez-Ibarra JA. (1992) Distribución de los Triatóminos asociados al domicilio humano en el municipio general de Terán, Nuevo León y México, Southwestern Entomologist. **17**(3).
- Martínez-Ibarra JA. & Katthain-Duchateau G. (1999). Biology of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . **94**:837-839.
- Martínez-Ibarra JA., Bárcenas-Ortega NM., Noguera-Torres B., Alejandre-Aguilar R., Lino Rodríguez M. Magallón-Gastélum E. López-Martínez V., Romero-Nápoles J. (2001). Role of two *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) species in the transmission of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) to man in the west coast of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . **96**:141-144

- Martínez-Ibarra JA., Miguel-Álvarez A., Arredondo-Jiménez JI. & Rodríguez-López MH. (2001a). Update on the biology of *Triatoma dimidiata* Latreille (Hemiptera:Reduviidae) under laboratory conditions. *J Am Mosq Control Assoc.* **17**:209-210.
- Martínez Ibarra JA., Novelo López M., Hernández Robles M. R. & Grant Guillén Y. (2003a). Influence of the blood meal source on the biology of *Meccus picturatus* Usinger 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . **98**: 227-232.
- Martínez-Ibarra JA., Grant-Guillén Y. & Martínez-Grant DM. (2003b). Feeding, Defecation, and Development Times of *Meccus longipennis* Usinger, 1939 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under Laboratory Conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* . **98**: 899-903.
- Martínez HF. (2003). Tesis de Licenciatura. Caracterización de la Diversidad Genética de Insectos Transmisores de la Enfermedad de Chagas en México. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mazariego-Arana MA., Monteón VM., Ballinas-Berdugo MA., Hernández-Becerril N., Alejandre-Aguilar R. & Reyes PA. (2001). Seroprevalence of human *Trypanosoma cruzi* infection in different geographic zone of Chiapas, Mexico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **34**: 453-458.
- Mazzotti L. & Osorio M.T. (1942). Cruzamientos experimentales entre varias especies de Triatomas. *Rev Med Mex.* **22**:215-222.
- Miles MA., Feliciangeli AD. & Rojas de Arias A. (2003). American tripanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* **326**: 1444-1448.
- Moffitt JE., Venarske D., Goddard J., Yates AB. & deShazo RD. 2003. Allergic reactions to *Triatoma* bites. *Ann Allergy Asthma Immunol.* **91**: 122-128.
- Monteiro FA. (2000). Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequence. *Am J Trop Med Hyg.* **62**: 460-465.
- Monteiro FA., Escalante AA. & Beard CB. (2001). Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends Parasitol.* **17**: 344.347.

- Musters W., Boon K., Sande CAFM vander, Heerikhuizen, H. van, & Planta RJ (1990). Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO J.* **9**: 3989–3996.
- Newton LA., Chilton NB., Beveridge I. & Gasser RB. (1998). Differences in the second internal transcribed spacer of four species of *Nematodirus* (Nematoda: Molineidae). *Inter J Parasitol.* **28**: 337-341.
- Novelo-López M., Martínez-Ibarra JA. (2002). Biological parameters of *Triatoma pallidipennis* Stal (Hemiptera: reduviidae) under laboratory conditions. Mem XXXVII Congreso Nacional de Entomología, Guanajuato, México, p. 472-478.
- Paredes GEA., Valdez-Miranda J., Nogueada-Torres B., Alejandre-guilar R. & Canett-Romero R. (2001). Vectorial importante of Triatominae bugs (Hemiptera: Reduviidae) in Guaymas, México. *Rev Latinoam Microbiol.* **43**: 119-122.
- Piekarski G. (1959) Tratado de Parasitología. Madrid. Ed. Tolle, Lege.
- Rangel-Flores H., Sanchez B., Mendoza-Duarte J., Barnabé C., Brenière F., Ramos, C. & Espinoza B. (2001) Serogical and parasitology demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg.* **65**: 887-895.
- Rabinovich JE., Leal JA. & Feliciangeli DP. (1979). Domiciliary biting frequency and blood ingestion of the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* Stahl (Hemiptera, Reduviidae) in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **73**: 272-283.
- Ramsey JM., Ordoñez R., Cruz-Celis A., Alvear AL., Chávez V., López R., Pintor JR., Gama F. & Carrillo S. (2000). Distribution of domestic Triatominae and stratification of Chagas Disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Med Vet Entomol.* **14**: 19-30.
- Ronquis F. & Huelsenbeck JP. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* **19**: 1572-1574.

- Sande CAFM vander, Kwa M., Nues RWvan, Heerikhuizen H Van, Rans HA., & Planta RJ. (1992). Functional analysis of internal transcribed spacer-2 of *Sacchromyces Cerevisiae* ribosomal DNA. *J Mol Biol.* **223**: 899–910.
- Sambrook J., Fritsch EF. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory press. Cold Spring Harbor, NY
- Schofield CJ. (1981). Chagas disease, triatomine bugs, and blood-loss. *The Lancet*, p. 1316.
- Schofield CJ. (1984). House design and domestic vectors of disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **78**:285-292.
- Schofield CJ. (1994). *Triatominae: Biología y control*. Eurommunica Publications. Uruguay, Montevideo.
- Schofield CJ. (1995) Overview- Byosystematic of the Reduviidae, pp.45-50. In: Schofield, CJ, Dujardin JP, Jurberg J (Eds) *Proceedings International Workshop on population Genetics and Control of Triatominae*, Santo Domingo de los colorados, Ecuador. INDRE, Mexico city.
- Soltis PS. & Kuzoff RK. (1993). ITS sequence variation within and among populations of *Lomatium grayi* and *L. Laevigatum* (Umbelliferae). *Mol Phylogenet Evol.* **2**:166-170.
- Stothard JR., Yamamoto Y., Cherchi A., García AL., Valente SAS., Schofield CJ. & Miles MA. (1998). A preliminary survey of mitochondrial sequence variation in Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) using polymerase chain reaction-based single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis and direct sequencing. *Bull Entomol Res.* **88**: 553-560.
- Tamura K. & Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol.* **10**:512-526.

- Tavares MG., DeAzeredo-Oliveira MT., Ceron CR. 1998. Tissue specific expresión of esterases in *Triatoma infestans* (Triatominae, Heteroptera). *Genet Mol Biol.* **21**: 461-464.
- Thompson JD, Higgins DG. & Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity and progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Trujillo FC., Villanueva MA., Soto MG., Raygoza MA. & Jiménez AC. (2000) Seguimiento serológico de infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos estudiados de 50 municipios del estado de Jalisco, México de 1987 a 1994. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* **33**: 591-596.
- Tyler KM. & Engman DM. (2001) The cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* **31**: 472-481.
- van Nues RW, Rientjes JM., van der Sande CA., Zerp SF., Sluiter C., Venema J., Planta RJ. & Rave HA. (1994). Separate structural elements within internal transcribed spacer 1 of *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA direct formation of 17S and 26S RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**:912-919.
- Velasco-Castrejón O. (1991). La enfermedad de Chagas: Una revisión histórica suscita y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo. *INDRE.* **8**:1-55.
- Velasco-Castrejón O., Valdespino JL., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Guzmán-Bracho C., Magos C., Llausás A., Gutiérrez G. & Sepúlveda J. (1992). Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública de Mex.* **34**:186-196
- Vidal-Acosta V., Ibáñez-Bernal S. & Martínez-Campo C. (2000) Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública de Mex.* **42**(6) :496-503.

- Wincker P., Britto C., Borges Pereira J., Cardoso MA., Oelemann W. & Morel MC. (1994). Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51**: 771-777.
- World Health Organization (1991). Control Of Chagas Disease, Report Of WHO Expert Committee.
- Young I. & Coleman AW. (2004) The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophyla* example. *Mol Phylogenet Evol.* **30**: 236-242.
- Zárate L. & Zárate RJ. (1985). A checklist of the triatominae (Hemiptera:Reduviidae) of Mexico. *Int J Entomol.* **27**(1): 102-127.
- Zeledón R., Guardia VM., Zúñiga A. & Swartzwelder JC. (1970). Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). I life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation, and size of adults. *J Med Entomol.* **7**: 313-319.

X. Anexos

X.1. Diseño del oligo interno.

ITS-2

T. bassolsa	TTTTTCAAAT	T-----TTA	TATTGT-GTC	AACTATGTAA	AA-TAAGTAT	GAAATATTGC
T. lecticu	-TTTTCAAAT	T-----GTA	TATTGT-GTT	AACTATGTAA	AA-CAAGTAT	GAAATATTGA
T. pictura	TTTTTCAAAT	T-----TTA	TATTGT-GTC	AACTATGTAA	AA-TAAGTAT	GAAATATTGC
T. mazzott	TTTTTCAAAT	T-----TTA	TATTGT-GTC	AACTATGTAA	AA-TAAGTAT	GAAATATTGC
T. pallidi	TTTTTCAAAT	T-----TTA	TATTGT-GTC	AACTATGTAA	AA-TAAGTAT	GAAATATTGC
T. rubida	GTTTTCAAAT	TTTTTTTGTA	TATTGTTGTC	AACTATGTAA	AA-TAAGTAT	GAAATATTTC
T. infesta	TTTTTCAAAT	T-----GTA	TATTGT-A--	AACTATGTAA	AAACAGGTTA	GAAATATTTA
T. longipe	TTTTTCAAAT	T-----GTA	TATTGT-A--	AACTATGTAA	AAACAGGTTA	GAAATATTTA

28S

T. bassolsa	AATAGAG	GAG AA--GCACCA	TTTTTTTTT-C	GACCTCAGAT	TAGGTGGGAT	TCCCCGCTGA
T. lecticu	CAGAGTA	GAG AA---GCAA	TTTTTTTTTTC	GACCTCAGAT	TAGGTGGGAT	TCCCCGCTGA
T. mazzott	AATAGAA	GAG AA--GCACCA	TTTTTTTTTTC	GACCTCAGAT	TAGGTGGGAT	TCCCCGCTGA
T. pallidi	AATAGAA	GAG AA--GCACCA	TTTTTTTTT-C	GACCTCAGAT	TAGGTGGGAT	TCCCCGCTGA
T. rubida	AAGAGAA	GAG AA---AACA	CTTTTTTTTTC	GACCTCAGAT	TAGGTGGGAT	TCCCCGCTGA
T. infesta	AAAAGAA	AAG AGATGCGCAA	TCATTTTTTTC	GACCTCAGAT	TAGGTGGGAT	TCCCCGCTGA
T. longipe	AAAAGAA	AAG AGATGCGCAA	TCATTTTTTTC	GACCTCAGAT	TAGGTGGG-T	TCCCCGCTGA

OLIGO

T. bassolsa	ATTTAAGCAT	ATTAGTAAGC	GGTGGAAAAG	AAACCAACAG	GGATTCCCTT	AGTAGCTGCG
T. lecticu	ATTTAAGCAT	ATTAGTAAGC	GGTGGAAAAG	AAACCAACAG	GGATTCCCTT	AGTAGCTGCG
T. mazzott	ATTTAAGCAT	ATTAGTAAGC	GGTGGAAAAG	AAACCAACAG	GGATTCCCTT	AGTAGCTGCG
T. pallidi	ATTTAAGCAT	ATTAGTAAGC	GGTGGAAAAG	AAACCAACAG	GGATTCCCTT	AGTAGCTGCG
T. rubida	ATTTAAGCAT	ATTAGTAAGC	GGTGGAAAAG	AAACCAACAG	GGATTCCCTT	AGTAGCTGCG
T. infesta	ATTTAAGCAT	ATTAGTAAGC	GGTGGAAAAG	AAACCAACAG	GGATTCCCTT	AGTAGCTGCG
T. longipe	ATTTAAGCAT	ATTAGTAAGC	GGTGGAAAAG	AAACCAACAG	GGATTCCCTT	AGTAGCTGCG

T. bassolsa	AGTGAACAGG	GATTAGCCCA	GC--ACTGAA	TCCCAAAGC	ATTGCTTTTA	GGGAAATGTA
T. lecticu	AGTGAACAGG	GATAAGCCCA	GC-ACTGAAT	CCC-AAAAGC	ATTGCTTTTA	GGGAAATGTA
T. mazzott	AGTGAACAGG	GATTAGCCCA	GC--ACTGAA	TCCCAAAGC	ATTGCTTTTA	GGGAAATGTA
T. pallidi	AGTGAACAGG	GATTAGCCCA	GC--ACTGAA	TCCCAAAGC	ATTGCTTTTA	GGGAAATGTA
T. rubida	AGTGAACAGG	GATTAGCCCA	GC-ACTGAAT	CCC-AAAAGC	ATTGCTTTTA	GGGAAATGTA
T. infesta	AGTGAACAGG	GATTAGCCCA	GC-ACTGAAT	CCC-AAAAGC	ATTGCTTTTA	GGGAAATGTA
T. longipe	AGTGAACAGG	GATTAGCCCA	GCCACTGAAT	CCCCAAAAGC	ATTGCTTTTA	GGGAAATGTA

X. 2. Alineamiento de las secuencias del ITS-2

```

ITPa122 -----
ITPa123 -----
ITLon30 -----
ITLon66 -----
ITPic6 -----
ITPic7 -----
ITPic8 -----
ITBa12 -----
ITBa13 -----
ITBa14 -----
ITBa1136 -----
ITMa38 -----
ITMa85 -----
ITRub93 -----
ITRub141 -----
ITRub142 -----
ITLec56 -----
ITLec62 -----
ITLec64 -----
ITInf72 -----
ITInf74 -----
IRPro48 TTAATAATCGTAGCATAT ATTTTATATAAAAAATAGT GCGCGCAAGTTTTTTTCA TCCCAATTATTTTTTCTTT AAAACTAGTAGTAGCAGCA

ITPa122 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITPa123 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITLon66 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITPic6 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITPic7 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITPic8 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITBa12 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITBa13 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITBa14 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT ATATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITBa1136 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITMa38 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATA TTTTATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITMa85 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATATATT TTATATATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITRub93 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATACAT TTGCAATGATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITRub141 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATACAT TTGCAATGATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITRub142 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA TAAATTT--TATATACAT TTGCAATGATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITLec56 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA CAAATTT--TATATATT TTATAATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITLec62 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA CAAATTT--TATATATT TTATAATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITLec64 --TAAAAATAGAAATTT TTTTTTAAAAAATTCTA CAAATTT--TATATATT TTATAATATATAT-----TGGAAATTTCTGTT--
ITInf72 --TAAAAATAGAAATTT ATTTT--AAAAATTTCTATT AAAAATTTATATATATATA ATGGAATTTCTGTT--
ITInf74 --TAAAAATAGAAATTT ATTTT--AAAAATTTCTATT AAAAATTTATATATATATA --TGGAAATTTCTGTT--
IRPro48 GCTCTCACACAAAGTAT ATTTGATATTTGGGTTTT GCTATATAACTTTTTTAA AGGAAAANGATATGAAAAA AAAAGAAATGCTCTGTTTT

ITPa122 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITPa123 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITLon30 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITLon66 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITPic6 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITPic7 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITPic8 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITBa12 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITBa13 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITBa14 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITBa1136 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITMa38 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITMa85 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --AAATCTATTTCCTGTA
ITRub93 -----GTCACACT TATTATTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACCTATC AGTTTCTTTCTTTGGC-- --TGAATATTTCCTTATT
ITRub141 -----GTCACACT TATTATTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACCTATC AGTTTCTTTCTTTGGC-- --TGAATATTTCCTTATT
ITRub142 -----GTCACACT TATTATTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACCTATC AGTTTCTTTCTTTGGC-- --TGAATATTTCCTTATT
ITLec56 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --TAATCTATTTCCTGTA
ITLec62 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --TAATCTATTTCCTGTA
ITLec64 -----GTCACACT TA-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATG-- --TTCTTTCTTTGGC-- --TAATCTATTTCCTGTA
ITInf72 -----GTCACACAG TT-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATGCA ATTTTCTTTCTTT-- --ATGTTATTTCCTATA
ITInf74 -----GTCACACAG TT-----TTTGGTGGTCAAC AGTATTTCTAAATACATGCA ATTTTCTTTCTTT-- --ATGTTATTTCCTATA
IRPro48 TCTATAAAAAGTACACATC TT-----TTTTATAGTAATTC AGCAATTTTAAATCTTATT AATTTATTTTTTTCCCTT TTTTCTGTCATCATATAA

ITPa122 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITPa123 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITLon66 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITPic6 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITPic7 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITPic8 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITBa12 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITBa13 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITBa14 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITBa1136 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITMa38 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITMa85 TACTTGGTTGTAA-----A TCTTAGTITT-----C AATA--TTGAAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCT-----CAAGTAT--AG
ITRub93 TACTTGGTTGTAAA-----A TCATAGTITT-----C AATA--TTT-AAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCTCT--CAAGTAT--AA
ITRub141 TACTTGGTTGTAAA-----A TCATAGTITT-----C AATA--TTT-AAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCTCT--CAAGTAT--AA
ITRub142 TACTTGGTTGTAAA-----A TCATAGTITT-----C AATA--TTT-AAATTTGTA ACTTGGTATTGGTAATA-A ATCTCT--CAAGTAT--AA
ITLec56 TACTTGGTTGTAA-----A TCATAGTITT-----C AGTA--TTA-AAATTTGTA ACCCTGGTATTGGTAGTA-A ATCTA--CAAGTAT--AG
ITLec62 TACTTGGTTGTAA-----A TCATAGTITT-----C AGTA--TTA-AAATTTGTA ACCCTGGTATTGGTAGTA-A ATCTA--CAAGTAT--AG
ITLec64 TACTTGGTTGTAA-----A TCATAGTITT-----C AGTA--TTA-AAATTTGTA ACCCTGGTATTGGTAGTA-A ATCTA--CAAGTAT--AG
ITInf72 TACTTGGTTTTTAG-----A GCATAGTITT-----C AAT--TTG-AAATTTGTA ATCCAGTATTGGTAATA-A AT-----CAAGTAT--AG
ITInf74 TACTTGGTTTTTAG-----A GCATAGTITT-----C AAT--TTG-AAATTTGTA ATCCAGTATTGGTAATA-A AT-----CAAGTAT--AG
IRPro48 AATTGCTTCTATAATGTAA ATATAGTITTTTTAAACAATC AATAATGTAAAATCTATA ACCCTGGTATTGGCAATAA ATTTATTGCAAGTATTAG

```

ITPa122 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITPa123 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITLon30 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITLone66 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITPic6 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITPic7 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITPic8 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITBa12 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITBa13 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITBa14 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITBa1136 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITMa38 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITMa285 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITRub93 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITRub141 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITRub142 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITLec56 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITLec62 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITLec64 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITIn72 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
ITIn74 TAGTGAAA-----TGTTGA-----TGACAGAAGAAA AATT-----TTTTCCG-AT CTAGGCATTGCTGGGGCAT
IRPro48 TGGTGAAAAAAGATATAATT TCITCTGTTCAATTTTTT ACAAATTACAAGGGAAAAGA ATTTAATAAATTTTCGCTAG TTAGATATAGTCTAGGGCAA

ITPa122 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTTATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITPa123 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITLon30 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITLone66 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITPic6 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITPic7 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTTATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITPic8 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITBa12 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTTATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITBa13 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTTATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITBa14 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITBa1136 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITMa38 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITMa285 TTTTTTACT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -AATTCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTATT---- ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITRub93 TTTTTT-CT----TCCTG -ATAAAAACAAATGATCTATTA TCATTTATTTACT--TAGAG TTT-ACCAATTTTTTTT--T ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITRub141 TTTTTT-CT----TCCTG -ATAAAAACAAATGATCTATTA TCATTTATTTACT--TAGAG TTT-ACCAATTTTTTTT--T ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITRub142 TTTTTT-CT----TCCTG -ATAAAAACAAATGATCTATTA TCATTTATTTACT--TAGAG TTT-ACCAATTTTTTTT--T ATA-TGTCGTGATTAACCTG
ITLec56 TTTTTT-CT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -GTATCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTCTTTATT ATATGCTCTGATTAACCTG
ITLec62 TTTTTT-CT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -GTATCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTCTTTATT ATATGCTCTGATTAACCTG
ITLec64 TTTTTT-CT----TCCTG TATAAAAACAAATGATCTAC-- -GTATCATTTACT--TTGAG TTT-ACCAATTTTTCTTTATT ATATGCTCTGATTAACCTG
ITIn72 GTTTTT-CT----TTTTG CATAAAACAAATGATCTA-- -CATTTATTTACT--T-GAG TTT-GCCAAATTTTTTT--T ATA----TATATAAAGCTG
ITIn74 GTTTTT-CT----TTTTG CATAAAACAAATGATCTA-- -CATTTATTTACT--T-GAG TTT-GCCAAATTTTTTT--T ATA----TATATAAAGCTG
IRPro48 TTTTTTCTATTCCCTATTT GTAAAAAAAAGAAAAAC-- --TTGATCCACTAATAAAG TTTTACTTGAAATTTGCTG CTAATTTTATAATAAAGCTG

ITPa122 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITPa123 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITLon30 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITLone66 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITPic6 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITPic7 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITPic8 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITBa12 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITBa13 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITBa14 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITBa1136 GTTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITMa38 GCTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITMa285 GCTATGCCAGTGCATATACA GTAATAA--TAAATTCAAAT TTTTCAAAT-----TTA TATTGTG-TCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITRub93 -CTATGCCAGATATAAATGCA GTATATATATAATTTTCAAG TTTTCAAATTTTTTTT-GTA TATTGTGTGCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITRub141 -CTATGCCAGATATAAATGCA GTATATATATAATTTTCAAG TTTTCAAATTTTTTTTGTG TATTGTGTGCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITRub142 -CTATGCCAGATATAAATGCA GTATATATATAATTTTCAAG TTTTCAAATTTTTTTTGTG TATTGTGTGCAACTATGTAA AATAAGTAT-----GAATA
ITLec56 -CTATGC--AGGAAGATACA GTATATATATAAATTT-CAGG TTTTCAAAT-----GTA TATTGTGT-ACACTATGTAA AACAAGTAT-----GAATA
ITLec62 -CTATGC--AGTAAGATACA GTATATATATAAATTT-CAGG TTTTCAAAT-----GTA TATTGTGT-ACACTATGTAA AACAAGTAT-----GAATA
ITLec64 -CTATGC--AGGAAGATACA GTATATATATAAATTT-CAGG TTTTCAAAT-----GTA TATTGTGT-ACACTATGTAA AACAAGTAT-----GAATA
ITIn72 -CCTTGC-----AGTTGGC ATATATA--AATTTGGAT TTTTCAAAT-----GTA TATTGTA--ACACTATGTAA AACACAGGTTA-----GAATA
ITIn74 -CCTTGC-----AGTTGGC ATATATA--AATTTGGAT TTTTCAAAT-----GTA TATTGTA--ACACTATGTAA AACACAGGTTA-----GAATA
IRPro48 GAAATTTTTTCAATTAATCT ATAAAATCCAGTAATTAGA TTTGTATTAAATGTTAATA TATTAAAGGCAATATAGAA CAAAGTAAATTTTTGCAAGA

ITPa122 TTGCAATAGAA
ITPa123 TTGCAATAGAA
ITLon30 TTGCAATAGAA
ITLone66 TTGCAATAGAA
ITPic6 TTGCAATAGAA
ITPic7 TTGCAATAGAA
ITPic8 TTGCAATAGAA
ITBa12 TTGCAATAGAA
ITBa13 TTGCAATAGAA
ITBa14 TTGCAATAGAA
ITBa1136 TTGCAATAGAA
ITMa38 TTGCAATAGAA
ITMa285 TTGCAATAGAA
ITRub93 TTTCAAGAGAA
ITRub141 TTTCAAGAGAA
ITRub142 TTTCAAGAGAA
ITLec56 TTGACAGAGTA
ITLec62 TTGACAGAGTA
ITLec64 TTGACAGAGTA
ITIn72 TTTAAAGAAA
ITIn74 TTTAAAAAGAA
IRPro48 AAGGAAAG