

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis morfométrico como herramienta para la diferenciación de especies: el caso hipotético de *Panstrongylus chinai* y *Panstrongylus howardi*

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas**

ÁLVARO PATRICIO LARA MOREIRA

Quito, 2019

CERTIFICADO

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Alvaro Patricio Lara Moreira ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Anita Villacís
Directora de la Disertación
Quito, XX de octubre del 2019

A MI FAMILIA,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) y a todos quienes lo conforman, especialmente a la Dra. Anita Villacís, mi directora de tesis, por confiar en mí e inspirarme a ser mejor tanto con su calidad humana como con su visión profesional.

También extendo un sincero agradecimiento al Dr. Mario Grijalva y a todos mis colegas de laboratorio, Santiago Cadena, Sebastian Real, Juan José Bustillos, César Yumiseva y Daphne Armas, por su enorme colaboración para la realización de este trabajo.

A mis mejores amigos, Josué Pinto, con quien compartí grandes momentos mientras enfrentábamos cada reto durante nuestros años de formación y Gandy Guerrón, quien no ha dejado de animarme a seguir adelante a pesar de la adversidad.

A mis padres, Emilio y Audrey, que me han enseñado el valor del trabajo duro y la perseverancia, así como la importancia de una formación integral con miras a ser una mejor persona y profesional para la sociedad. Igualmente, a mi hermana, Cristina, quien me ha acompañado en cada éxito, fracaso y travesura a lo largo de la vida, además de creer en mí más allá de lo humanamente posible.

Finalmente, al MSc Esteban Baus, cuyas enseñanzas me abrieron los ojos a la estrecha relación que tiene la ciencia con la sociedad y por ayudar a sus estudiantes a descubrir su lado más artístico y humano y a la Dra. Verónica Crespo, cuyo trabajo y pasión por la docencia me han influenciado grandemente.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Analysis of Variance o Análisis de Varianza

CCCMaha: Cross Checked Classification based on Mahalanobis distance o Análisis de Clasificación Validada basado en distancias de Mahalanobis.

CCCMLi: Cross Checked Classification based on Maximum likelihood o Análisis de Clasificación Validada basado en Máxima verosimilitud.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention o Centro para el Control y Prevención de Enfermedades

ch: chinai

CISeAL: Centro de Investigación para la Salud en América Latina

CS: Centroid Size o Tamaño del Centroide

DALY: Disability-Adjusted Life Years o Años de Vida Ajustados por Discapacidad

ED: Euclidean Distances o Distancias Euclidianas

GPA: Generalized Procrustes Analysis o Análisis Generalizado de Procrustes

H: hembra

hb: híbrido

HC: Hierarchical Classification o Clasificación Jerárquica

hw: howardi

M: macho

Maha: Mahalanobis

MD: Mahalanobis Distances o Distancias de Mahalanobis

MIDUVI: Ministerio de Desarrollo Urbano y Vivienda

Mli: Maximum Likelihood o Máxima Verosimilitud

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

P.: *Panstrongylus*

PC: Principal Components o Componentes Principales

PCA: Principal Component Analysis o Análisis de Componentes Principales

XYOM: X Y Online Morphometrics

YLD: Years Lived with Disability o Años Vividos con Discapacidad

YLL: Years of Life Lost o Años de Vida Perdidos

TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICADO.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
TABLA DE CONTENIDO	VII
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABLAS	XIII
LISTA DE ANEXOS	XIV
1. RESUMEN.....	1
2. <i>ABSTRACT</i>	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	3
3.1.1. ANTECEDENTES	3
3.1.2. LA IMPORTANCIA DE LA SALUD Y EL CONCEPTO DE DALYS.....	4
3.1.3. RUTAS DE TRANSMISIÓN	5
3.1.4. SÍNTOMAS.....	5
3.1.5. TRATAMIENTO	6
3.1.6. EL PARÁSITO.....	6
3.1.7. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO.....	7
3.2. VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	8
3.2.1. CICLO DE VIDA DEL VECTOR	8
3.2.2. INSECTOS TRANSMISORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL ECUADOR.....	9

3.2.2.1.	<i>Panstrongylus chinai</i>	10
3.2.2.2.	<i>Panstrongylus howardi</i>	11
3.3.	LA MORFOMETRÍA: HISTORIA, CONCEPTOS BÁSICOS Y APLICACIONES.....	11
3.3.1.	MORFOMETRÍA Y SISTEMÁTICA	14
3.3.2.	LA IMPORTANCIA DE ESTUDIAR ALAS EN TRIATOMINAE	15
3.4.	JUSTIFICACIÓN	16
3.5.	OBJETIVOS	16
3.5.1.	OBJETIVO GENERAL	16
3.5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1	ÁREA DE ESTUDIO	18
4.1.1	LOJA	18
4.1.2	MANABÍ.....	19
4.2	TIPO DE CONSTRUCCIÓN DE VIVIENDAS	19
4.3	COLECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS PARENTALES Y CRUCES PARA OBTENCIÓN DE INDIVIDUOS HÍBRIDOS.....	20
4.4	SELECCIÓN DE MUESTRAS	21
4.5	MEDICIÓN DEL LARGO DEL CUERPO	21
4.6	PREPARACIÓN DEL MEDIO HOYER	21
4.7	CAPTURA DE FOTOGRAFÍAS	22
4.8	EDICIÓN DE FOTOGRAFÍAS	22
4.9	UTILIZACIÓN DEL SOFTWARE XYOM	22
4.10	PUNTOS DE REFERENCIA	23
4.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	23
4.11.1	TAMAÑO	24
4.11.2	CONFORMACIÓN	24

5.	RESULTADOS	26
5.1	TAMAÑO	26
5.1.1	VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>P. howardi</i> e híbridos	26
5.1.2	VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>P. howardi</i> e híbridos PARA MACHOS Y HEMBRAS	26
5.1.3	VARIACIÓN INTRASPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE SEXOS POR ESPECIE	27
5.1.3.1	DIMORFISMO SEXUAL DE <i>P. chinai</i>	27
5.1.3.2	DIMORFISMO SEXUAL DE <i>P. howardi</i>	27
5.1.3.3	DIMORFISMO SEXUAL DE LOS HÍBRIDOS	27
5.2	CONFORMACIÓN (FORMA)	27
5.2.1	VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>P. howardi</i> e híbridos	28
5.2.2	VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE <i>Panstrongylus. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e híbridos PARA MACHOS Y HEMBRAS.....	28
5.2.3	VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE SEXOS POR ESPECIE.....	30
5.2.3.1	DIMORFISMO SEXUAL DE <i>P. chinai</i>	30
5.2.3.2	DIMORFISMO SEXUAL DE <i>P. howardi</i>	31
5.2.3.3	DIMORFISMO SEXUAL DE LOS HÍBRIDOS	31
6.	DISCUSIÓN.....	33
6.1	TAMAÑO	34
6.1.1	VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>P. howardi</i> e híbridos	34
6.1.2	VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>P. howardi</i> e híbridos PARA MACHOS Y HEMBRAS.....	35

6.1.3	VARIACIÓN INTRASPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE SEXOS POR ESPECIE	35
6.2	CONFORMACIÓN (FORMA)	36
6.2.1	VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>P. howardi</i> e híbridos	36
6.2.2	VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>P. howardi</i> e híbridos PARA MACHOS Y HEMBRAS	38
6.2.3	VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE SEXOS POR ESPECIE.....	38
7.	CONCLUSIONES	42
8.	RECOMENDACIONES	43
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
10.	FIGURAS	56
11.	TABLAS.....	72
12.	ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Ecuador con las localidades de origen de los triatomíneos parentales utilizados en el estudio	56
Figura 2. Fotografías del ala derecha de triatomíneos utilizadas en el estudio. (A) Macho parental <i>P. chinai</i> , (B) Hembra parental <i>P. howardi</i> , (C) Macho híbrido.....	57
Figura 3. Fotografías del ala derecha de triatomíneos utilizadas en el estudio. (A) Macho parental <i>P. howardi</i> , (B) Hembra parental <i>P. chinai</i> , (C) Hembra híbrida	58
Figura 4. Puntos de referencia (landmarks) usados en el estudio.....	59
Figura 5. Diagramas de caja (bloxplots) del tamaño del centroide (Centroid Size) que muestran la variación interespecífica del tamaño alar para <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridos	60
Figura 6. Diagramas de caja (bloxplots) del tamaño del centroide (Centroid Size) que muestran la variación interespecífica del tamaño alar para machos <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridos	61
Figura 7. Diagramas de caja (bloxplots) del tamaño del centroide (Centroid Size) que muestran la variación interespecífica del tamaño alar para hembras <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridas	62
Figura 8. Diagramas de caja (bloxplots) del tamaño del centroide (Centroid Size) que muestran la variación interespecífica e intraespecífica del tamaño alar para machos y hembras <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridos.....	63
Figura 9. Análisis de Componentes Principales (PCA) que muestra la variación interespecífica de la conformación alar para <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridos	64
Figura 10. Análisis de Componentes Principales (PCA) que muestra la variación interespecífica de la conformación alar para machos <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridos	65
Figura 11. Análisis de Componentes Principales (PCA) que muestra la variación interespecífica de la conformación alar para hembras <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridas....	66

- Figura 12. Análisis de Componentes Principales (PCA) que muestra la variación interespecífica e intraespecífica de la conformación alar para machos y hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos..... 67
- Figura 13. Dendrograma (Single Linkage Tree) basado en las distancias Euclidianas de la conformación alar para *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos 68
- Figura 14. Dendrograma (Single Linkage Tree) basado en las distancias Euclidianas de la conformación alar para machos *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos..... 69
- Figura 15. Dendrograma (Single Linkage Tree) basado en las distancias Euclidianas de la conformación alar para hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos..... 70
- Figura 16. Dendrograma (Single Linkage Tree) basado en las distancias Euclidianas de la conformación alar para machos y hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos 71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades y número de individuos para triatomínos parentales e híbridos utilizados en el estudio	72
Tabla 2. Datos de los diagramas de caja (boxplots) para el tamaño del centroide (Centroid Size) de <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridos	73
Tabla 3. Valores de p obtenidos mediante ANOVA de las comparaciones a nivel de especie, machos, hembras y sexo para el tamaño del centroide (Centroid Size)	74
Tabla 4. Distancias Euclidianas (ED) y de Mahalanobis (MD) a nivel de especie, machos, hembras y sexo de <i>P. chinai</i> , <i>P. howardi</i> e Híbridos.....	75
Tabla 5. Reclasificación validada basada en el índice de máxima verosimilitud (CCCMli) y en la distancia de Mahalanobis (CCCMaha) a nivel de especie, machos, hembras y sexo.	76

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa del rango de distribución de la enfermedad de Chagas en América	77
Anexo 2. Mapa del rango de distribución de la enfermedad de Chagas en el mundo.....	78
Anexo 3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	79
Anexo 4. Ciclo de vida de un triatominos (Modelo: <i>Panstrongylus chinai</i>)	80
Anexo 5. Adultos de las especies analizadas en el estudio	81
ANEXO 6. UTILIZACIÓN DE LA FUNCIÓN “RANDBETWEEN” Y MEDICIÓN DEL LARGO DEL CUERPO EN TRIATOMINOS	82
ANEXO 7. FABRICACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE HOYER	85
ANEXO 8. UTILIZACION DE LA CÁMARA OLYMPUS SC100 Y DEL PROGRAMA IRFANVIEW (v. 4.38)	90
ANEXO 9. UTILIZACIÓN DE ADOBE PHOTOSHOP LIGHTROOM PARA EDICIÓN DE FOTOGRAFÍAS	101
ANEXO 10. UTILIZACIÓN DE XYOM PARA LA DIGITALIZACIÓN DE LANDMARKS EN ALAS DE TRIATOMINOS	115
ANEXO 11. UTILIZACIÓN DE XYOM PARA LA OBTENCIÓN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS EN MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA USANDO COMO EJEMPLO ALAS DE TRIATOMINOS	134

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos triatomíneos. La subfamilia Triatominae comprende aproximadamente 152 especies, siendo el género *Panstrongylus*, con 13 especies, uno de los más importantes a nivel epidemiológico. En Ecuador, *Panstrongylus* está representado por seis especies, donde destacan dos vectores de importancia médica: *Panstrongylus chinai* y *Panstrongylus howardi*. Mientras que *P. chinai* puede ser completamente negro y/o café, habitando las provincias de El Oro y Loja, *P. howardi* presenta una coloración café anaranjada y es endémico de la provincia de Manabí. Se ha propuesto que *P. chinai* podría ser una forma melánica de *P. howardi*, por ello, el objetivo principal del estudio fue comparar el tamaño y la conformación alar entre individuos híbridos, como también entre individuos híbridos con respecto a sus parentales mediante el uso de análisis morfométrico, con el propósito de dilucidar si son especies distintas o si se encuentran en proceso de especiación debido a su aislamiento geográfico. La metodología aplicada fue: i) la extracción y montaje de las alas, ii) la captura de imágenes y edición para mejorar la visualización de los puntos de interés, iii) el procesamiento de imágenes y obtención de coordenadas en XYOM. Finalmente, iv) la realización de análisis a fin de determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas. Se encontró que existen diferencias ($p < 0.05$) en tamaño, pero no en la conformación de las alas entre *P. chinai*, *P. howardi* y sus híbridos. Asimismo, se observaron diferencias ($p < 0.05$) de tamaño entre machos y hembras a nivel inter e intraespecífico, pero no en conformación. Concluimos que las diferencias de tamaño bien se pueden atribuir a los efectos de la variación ambiental, bien a la rapidez con la que se alcanza la capacidad de carga en poblaciones asociadas al domicilio o criadas en laboratorio. Adicionalmente, los resultados de la conformación alar de esta investigación contrastan con otros estudios de cabezas, alas y huevos, donde encontraron diferencias. Nuestros datos evidencian que *P. chinai* y *P. howardi* son especies distintas, no obstante, están cercanamente emparentadas, tanto morfológica como reproductivamente.

Palabras clave: conformación alar, híbrido morfometría, *Panstrongylus*, tamaño alar.

2. ABSTRACT

Chagas disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and transmitted by kissing bugs (triatomines). There are around 152 species classified within the subfamily Triatominae, being the genus *Panstrongylus*, with 13 species, one of the most epidemiologically important. In Ecuador, *Panstrongylus* is represented by six species, such as *Panstrongylus chinai* and *Panstrongylus howardi*, two vectors with relative medical importance. While *P. chinai* can be completely black and/or brown and is distributed in El Oro and Loja provinces, *P. howardi* displays a brown-orangish coloration and is endemic to the Manabí province, but previous studies have proposed that *P. chinai* might be a melanic form of *P. howardi*. Therefore, the main objective of this study was to compare both size and shape of wings between hybrids, as well as between hybrids and parental individuals, using geometric morphometrics in order to elucidate whether they are different species or if they are undergoing speciation due to geographic isolation. To do so, i) the wings of each individual were extracted and mounted. Then, ii) photos of each wing were taken and edited in favor of a better visualization of *landmarks*. Next, iii) the edited images were processed within the XYOM platform, and coordinates were obtained. Finally, iv) several analyses were performed to determine whether the differences were statistically significant or not. Our results showed differences ($p < 0.05$) in wing size between *P. chinai*, *P. howardi* and hybrids, however, no differences were found in wing shape. Additionally, differences ($p < 0.05$) in wing size between males and females were found, both at the intra and at interspecific levels. Nevertheless, the same cannot be stated for wing shape. In conclusion, the differences in size could be attributed to the effects of environmental variation or, perhaps, to the speed at which the domiciliary and laboratory populations reach their carrying capacity. Finally, our results demonstrated differences in shape, which contrast with other studies on heads, wings and eggs. Our data suggests that *P. chinai* and *P. howardi* are different, but closely related species, both morphologically and reproductively.

Key words: hybrid, morphometrics, *Panstrongylus*, wing size, wing shape.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la enfermedad de Chagas, que se conoce también como Tripanosomiasis americana, es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos triatomíneos. Considerada como una enfermedad desatendida, se encuentra mayormente en zonas endémicas de 21 países de América Central y Sudamérica (Anexo 1); no obstante, debido a la migración, se ha extendido a otros continentes (Anexo 2). En este contexto, es importante señalar que aproximadamente 10 000 personas mueren cada año de Chagas, existen 8 millones de personas infectadas y más de 25 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (OMS, 2018). En Ecuador, aproximadamente 230 000 personas están infectadas y 6.2 millones se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (Villacís *et al.*, 2008).

3.1.1. ANTECEDENTES

Los registros más antiguos de la tripanosomiasis americana datan de hace 9 000 años, en Chile, donde momias de la cultura Chinchorro presentaban un crecimiento inusual del esófago y el colon (Aufderheide *et al.*, 2004). Mucho más tarde, hace 1 600 años, en Bolivia, momias de la cultura Wankarani mostraban signos de haber sufrido un agrandamiento de los intestinos y el corazón, síntomas clásicos de una enfermedad de Chagas crónica (Ramen, 2002). Se conoce que esta dolencia puede llegar a dañar los nervios del corazón encargados de controlar el latido.

Tómese en cuenta que los Wankarani eran una cultura andina del altiplano boliviano, al sur del lago Poopó, ecosistema que tiene una altitud promedio de 4 000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) (Ramen, 2002). Las zonas altas tienen menos oxígeno que las zonas bajas, por lo que las adaptaciones fisiológicas para órganos como los pulmones y el corazón son bastante extremas, pues deben esforzarse mucho para poder mantener la presión y la cantidad de oxígeno a niveles adecuados (Bärtsch & Gibbs, 2007). De este

modo, una persona con Chagas crónico puede morir más rápidamente cuando vive en zonas altas que cuando vive en zonas bajas.

Algunos historiadores han propuesto que Charles Darwin pudo haber muerto de Chagas. Durante su paso por Sudamérica, Darwin menciona en sus notas que dejó a un triatomino picarle para comprobar sus hábitos alimenticios. Años más tarde, síntomas como depresión, fatiga y fiebre lo atormentarían y lo llevarían a tener dolores durante el resto de su vida. Sin embargo, la evidencia más contundente de este hecho fue que el naturalista inglés mostraba signos de haber sufrido algún tipo de daño en el corazón, lo cual parecería estar relacionado con su contacto con el insecto (Ramen, 2002).

En 1909, el científico brasileño, Carlos Chagas, reportó el primer caso en una niña de dos años que presentaba síntomas de inflamación y hemorragia a nivel del hígado y el bazo. No solo descubrió que los insectos triatominos eran los vectores de la enfermedad, sino que también describió los síntomas y al agente causal, *Trypanosoma cruzi*. Su trabajo fue pionero en la investigación de las enfermedades infecciosas y sigue siendo, hasta la actualidad, un referente excelente sobre la aplicación del método científico (Araujo *et al.*, 2017).

3.1.2. LA IMPORTANCIA DE LA SALUD Y EL CONCEPTO DE DALYS

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para lograr un correcto entendimiento de la relación costo-beneficio que existe en cualquier intervención dentro del ámbito de la salud, es necesario entender cuáles son las consecuencias específicas de cada enfermedad para la vida de las personas, tanto durante como después de sufrirla. En este contexto, un estudio realizado en 1990 planteaba el desarrollo de un nuevo indicador para evaluar el peso que las enfermedades tienen a nivel de región, edad y sexo (Murray *et al.*, 1994).

De esta forma nace el concepto de DALYs (por sus siglas en inglés) o el número de años de vida ajustados por discapacidad, el cual representa cada año de vida saludable perdido debido a una enfermedad o lesión. También se puede pensar como una forma de medir la brecha que existe entre el estado de salud actual y un estado ideal. El cálculo se

realiza sumando los años de vida perdidos (YLL, por sus siglas en inglés) causada por una mortalidad prematura en la población y los años perdidos por discapacidad (YLD, por sus siglas en inglés) para la gente que vive con la enfermedad o sus consecuencias (OMS, 2018).

Conforme a un modelo simulado por computadora (que incluía datos la OMS con respecto a la probabilidad de evolucionar hacia las distintas fases de la enfermedad de Chagas), se estimó que un individuo infectado puede costar 474 dólares en cuidados al sistema de salud y 0.51 DALYs anualmente. Adicionalmente, a lo largo de su vida, el costo puede llegar a los 3 456 dólares y 3.57 DALYs. Cuando estos datos se proyectan a una escala global, el costo anual puede llegar a ser de 627.46 millones de dólares y 806 170 DALYs. Finalmente, el costo neto global de individuos infectados actualmente es de 24.73 mil millones de dólares en cuidados y 29 385 250 DALYs. Estos datos son muy similares a lo que se observa en enfermedades como el cáncer de cervicales, el cólera y la gastroenteritis (Lee *et al.*, 2013).

3.1.3. RUTAS DE TRANSMISIÓN

La forma más común de transmisión de *T. cruzi* es la transmisión vectorial, la cual se da mediante el contacto con las heces de un triatomino con hábitos alimenticios hematófagos. Cuando el insecto se alimenta de sangre, defeca muy cerca de la herida. Las defecaciones están llenas del parásito y, al momento de rascarse, la persona facilita su entrada al torrente sanguíneo (ISGLOBAL, 2018). Además, otras vías de transmisión a considerar son: 1) de madre a hijo, 2) a través de transfusiones o trasplantes de personas infectadas, 3) oralmente debido al contacto con alimentos contaminados por el vector y 4) en el laboratorio por una inoculación accidental al momento de manipular de forma inadecuada muestras contaminadas con el parásito (OMS, 2018; ISGLOBAL, 2018).

3.1.4. SÍNTOMAS

La enfermedad de Chagas tiene dos fases principales: la fase aguda y la fase crónica. La primera es generalmente corta, pero violenta, con síntomas como fiebre e inflamación en órganos como el colon y el corazón; sin embargo, suelen presentarse casos

asintomáticos, lo que hace difícil su detección (Ramen, 2002; OMS, 2018). Se ha reportado que los adultos tienen una mayor probabilidad de sobrevivir a las primeras fases de la enfermedad que los niños. La fase crónica suele ocurrir varios años después; en este punto, los parásitos han invadido el sistema nervioso y varios órganos, destruyendo tejidos y acabando con los nervios que controlan procesos intestinales y cardíacos. Asimismo, los órganos afectados se agrandan y su funcionamiento se ve comprometido (Ramen, 2002).

3.1.5. TRATAMIENTO

Puesto que no existe una vacuna (OMS, 2018) y es una enfermedad difícil de tratar, es esencial diagnosticarla lo más pronto posible. Se recomienda tratarla durante la fase aguda en todos los que hayan sufrido transmisión vectorial o congénita, así como en personas inmunodeprimidas (ISGLOBAL, 2018). Por otra parte, el tratamiento durante la fase crónica se debe aplicar en niños y puede tener beneficios potenciales para los adultos (CDC, 2015). Los medicamentos utilizados son Benznidazol y Nifurtimox, no obstante, ambos tienen efectos adversos; el Benznidazol puede provocar dermatitis alérgica, insomnio y pérdida de peso y el Nifurtimox puede causar náuseas, vómito y mareo (CDC, 2019). Además, se ha reportado que los efectos secundarios de ambos fármacos tienden a aumentar en frecuencia y peligrosidad a medida que avanza la edad (CDC, 2019). Mientras que para los niños y jóvenes hay una alta probabilidad de curarse por completo después de recibir el tratamiento, en el caso de los adultos no se puede decir lo mismo. Adicionalmente, es necesario un seguimiento anual para observar si se presentan complicaciones (ISGLOBAL, 2018).

3.1.6. EL PARÁSITO

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado que pertenece al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae (Keas, 1999; TOLWEB, 2009). El ciclo de vida del parásito se puede entender desde la perspectiva de la transmisión entre dos ambientes totalmente diferentes y la colonización de células específicas. De esta forma, el *Trypanosoma* debe colonizar las células del intestino medio del vector. Posterior a esto,

una vez transmitido, debe ser capaz de colonizar el citoplasma de la célula huésped del mamífero hospedero (Tyler & Engman, 2001).

Se sabe que *Trypanosoma cruzi* posee una estructura poblacional clonal, esto es, que aquellos genotipos multilocus de los descendientes son iguales al genotipo original (Muñoz *et al.*, 2013). Sin embargo, los descubrimientos con respecto a eventos como intercambio genético, intercambio mitocondrial e hibridación han provocado que los científicos se replanteen el estudio de su evolución (Muñoz *et al.*, 2013). La importancia de este análisis radica en que permite a la comunidad médica evaluar el impacto que tienen los cambios genéticos del parásito sobre el desarrollo de nuevas técnicas para combatir sus intrincados mecanismos adaptativos (Zingales *et al.*, 2009; Ocaña-Mayorga *et al.*, 2010).

En este sentido, el nuevo acercamiento al problema se da a través de los DTUs (Unidad de Tipificación Discreta). Se definen como el conjunto de linajes que están genéticamente más relacionados entre ellos que con cualquier otro linaje y que se pueden identificar fácilmente por marcadores moleculares, genéticos o inmunológicos. Por ende, las cepas de *Trypanosoma cruzi* se pueden asignar a seis DTUs (*T. cruzi* I-VI) o linajes filogenéticos (Zingales *et al.*, 2009).

3.1.7. CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO

El ciclo de vida del parásito se divide en dos fases principales: la invasión al vector y la invasión al ser humano. Cuando un vector infectado se alimenta de la sangre del hospedero, debido a su pobre capacidad de retener líquido, defeca sobre la herida y permite la entrada de tripomastigotes metacíclicos. Luego, estos últimos ingresan a las células de la herida; una vez dentro, se transforman en amastigotes intracelulares. Después, los amastigotes se dividen por fisión binaria hasta alcanzar la madurez y se convierten en tripomastigotes. En este punto, los tripomastigotes pueden tomar dos caminos: o bien infectan otros tejidos y se vuelven a transformar en amastigotes intracelulares, o bien rompen la célula afectada y entran al torrente sanguíneo. La transformación de tripomastigote a amastigote resulta en la manifestación clínica de la enfermedad (Anexo 3) (CDC, 2015).

Si, por otra parte, el parásito pasa al torrente sanguíneo, un triatomino puede alimentarse de sangre e infectarse. Una vez dentro del vector, los tripomastigotes alcanzan el intestino medio y se convierten en epimastigotes. Posteriormente, los epimastigotes se dividen y se diferencian. Finalmente, cuando alcanzan el intestino posterior, se diferencian en tripomastigotes y el ciclo se repite (Anexo 3) (CDC, 2015).

3.2. VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Se han reportado aproximadamente 152 especies de Triatominae (Lent & Wygodzinsky, 1979; Schofield & Galvão, 2009; Mendonça *et al.* 2016; Justi & Galvao, 2017), con un total de 17 géneros. La mayor parte se encuentra en América, sin embargo, *Triatoma rubrofasciata* es una excepción que se puede encontrar en el Viejo Mundo junto con otras siete especies parecidas morfológicamente (Dujardin *et al.*, 2002). Se piensa que al menos la mitad de las especies de triatominos encontradas en el continente americano portan el parásito. Así, *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* son los géneros más importantes desde un punto de vista epidemiológico. La subfamilia Triatominae pertenece a la familia Reduviidae y se considera un grupo polifilético que se caracteriza por el hábito de la hematofagia, la presencia de una proboscis recta y estrecha, mandíbulas que perforan el tejido y una membrana entre el segundo y tercer segmento del rostrum (Dujardin *et al.*, 2002). Los adultos son fácilmente distinguibles de las ninfas si se observa atentamente el color, la cabeza, el tamaño, la forma del cuerpo, la presencia de alas y la diferenciación de su genitalia (Rozendaal, 1997; Dujardin *et al.*, 2002). En este sentido, el color puede cambiar con la muerte de los individuos, por lo que debe analizarse con cuidado. Asimismo, aparte de no conocerse si existe una alta tasa de determinismo genético con respecto al color, este factor ha llevado a descripciones erróneas de especies y subespecies (Dujardin *et al.*, 2002).

3.2.1. CICLO DE VIDA DEL VECTOR

El ciclo de vida del vector puede durar de 4 a 24 meses, donde pasa de huevo a adulto. En este sentido, se conoce que las especies con mayor importancia pueden llegar a tener hasta dos ciclos por año. Ya que los triatominos son hemimetábolos, los adultos

se distinguen de los estadios ninfales por sus alas y genitalia desarrolladas. A diferencia de otros vectores, tanto adultos como ninfas comparten hábitat y el comportamiento de hematofagia (Rozendaal, 1997). Cabe recalcar que los triatominos atraviesan cinco estadios ninfales y luego pasan a ser adultos (macho o hembra) (Stevens *et al.*, 2011).

De acuerdo a Mosquera *et al.*, (2016), en el caso de *Panstrongylus chinai*, el ciclo de vida puede durar aproximadamente un año en condiciones de laboratorio. Por ende, en promedio, cada estadio tiene la siguiente duración: El paso de huevo a NI toma 25 días, de NI a NII toma 38 días, de NII a NIII demora 42 días, de NIII a NIV es de 51 días, de NIV a NV tarda 73 días y de NV a adulto es de 168 días (Anexo 4) (Mosquera *et al.*, 2016). Es interesante observar que los estadios NI y NV son los que presentan una mayor tasa de mortalidad; mientras que el estadio I muere probablemente debido a que ciertos componentes de su proboscis aún son delicados y se pueden dañar fácilmente, el estadio V lo hace posiblemente porque enfrenta retos muy complejos para alcanzar la última muda, un evento que se ha observado en otras especies (Mosquera *et al.*, 2016).

Según Castillo, (2017), *Panstrongylus howardi* tiene un ciclo de vida que dura aproximadamente seis meses en condiciones de laboratorio. De tal manera que, de huevo a N1 toma aproximadamente 28 días, de NI a NII unos 23 días, de NII a NIII 22 días, de NIII a NIV alrededor de 28 días, de NIV a NV 37 días y de NV a adulto 42 días. Por otra parte, esta especie presenta una mayor mortalidad durante los dos primeros estadios ninfales (NI y NII). En resumen, como se observó en *P. chinai*, este fenómeno respondería al hecho de que las ninfas jóvenes poseen una construcción bucal delicada y enfrentan serias dificultades al momento de alimentarse (Castillo, 2017).

3.2.2. INSECTOS TRANSMISORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL ECUADOR

En Ecuador se han reportado 16 especies de insectos de la familia Triatominae en 18 de las 24 provincias que conforman el país, siendo las más importantes *Rhodnius ecuadoriensis* y *Triatoma dimidiata*. Adicionalmente, aun cuando son considerados vectores secundarios, algunas especies del género *Panstrongylus* han ganado importancia debido a su rápida expansión hacia áreas habitadas por el ser humano y a ciertos

comportamientos que los hacen buenos vectores, como son: i) un tiempo de contacto considerable con el hospedero, ii) el consumo de una gran cantidad de sangre, iii) la producción de su primera defecación en un tiempo relativamente corto desde el inicio de la alimentación, iv) una respuesta relativamente rápida a la presencia del hospedero, v) una tasa de defecación bastante alta durante la alimentación y vi) una alta tasa de infección por el parásito *T. cruzi* (Castillo, 2017; Villacís *et al.*, datos no publicados).

El género *Panstrongylus* abarca 13 especies descritas que suelen asociarse a animales que viven en nidos o madrigueras para tener un acceso fácil a la fuente de sangre. En este contexto, *P. megistus* fue la primera especie de triatomino en ser considerada como vector del parásito que causa la enfermedad de Chagas, pese a que hoy en día tiene una importancia más histórica, y no tanto epidemiológica (Dujardin *et al.*, 2002). En Ecuador se han reportado cinco especies del género *Panstrongylus*: *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. howardi*, *P. lignarius*/*P. herreri* y *P. rufotuberculatus* (Villacís *et al.*, 2015).

3.2.2.1. *Panstrongylus chinai*

Entre las distintas especies del género, *P. chinai* es un vector de alta importancia en Ecuador, Perú y Venezuela. En Perú se ha encontrado mayormente en el Departamento de Piura, habitando ambientes selváticos, aunque se han visto casos de colonización al hábitat domiciliar (Villacís *et al.*, datos no publicados). Por otra parte, en Ecuador se ha registrado su presencia en las provincias de El Oro y Loja, entre los 175 y los 2003 m.s.n.m. Suele colonizar el domicilio, encontrándose fácilmente bajo las camas y/o dentro de huecos en las paredes. De igual manera, puede ubicarse en el peridomicilio, hallándose fácilmente en gallineros, nidos de palomas o nidos de ratas. A pesar de que no se conoce su hábitat silvestre, en Venezuela se reportó en una localidad como *P. turpiali*, en el estado de Mérida, al oeste del país (Grijalva *et al.*, 2015; Mosquera *et al.*, 2016).

En cuanto a su morfología, *P. chinai* puede ser completamente negro y/o café. Además, el proceso escutelar es alargado y se encuentra afilado distalmente, a más de ser subcilíndrico. El largo total de su cuerpo puede estar entre los 22 y los 27 mm, el pronoto puede tener entre 5.5 y 7 mm de ancho y el abdomen puede ser de 11 a 12 mm de ancho

(Carcavallo *et al.*, 1997). Su tamaño desde el clípeo hasta la genitalia es de aproximadamente 23.19 mm en machos y 23.86 mm en hembras (Anexos 5 y 6).

3.2.2.2. *Panstrongylus howardi*

P. howardi es una especie endémica que se encuentra únicamente en la provincia de Manabí, en Ecuador. Aunque se ha reportado su presencia mayormente en el ambiente peridoméstico, específicamente asociado a nidos de roedores y marsupiales, se ha encontrado un registro en el ambiente selvático (Suarez-Dávalos *et al.*, 2010; Villacís *et al.*, datos no publicados). Grandes colonias de esta especie pueden estar escondidas entre pilas de ladrillos y madera, así como en bromelias conocidas con el nombre de “piñuelas” (*Aechmea magdalenae*) (Villacís *et al.*, 2015).

Por otro lado, *P. howardi*, tiende a tener un color café con anaranjado a rojizo, el segundo segmento rostral es más largo que el primero y su fémur carece de dentículos, pese a que tiene una pequeña protuberancia subapical. El tamaño del cuerpo puede estar entre los 25 y los 29 mm, el ancho del pronoto está entre los 6 y los 6.5 mm y el ancho del abdomen puede encontrarse entre los 8.5 y los 11mm (Carcavallo *et al.*, 1997). Su tamaño desde el clípeo hasta la genitalia es de aproximadamente 26.02 mm en machos y 27.02 mm en hembras (Anexos 5 y 6). Se piensa que *P. chinai* podría ser una forma melánica de *P. howardi*, ya que muestran varias similitudes a nivel morfológico (Patterson *et al.*, 2009).

3.3. LA MORFOMETRÍA: HISTORIA, CONCEPTOS BÁSICOS Y APLICACIONES

El análisis de la anatomía y la morfología permite evidenciar diferencias en las especies a nivel intra e interespecífico. Al inicio, el análisis era cualitativo, por lo que podía resultar subjetivo y no reflejar resultados cercanos a la realidad. En este sentido, la descripción se realizaba mediante términos poco específicos como “fusiforme”, “alargado”, “circular”. No obstante, a principios del siglo XX, el análisis cuantitativo causó una revolución en la Biología, dándole una herramienta objetiva que tendría un alcance inesperado para los científicos. De este modo, se define a la morfometría como “el estudio cuantitativo de la variación de las formas biológicas” (López, 2015). La

morfometría tradicional utilizaba datos como ángulos y distancias que se analizaban mediante estadística multivariada y generaba gráficos cuya interpretación era una tarea complicada. Además, los datos analizados por la morfometría tradicional no permiten remover los efectos de la escala y el tamaño, ni mantienen ciertas relaciones geométricas, esenciales para realizar comparaciones adecuadas (Benítez & Puschel, 2014).

De esta forma, a finales del siglo XX, nace la morfometría geométrica. Conforme a Bookstein, (1982), “es una fusión empírica de la Geometría con la Biología”, pues analiza la anatomía o morfología de los organismos a partir de un espacio geométrico y utiliza estadística multivariada para extraer información de interés biológico. Un concepto fundamental en morfometría es la forma, propiedad que, teóricamente, no está relacionada con el tamaño (López, 2015).

No obstante, la forma y el tamaño están íntimamente relacionados en la morfometría debido a que dos individuos de la misma especie y del mismo tamaño pueden tener formas diferentes (alometría) (López, 2015). En este contexto, las herramientas del análisis alométrico son la homología, que tiene que ver con cómo ciertas partes de un individuo se corresponden con las de otro individuo y la localización, que es la ubicación espacial en un eje de dos o tres dimensiones de dichas partes. Dentro de la localización, podemos mencionar que se usan dos variables: los *landmarks* y los *outlines*. Los *landmarks* (puntos de referencia) son sitios anatómicos, reconocibles entre individuos, que no cambian de posición con respecto a otros *landmarks*. Por otro lado, los *outlines* son el contorno de la forma en cuestión (López, 2015). Finalmente, las coordenadas representan la posición relativa de la forma de una configuración específica de *landmarks*. Esto permite observar una forma y su variación entre individuos en tiempo real (Dujardin, 2008).

El Análisis Generalizado de Procrustes (GPA) es una técnica de análisis multivariado que permite realizar transformaciones de matrices de datos mediante un criterio de mínimos cuadrados y facilitar una comparación óptima entre ellas. El nombre “Procrustes” se refiere a un personaje de la mitología griega que masacraba a quienes le visitaban, obligándolos a encajar perfectamente en una cama de hierro mediante la amputación de las extremidades que sobresalían o la ruptura de algunos huesos hasta que se estiraran lo suficiente. De esta forma, en el caso del GPA, una configuración

determinada de *landmarks* encaja dentro de otra. Además, las operaciones no alteran la forma y minimizan las diferencias entre las configuraciones que tienen el mismo número de coordenadas y *landmarks* (Zelditch *et al.*, 2004).

El GPA consiste en tres pasos: Primero, cada configuración de *landmarks* debe ser trasladada al origen de su centroide. Luego, de acuerdo al tamaño del centroide, las configuraciones se escalan. Finalmente, se rotan las configuraciones. El resultado que se espera es un conjunto de coordenadas que se proyectan en un plano Euclidiano. Esta aproximación permite observar las diferencias entre las distintas configuraciones y realizar los análisis estadísticos que toman en cuenta el tamaño y la forma (Romo, 2018).

Según Dujardin *et al.*, (2010), el tamaño del centroide es la raíz cuadrada de las distancias al cuadrado desde el centroide hasta un *landmark* y funciona como un estimador que evidencia cambios de tamaño en varias direcciones. Suele expresarse en píxeles.

Por otra parte, es importante diferenciar dos tipos de distancias utilizadas en el contexto de la morfometría: la distancia Euclidiana y la distancia de Mahalanobis. Mientras que la primera es, sencillamente, una línea dibujada entre dos puntos en un plano, la segunda es la medida entre un punto y una distribución (Dujardin *et al.*, 2010; Garza-Ulloa, 2018).

La morfometría se ha utilizado para diversas tareas dentro del marco de la dilucidación de las relaciones que existen entre las distintas especies de la subfamilia Triatominae. Por ejemplo, se utilizó análisis morfométrico para determinar la utilidad de las marcas hexacorales como un carácter diagnóstico de distintas especies del género *Triatoma* (Vallegas, 2001). También, se usaron principios de morfometría para comprobar el dimorfismo sexual en individuos de *P. herreri* (Ancca *et al.*, 2008). Adicionalmente, se aplicaron técnicas morfométricas para analizar la influencia ambiental en el desarrollo alar, característica que se encuentra estrechamente relacionada con la capacidad de dispersión de los triatominos (Menes, 2004).

Dentro del ámbito de la morfometría alar, el análisis de su arquitectura ha demostrado ser una herramienta de apoyo en estudios filogenéticos; así lo demuestra el

estudio de Soto-Vivas *et al.*, (2011), donde se cuestiona la monofilia del género *Rhodnius*, al cual pertenece un vector importante para el Ecuador, *Rhodnius ecuadoriensis*. Finalmente, un acercamiento al estudio de los distintos componentes de la dinámica poblacional también puede realizarse desde la morfometría, como son: distribución, variación, aislamiento, estructura y flujo génico (González, 2013).

En Ecuador, la morfometría se ha utilizado para realizar estudios tan variados como la caracterización de *Neoleucinodes elegantalis*, una plaga en los cultivos de naranjilla (Noboa, 2015) y la agilización del análisis de la diversidad de las abejas sin aguijón en las provincias de El Oro, Loja y Zamora (García *et al.*, 2015). Por otra parte, en cuanto al estudio de los triatomíneos se refiere, en el país, la morfometría ha sido de gran utilidad para diferenciar poblaciones y especies mediante el estudio de la forma de los huevos (Santillán-Guayasamín *et al.*, 2017).

De igual forma, ha permitido obtener mayor información sobre los vectores de la enfermedad de Chagas que poseen una alta importancia médica, como *Rhodnius ecuadoriensis*, en aquellas provincias del país donde constituyen un problema severo (Santillán, 2016) y ha demostrado ser una buena herramienta para tomar decisiones con respecto a la implementación de estrategias de control (Abad-Franch *et al.*, 2001). En este contexto, más específicamente, la morfometría alar en triatomíneos ha sido poco estudiada en el Ecuador, citando el análisis morfométrico de cuatro especies del género *Panstrongylus* realizado por Orozco, (2013) y la diferenciación de dos poblaciones geográficamente separadas de *Rhodnius ecuadoriensis* a través de morfometría de alas y antenas publicada por Villacís *et al.*, (2010) como los estudios más representativos.

3.3.1. MORFOMETRÍA Y SISTEMÁTICA

Las preguntas que plantea la sistemática pueden ser tratadas desde la morfometría. En este contexto, la taxonomía nos ayuda a diferenciar una especie de otra a través del análisis de las variables que permiten la discriminación más efectiva. Es necesario tomar en cuenta que las herramientas que ayudan a realizar el proceso de discriminación taxonómica no siempre son equivalentes a caracteres que informan acerca de la filogenética (Zelditch *et al.*, 2004)

La morfometría ya ha cuestionado los límites entre especies o la sinonimización de casos controversiales, especialmente en triatominos, arenillas y mosquitos. Algo común dentro del contexto de la variación es el hecho de que el nivel de variación interespecífica suele ser mucho mayor que el nivel de variación intraespecífica. Adicionalmente, los órganos escogidos para el análisis morfométrico suelen ser barreras reproductivas mecánicas y no otros órganos. Por otro lado, las especies no solo se diferencian en tamaño, sino también, e incluso más, en forma (Dujardin, 2008).

De acuerdo a Dujardin & Slice, (2006), Triatominae es un grupo con pocos problemas taxonómicos que puede beneficiarse de la morfometría, pues, a diferencia de Phlebotominae, los triatominos son insectos que carecen de caracteres cualitativos que permitan su discriminación (exceptuando los patrones de color). Por ejemplo, la diferenciación entre *Rhodnius robustus* y *Rhodnius prolixus*, una de las más confusas en la taxonomía de Triatominae, logró realizarse con éxito a través de análisis multivariado de tamaño y forma. La resolución de la metodología fue alta y permitió realizar una distinción entre especies a nivel de individuos (Dujardin & Slice, 2006).

3.3.2. LA IMPORTANCIA DE ESTUDIAR ALAS EN TRIATOMINAE

El análisis alar para diagnosticar especies es un método ampliamente utilizado en mosquitos; puesto que son estructuras casi bidimensionales y considerablemente rígidas, los errores provocados por la digitalización se ven reducidos al mínimo. Esto también es cierto para Triatominae. El método más utilizado se basa en *landmarks* y permite obtener información con respecto a forma y tamaño, permitiendo la visualización de cambios de forma. Es necesario considerar que unos pocos *landmarks* no describen por completo un ala, por lo que se debe escoger un número adecuado para lograr una buena resolución en los resultados (Garros & Dujardin, 2013).

En un estudio realizado por Dujardin *et al.*, (2007), la geometría alar se utilizó para asignar a un ala su línea parental correspondiente. En contraste con otros métodos empleados en el área de la morfometría, se utilizaron coordenadas en vez de distancias entre *landmarks*. Así, se obtuvieron tanto la distancia como la posición relativa de cada

uno, de manera que se visualizara la forma del ala. Este tipo de metodología permite obtener mayor información a través de un único procedimiento que abarca los resultados de la morfometría tradicional y la geométrica. Los resultados obtenidos mostraron que el uso de la morfometría alar puede ayudar a dilucidar los orígenes de una población, incluso a partir de un solo individuo.

3.4. JUSTIFICACIÓN

Por su eficiencia como vector, hábitos alimenticios, capacidad de encontrarse en el intradomicilio y estrategias para sobrevivir en ambientes creados por el ser humano, considero que la comparación entre *P. howardi* y *P. chinai* mediante el análisis morfométrico es un aporte importante para realizar avances en el proceso de erradicación de la enfermedad de Chagas que, al ser una enfermedad de la pobreza, no recibe la atención que merece por parte de los organismos de salud. En este contexto, es necesario señalar que el primer paso en el camino que lleva a erradicar una enfermedad es conocer bien a los integrantes del ciclo, de manera que se puedan desarrollar estrategias que sean capaces de atacar desde todos los frentes y lograr mejores resultados. Por ello, este estudio no sólo permitirá tener más elementos de juicio al momento de proponer mejores planes de acción para controlar al vector, sino que también brindará nuevo conocimiento en un área poco estudiada en el Ecuador como es la morfometría.

3.5. OBJETIVOS

3.5.1. OBJETIVO GENERAL

- Comparar morfométricamente las alas de individuos híbridos de *P. chinai* y *P. howardi*.

3.5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si existe o no diferencia en el tamaño de las alas de los individuos híbridos con respecto a los parentales.

H1: El tamaño de las alas de los individuos híbridos es distinto del tamaño de las alas de los parentales.

H0: El tamaño de las alas de los individuos híbridos no es distinto del tamaño de las alas de los parentales.

- Determinar si existe o no diferencia en la forma de las alas de los individuos híbridos con respecto a los parentales.

H1: La forma de las alas de los individuos híbridos es diferente de la forma de las alas de los parentales.

H0: La forma de las alas de los individuos híbridos no es diferente de la forma de las alas de los parentales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio fue realizado con muestras que provenían de dos provincias del Ecuador: Loja y Manabí. Los insectos se encontraban almacenados en tubos Eppendorf con alcohol al 70% y fueron tomados de la base de datos del Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL). En el caso de Loja, las colecciones provenían de las localidades: Ashimingo (AH), Bella María (BM), Bramaderos (BR), Chaquizca (CQ), Coamine (CE), La Extensa (EX), Guara (GA), El Huayco (HY), Naranjillo (NJ), Tacoranga (TC) y Vega del Carmen (VC). En contraste, las de Manabí fueron colectadas en las localidades: Bejuco (BJ), La Ciénega (CN), Maconta Abajo (MB) y Pimpiguasí (PI) (Figura 1, Tabla 1).

4.1.1 LOJA

La provincia de Loja se encuentra ubicada a 3° 49' 58.8" de latitud Sur, 80° 4' 1.2" de longitud Oeste (GeoHack, 2018). La provincia tiene un relieve considerablemente irregular; su altitud va desde los 700 a los 3 700 m.s.n.m. y las cordilleras montañosas que atraviesan la región moldean su clima (Municipio de Loja, 2018). Así, la temperatura media anual está entre los 15.4 y los 26.6°C y las precipitaciones a lo largo de la provincia están en un rango que va de los 0.2 a los 188.9 mm anuales (INHAMI, 2017).

Por otra parte, la provincia de Loja ocupa el decimosegundo puesto en importancia económica para el Ecuador. Entre el 2002 y el 2007, su crecimiento promedio alcanzó el 3.67%. En este contexto, en el año 2007, la ciudad que más PIB generó fue su capital, con el 1.9% de aporte al total nacional (GPL, 2011). Loja es principalmente agrícola y ganadera, con el 61% de sus tierras dedicadas a estas actividades. Los productos más cultivados son el maíz, la caña de azúcar, el café y el arroz. La provincia maneja un modelo agrícola basado en la combinación de cultivos transitorios y permanentes. Otras actividades comprenden: la construcción, el comercio, las comunicaciones, la minería y la cerámica (Riofrío, 2007) (GPL, 2011).

4.1.2 MANABÍ

La provincia de Manabí está ubicada a 1° 3' 7.99" Sur, 80° 27' 2.16" Oeste (GeoHack, 2018). A pesar de que su relieve es poco accidentado, la mayoría de elevaciones no sobrepasan los 500 m (GPM, 2016). Por otra parte, la temperatura media anual oscila entre los 20.3 y los 26.6°C. Además, la precipitación puede rondar los 0.2 y llegar hasta los 424.7 mm anuales (INHAMI, 2017).

De acuerdo a datos del MCPEC (Ministerio Coordinador de Producción, Empleo y Competitividad), Manabí es una de las provincias con mayor aporte a la economía del país (El Telégrafo, 2016). Esta provincia costera es la más agrícola del Ecuador, pues el 84% de sus tierras son utilizadas para el cultivo de productos como la caña de azúcar, el plátano y la palma africana (El Telégrafo, 2016) (La Hora, 2011). Por otro lado, la pesca, la segunda actividad económica más importante para los manabitas, generó el 7% del PIB (Producto Interno Bruto) en el año 2010 (El Telégrafo, 2016).

Empresas como La Fabril o Conservas Isabel tienen sus fábricas en la ciudad de Manta y proporcionan trabajo a un total de 2 800 personas. La industria manufacturera manabita genera aproximadamente \$405 millones de dólares al año y abarca el 70% de la capacidad de producción nacional (El Telégrafo, 2016) (Tirado, 2013).

4.2 TIPO DE CONSTRUCCIÓN DE VIVIENDAS

En cuanto al tipo de construcción, las provincias muestran materiales y técnicas que responden al clima y estilo de vida de los habitantes. En la provincia de Loja, las paredes de las casas se fabrican principalmente de adobe, los pisos son de tierra y para los techos se utilizan tejas de cerámica (Villacís *et al.*, datos no publicados). Por otro lado, en la provincia de Manabí, los pisos y paredes de las casas se fabrican con caña guadúa (*Guadua angustifolia*) o madera. Además, los techos pueden estar contruidos con las frondas de las palmas mediante procesos artesanales o con placas de zinc.

Sin embargo, algunas casas han sido construidas a través de programas de vivienda con el apoyo del MIDUVI, que no siempre utiliza materiales de la zona, ni

permite la participación activa del propietario en la construcción. Este aporte es esencial para que las casas respondan a las necesidades específicas de cada lugar. Tanto en Loja como en Manabí las casas hechas por el MIDUVI se fabrican a partir de ladrillo y bloque, con un techo de zinc o eternit (fibro-cemento) (Baus, 2015).

Pese a que podría parecer que las casas construidas por el MIDUVI son más cómodas que las casas tradicionales, en realidad, muchas personas prefieren vivir en sus casas “viejas” y poner a los animales a vivir en las casas “nuevas”. Esto se debe principalmente a que las casas “nuevas” son mucho más calientes que las casas tradicionales (Baus, 2015). Además, los materiales de las casas “viejas” son relativamente fáciles de conseguir y las personas pueden participar activamente de su construcción, lo que les brinda una sensación de satisfacción el poder aportar con su propio esfuerzo. Lastimosamente, a pesar de sus beneficios, las viviendas tradicionales no están construidas con criterios técnicos ni de salud, por lo que facilitan la colonización del vector de la enfermedad de Chagas y pone en peligro a sus habitantes (Baus, 2015).

4.3 COLECCIÓN DE LOS INDIVIDUOS PARENTALES Y CRUCES PARA OBTENCIÓN DE INDIVIDUOS HÍBRIDOS

Los individuos híbridos que se utilizaron para este proyecto se tomaron de un experimento de cruces realizado en los años 2015 y 2017. Los parentales originales provienen de una colección realizada en 7 comunidades de Loja (Bella María, Bramaderos, Chaquizca, Guara, El Huayco, Tacoranga y Vega del Carmen) y una comunidad de Manabí (Bejuco) (Tabla 1). Las colecciones de los individuos de Loja se hicieron en los años 2006, 2008, 2009, 2010 y 2011, mientras que la colección de la provincia de Manabí se hizo en el año 2007. Los triatominos fueron colectados bajo los permisos N° 002-07 IC-FAU-DNBAPVS/MA, No.006- RM-DPM-MA, N° 006-IC-FLO-DPL-MA, No.008- RM-DPM-MA, N° 008-IC-INSEC-DPL-MA, No.010-IC-FAU-DNBAPVS/MA y N° 016-07 IC-FAU-DNBAPVS/MA.

Se realizó un total de nueve cruces híbridos, donde cinco de ellos consistieron en colocar una hembra de *P. chinai* con dos machos de *P. howardi*, mientras que los cuatro cruces restantes se hicieron con una hembra de *P. howardi* y dos machos de *P. chinai*.

Lastimosamente, se encontraron varios problemas al momento de conseguir un número adecuado de machos *P. howardi*, por lo que la cantidad de cruces control no fue proporcional. Así, se realizaron cruces control, con veinticuatro cruces para *P. chinai* y cuatro para *P. howardi*. Cada uno de estos cruces se realizó colocando dos hembras con tres machos. Tómese en cuenta que el protocolo utilizado para la alimentación de los triatominos, que se realizó con palomas inmovilizadas por 30 minutos (15-H-034), se encuentra aprobado por el IACUC y las colecciones realizadas en las distintas comunidades en varios años tienen los permisos correspondientes otorgados por el MAE.

4.4 SELECCIÓN DE MUESTRAS

Tanto los individuos de las especies parentales como los individuos híbridos fueron tomados de la colección de triatominos de la Unidad de Entomología Médica del CISEAL. Se utilizó un total de 277 individuos para el estudio, de los cuales, 92 eran *P. chinai* provenientes de la provincia de Loja, 83 eran *P. howardi* colectados en la provincia de Manabí y 102 eran individuos híbridos criados en condiciones de laboratorio (Tabla 1). Los análisis se realizaron únicamente con las alas derecha de machos y hembras adultos de cada grupo (Figura 2 y 3).

4.5 MEDICIÓN DEL LARGO DEL CUERPO

Para obtener los datos del largo del cuerpo mostrados en la descripción de cada especie en la sección INTRODUCCIÓN, se utilizó un calibrador MITUTOYO y se midió la distancia en mm desde el clípeo hasta la genitalia de un total de 60 individuos (15 machos y 15 hembras por especie). Luego, se procedió a calcular el promedio (Anexo 6).

4.6 PREPARACIÓN DEL MEDIO HOYER

Para el montaje de alas se utilizó el medio Hoyer, una solución que ayuda a limpiar tejidos y a aumentar su visibilidad debido a su alto índice de refracción. Adicionalmente, se conoce que puede ayudar a mantener intacta una muestra biológica durante más de veinte años (Romo, 2018) (Anexo 7).

4.7 CAPTURA DE FOTOGRAFÍAS

La captura de imágenes se realizó mediante los programas IrfanView (v. 4.38) y DP2-TWAIN (v. 7.1). Asimismo, se utilizó el estereoscopio OLYMPUS SZX7 y una cámara OLYMPUS SC100. Se trabajó con un acercamiento de 0.8X (Anexo 8).

4.8 EDICIÓN DE FOTOGRAFÍAS

Dado que las venas de las alas de varios individuos eran difíciles de visualizar, se utilizó el programa Adobe Photoshop Lightroom para editar algunos atributos de la iluminación en las imágenes con el fin de evitar errores durante la digitalización y los análisis estadísticos en XYOM (Anexo 9).

4.9 UTILIZACIÓN DEL SOFTWARE XYOM

El programa que se utilizó para realizar el análisis morfométrico fue XYOM (XY Online Morphometrics, por sus siglas en inglés), un software de acceso libre y completamente en línea que permite seguir intuitivamente el flujo de trabajo para el análisis morfométrico. XYOM no solo posee una interfaz moderna y amigable con el usuario, sino que, al ser una plataforma online, evita problemas de compatibilidad y no requiere de actualizaciones, instalación ni configuración. Adicionalmente, trabaja de la mano con la plataforma Google Drive, donde se puede almacenar la información necesaria para trabajar con los distintos módulos. Este software ha sido aplicado en campos como la morfometría tradicional y la morfometría geométrica, estrechamente relacionada con la entomología médica (Dujardin & Dujardin, 2019).

La plataforma posee 6 módulos que utilizan una gran diversidad de complejos algoritmos:

a.- DIGITALIZACIÓN: Permite obtener las coordenadas de *landmarks*, *semilandmarks* y *pseudolandmarks* en distintos formatos para su posterior análisis (Dujardin & Dujardin, 2019). Para mayor información sobre cómo trabajar con el módulo de DIGITALIZACIÓN, ver Anexo 10.

b.- CARACTERIZACIÓN: Engloba aquellos estadísticos que generan datos de tamaño y forma a partir de *landmarks* y *pseudolandmarks*, tales como el GPA (Análisis Generalizado de Procrustes), PCA (Análisis de Componentes Principales) y DA (Análisis Discriminante). Los archivos obtenidos de los análisis de este módulo son la base para trabajar en la sección de clasificación (Dujardin & Dujardin, 2019).

c.- CLASIFICACIÓN: Este módulo presenta análisis que pretenden evidenciar la estructura de los datos una vez caracterizados y la relación que se observa entre individuos o grupos. Pueden obtenerse clasificaciones validadas basadas en el índice de máxima verosimilitud o en las distancias de Mahalanobis y árboles de clasificación (Dujardin & Dujardin, 2019). Para mayor información sobre cómo trabajar con los módulos de CARACTERIZACIÓN y CLASIFICACIÓN, ver Anexo 11.

d.- IDENTIFICACIÓN: Sirve para clasificar especímenes cuya identidad es desconocida o de los que el usuario no está seguro, todo a partir de datos obtenidos de especímenes de referencia (Dujardin & Dujardin, 2019).

e.- ASIMETRÍA: Es útil para obtener datos con respecto a la simetría o asimetría de la forma y el tamaño, aunque se encuentra restringido únicamente a *landmarks* (Dujardin & Dujardin, 2019).

f.- MISCELÁNEOS: Abarca análisis de disparidad métrica, covarianza, comparaciones entre matrices y alometría (Dujardin & Dujardin, 2019).

4.10 PUNTOS DE REFERENCIA

Se digitalizó un total de 8 puntos de referencia para el análisis del tamaño y la conformación alar. Se utilizaron puntos de intersección entre nervaduras (Figura 4).

4.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

A fin de cumplir con los objetivos planteados, el análisis de datos se separó en análisis de tamaño y conformación, tanto a nivel interespecífico como intraespecífico.

4.11.1 TAMAÑO

Con el objeto de evidenciar las similitudes y diferencias en el tamaño de las alas entre los grupos, se realizó un análisis generalizado de Procrustes (GPA). Las comparaciones se realizan mediante un ANOVA de una sola vía dentro de programa y se representan gráficamente como un diagrama de caja (boxplot) en XYOM (Dujardin & Dujardin, 2019). Adicionalmente, se usó un ANOVA para saber si las diferencias entre grupos con respecto al tamaño alar son estadísticamente significativas (Searle *et al.*, 2006).

4.11.2 CONFORMACIÓN

Para analizar las diferencias en la conformación de las alas entre grupos, se utilizaron algunos resultados derivados del análisis generalizado de Procrustes (GPA). Se obtuvieron las varianzas de la forma y las significancias al comparar entre grupos. También se exportaron los gráficos de los *landmarks* rotados (Rotated Landmarks, tercer paso del GPA) y la media de los objetos (Mean Objects); estos gráficos ayudan a observar aquellas áreas que van a presentar la mayor cantidad de cambios entre grupos (Dujardin & Dujardin, 2019).

Por otra parte, se usó el análisis discriminante, el cual se encarga de evidenciar diferencias entre grupos mediante el contraste de muchas variables (Vallejo, 1992). Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), que permite entender la estructura de los datos haciendo combinaciones entre varianzas y covarianzas (Hernández, 1998). Ambos análisis se exportaron desde XYOM como gráficos que evidencian el solapamiento o separación entre los grupos estudiados con respecto a la conformación de las alas (Dujardin & Dujardin, 2019).

Adicionalmente, se tomó el archivo “PCs”, proveniente del análisis de componentes principales, con miras a obtener el análisis de clasificación validada basado en el índice de máxima verosimilitud (CCCMLi) y el basado en la distancia de Mahalanobis (CCCMaha). En otras palabras, muestran qué porcentaje de los individuos fue clasificado correctamente dentro del grupo al que, de acuerdo a los datos ingresados, deberían pertenecer (reclasificación).

Finalmente, usando como base el archivo “ED” (Distancias Euclidianas) del PCA, se construyó un dendrograma, que permite clasificar los grupos de acuerdo a su similitud conformacional (Dujardin & Dujardin, 2019).

5. RESULTADOS

5.1 TAMAÑO

Para contestar el primer objetivo, respecto al tamaño alar inter e intraespecífico, se desglosó de la siguiente manera:

5.1.1 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE *Panstrongylus chinai*, *P. howardi* e híbridos

Al comparar el tamaño del ala (CS) derecha a nivel de especie, la Figura 5 y la Tabla 2 evidenciaron que el tamaño del centroide de los individuos *P. howardi* fue el mayor, seguido por *P. chinai* y este, a su vez, por los híbridos. Además, como se observa en la Tabla 3, las diferencias entre las varias combinaciones fueron, en mayor o menor medida, significativas (ANOVA, $p < 0.05$). Así, el valor p , al contrastar el tamaño del centroide entre *P. chinai* y los individuos híbridos, fue mayor que la comparación entre *P. howardi* y los híbridos. Por tanto, existe mayor cercanía entre *P. chinai* y los híbridos que entre estos últimos y *P. howardi* en cuanto al tamaño del ala se refiere.

5.1.2 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE *Panstrongylus chinai*, *P. howardi* e híbridos PARA MACHOS Y HEMBRAS

Tanto los machos como las hembras *P. howardi* evidenciaron un tamaño del ala (CS) considerablemente mayor que el de *P. chinai*, con los híbridos como el grupo con el menor tamaño en el análisis (Figura 6, Figura 7, Tabla 2).

Este hecho se ve respaldado por los datos de la Tabla 3, donde se observó que existen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p < 0.05$), tanto al comparar los tres grupos de cada nivel, como al confrontar cada uno. Puesto que el valor p entre *P. chinai* y los individuos híbridos fue menor que aquel entre *P. howardi* y los híbridos, estos últimos presentan más cercanía con *P. chinai* que con *P. howardi* para el tamaño del ala derecha en machos y hembras.

5.1.3 VARIACIÓN INTRASPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE SEXOS POR ESPECIE

5.1.3.1 DIMORFISMO SEXUAL DE *P. chinai*

Como se puede ver en la Figura 8 y en la Tabla 2, las hembras *P. chinai* tuvieron un mayor tamaño alar (CS) que los machos. Por otro lado, existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (ANOVA, $p < 0.05$) (Tabla 3). En consecuencia, existe un dimorfismo sexual marcado con respecto al tamaño del ala.

5.1.3.2 DIMORFISMO SEXUAL DE *P. howardi*

Tanto la Figura 8 como la Tabla 2 sugieren que las hembras *P. howardi* manifestaron un tamaño alar (CS) mayor que los machos. Igualmente, la Tabla 3 enseña que el contraste de sexos mostró diferencias significativas (ANOVA, $p < 0.05$), aunque sin la misma fuerza estadística que el caso de *P. chinai* (ANOVA, $p = 0.013$).

5.1.3.3 DIMORFISMO SEXUAL DE LOS HÍBRIDOS

La Figura 8 y la Tabla 2 dan a entender que las hembras híbridas poseen un tamaño del ala derecha (CS) mayor que el de sus compañeros machos. Además, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre machos y hembras (ANOVA, $p < 0.05$) (Tabla 3). No obstante, es necesario mencionar que la significancia parecería estar muy cerca del límite donde machos y hembras tendrían el mismo tamaño alar (CS) (ANOVA, $p = 0.046$).

5.2 CONFORMACIÓN (FORMA)

Para contestar el segundo objetivo, respecto a la conformación alar inter e intraespecífica, se desglosó de la siguiente manera:

5.2.1 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE *Panstrongylus chinai*, *P. howardi* e híbridos

El PCA obtenido en el gráfico de la Figura 9 demuestra un claro solapamiento en la conformación alar entre los tres grupos que conforman la clasificación por especies. Específicamente, el dendrograma de la Figura 13 indica que existe una relación más cercana con respecto a la conformación alar entre *P. chinai* y los híbridos que entre estos últimos y *P. howardi*. Además, la Tabla 4 aclara que tanto las distancias euclidianas (ED) como las de Mahalanobis (MD) señalaron una mayor relación (distancias más cortas) entre *P. chinai* y sus híbridos que con los últimos y *P. howardi*.

Por otra parte, tal como evidencia la Tabla 5, la reclasificación validada de especies mostró el mayor rendimiento del estudio; precisamente, a través de máxima verosimilitud (CCCMI), tuvo un menor rendimiento promedio (79.51%) que aquella basada en la distancia de Mahalanobis (CCCMaha) (84.33%).

Así, el grupo mejor reclasificado fue *P. chinai* (CCCMI: 90.22% y CCCMaha: 88.04%), seguido por *P. howardi* (CCCMI: 69.88% y CCCMaha: 85.54%), finalizando con los individuos híbridos (CCCMI: 78.43% y CCCMaha 79.41%). Se vio que solo *P. chinai* fue mejor reclasificado mediante máxima verosimilitud (CCCMI) que a través de la distancia de Mahalanobis (CCCMaha) (Tabla 5).

5.2.2 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE *Panstrongylus. chinai*, *P. howardi* e híbridos PARA MACHOS Y HEMBRAS

Al observar el PCA de la Figura 10, se deduce que existe solapamiento entre especies a nivel de machos en relación a la conformación alar. Lo mismo sucede para las hembras de cada especie (Figura 11). En los dendrogramas de las Figuras 14 y 15 se probó que, tanto a nivel de machos como de hembras entre especies, la conformación alar de *P. chinai* fue más cercana a la de los híbridos de lo que lo fue entre los híbridos y los *P. howardi*.

Con respecto a las distancias euclidianas (ED) y de Mahalanobis (MD), los machos expresaron una mayor cercanía entre los individuos *P. chinai* y los híbridos que entre estos últimos y los *P. howardi*. No obstante, con el grupo de las hembras ocurrió algo distinto; las distancias euclidianas (ED) indicaron más cercanía entre *P. chinai* y las híbridas, en tanto, distancias de Mahalanobis (MD) manifestaron mayor relación entre *P. howardi* y las híbridas (Tabla 4).

Por otro lado, en la Tabla 5, la reclasificación validada de machos a nivel de especies mostró un rendimiento del 80.28% para el análisis de máxima verosimilitud (CCCMli), menor que el basado en la distancia de Mahalanobis (CCCMaha), que fue del 82.77%.

De esta manera, el grupo mejor reclasificado fue *P. chinai* (CCCMli: 92.59% y CCCMaha: 85.19%), le sigue *P. howardi* (CCCMli: 74.47% y CCCMaha: 89.36%), terminando con los híbridos (CCCMli: 73.77% y CCCMaha: 73.77%). Mientras que la reclasificación se dio de mejor forma utilizando máxima verosimilitud (CCCMli) solo para *P. chinai*, lo contrario ocurrió para *P. howardi* y no existió diferencia cuando se comparó cada prueba entre los híbridos (Tabla 4).

En contraste, en la Tabla 5, la reclasificación validada de hembras a nivel de especies evidenció, para el análisis de máxima verosimilitud (CCCMli), un rendimiento (71.11%) menor que el basado en la distancia de Mahalanobis (CCCMaha) (80.89%).

Por consiguiente, el grupo mejor reclasificado fue *P. chinai* (CCCMli: 71.05% y CCCMaha: 86.84%), le sigue *P. howardi* (CCCMli: 66.67% y CCCMaha: 77.78%), y finaliza con los híbridos (CCCMli: 75.61% y CCCMaha: 78.05%). En este caso, la mejor reclasificación siempre se dio mediante el análisis basado en la distancia de Mahalanobis.

En general, los machos fueron mejor reclasificados mediante ambos métodos que las hembras.

5.2.3 VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE SEXOS POR ESPECIE

Es menester recalcar que las distancias euclidianas (ED), a este nivel, muestran una mayor relación entre *P. chinai* y los híbridos; un hecho que contrasta con las distancias de Mahalanobis (MD), que agrupan a los *P. howardi* con los híbridos (Tabla 4).

La Tabla 5 señala que la reclasificación validada dio los porcentajes promedio más bajos al realizar la comparación entre sexos por especie (CCCMI: 47.06% y CCCMaha: 51.73%).

De acuerdo a los reportes del GPA (Análisis Generalizado de Procrustes) obtenidos mediante ANOVA en lo que se refiere a la conformación alar, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ningún grupo a nivel de especies, sexos, machos ni hembras.

5.2.3.1 DIMORFISMO SEXUAL DE *P. chinai*

La Figura 12, que muestra la gráfica de un PCA a nivel de sexo entre especies, informa que hay solapamiento entre machos y hembras *P. chinai* respecto a la conformación alar. No obstante, el dendrograma de la Figura 16 indica que existe mayor cercanía entre *P. chinai* y los híbridos que entre estos y *P. howardi* en relación a la forma del ala.

Adicionalmente, las distancias euclidianas (ED) y de Mahalanobis (MD) (Tabla 4) evidencian que existe una mayor relación entre machos y hembras de la misma especie que entre machos y hembras de *P. chinai* e híbridos respectivamente.

En el caso de la reclasificación validada (Tabla 5) los machos fueron mejor reclasificados a través del análisis basado en máxima verosimilitud (CCCMI: 81.48% y CCCMaha: 64.81%) que las hembras, quienes fueron mejor reclasificadas a través de la distancia de Mahalanobis (CCCMI: 35.84% y CCCMaha: 60.53%).

5.2.3.2 DIMORFISMO SEXUAL DE *P. howardi*

En el análisis de *P. howardi*, la Figura 12 apunta a que hay un claro solapamiento entre machos y hembras respecto a la conformación alar. Empero, el dendrograma de la Figura 16 indica que existe mayor cercanía entre *P. chinai* y los híbridos que entre estos y *P. howardi* para la forma del ala.

Luego, las distancias euclidianas (ED) y de Mahalanobis (MD) (Tabla 4) indican que existe una mayor relación entre machos y hembras de la misma especie que entre machos y hembras de *P. chinai* e híbridos respectivamente. Tal resultado evidencia que no existió error al momento de clasificar cada sexo adecuadamente dentro de la especie a la que pertenecía.

En cuanto a la Tabla 5 se refiere, la reclasificación validada manifiesta que los machos fueron mejor reclasificados a través del análisis basado las distancias de Mahalanobis (CCCMI: 25.53% y CCCMaha: 55.32%) que las hembras, siendo mejor reclasificadas a través del análisis de máxima verosimilitud (CCCMI: 47.22% y CCCMaha: 33.33%).

5.2.3.3 DIMORFISMO SEXUAL DE LOS HÍBRIDOS

En la Figura 12, se puede observar que el PCA indica solapamiento entre machos y hembras híbridos respecto a la conformación alar. Sin embargo, el dendrograma de la Figura 16 demuestra que existe mayor cercanía entre *P. chinai* y los híbridos que entre estos y *P. howardi*.

En suma, para las distancias euclidianas (ED) y de Mahalanobis (MD), hay una mayor relación entre machos y hembras de la misma especie que entre machos y hembras de *P. chinai* o *P. howardi* e híbridos (Tabla 4).

En el caso de la Tabla 5, que muestra los resultados de la reclasificación validada (nivel sexo), los machos híbridos fueron mejor reclasificados a través del análisis basado

en la distancia de Mahalanobis (CCCMli: 27.87% y CCCMaha: 57.38%) que las hembras, quienes fueron mejor reclasificadas a través del análisis de máxima verosimilitud (CCCMli: 63.41% y CCCMaha: 39.02%).

6. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas ha perseguido a los habitantes de Sudamérica desde hace 9000 años y, pese a que la ciencia y la tecnología han avanzado a pasos agigantados en los últimos dos siglos, las condiciones de vida de muchas personas en la actualidad no son muy diferentes a las de los individuos de culturas como la Chinchorro o la Wankarani (Aufderheide *et al.*, 2004). En gran parte, ni los materiales, ni la construcción de las viviendas de las personas más pobres de las provincias de Loja y Manabí han cambiado radicalmente (Villacís *et al.*, datos no publicados). Cuando a la fórmula se añade la invasión agresiva de los ambientes selváticos por parte del ser humano, una agricultura que depende excesivamente de plaguicidas que interrumpen las interacciones depredador-presa y la poca organización de los organismos de control para educar a la gente con respecto al peligro que supone la enfermedad, la receta para el desastre está completa (Chuit *et al.*, 2017). Este trabajo representa un nuevo paso en la investigación de la enfermedad de Chagas y la entomología médica en el Ecuador. De esta manera, se ofrece uno de los primeros análisis de morfometría alar en individuos híbridos del género *Panstrongylus* y una guía detallada para entender el flujo de trabajo en morfometría geométrica a través del uso de varios programas informáticos.

La morfometría es una herramienta esencial en la entomología médica puesto que permite resolver problemas de identificación y detección de especies. Además, ha sido de mucha utilidad en estudios de reinfestación y estructura poblacional. Por otra parte, es un método relativamente sencillo y barato de aplicar en programas de control, a más de brindar una gran cantidad de información con respecto al origen de una población a partir de un único individuo (Dujardin *et al.*, 2007).

Tanto el tamaño como la forma ayudan a entender las similitudes y diferencias entre grupos. Se debe tomar en cuenta que, si bien el tamaño es un carácter que permite la discriminación, la forma tiene mayor resolución y es menos propensa a los efectos de la variación ambiental. Así, una correcta distinción no solo requiere de diferencias estadísticamente significativas, sino también poco solapamiento entre los grupos analizados (Garros & Dujardin, 2013).

6.1 TAMAÑO

6.1.1 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE *Panstrongylus chinai*, *P. howardi* e híbridos

Los resultados indican que *P. howardi* es la especie que muestra el mayor tamaño alar (CS), seguido por *P. chinai* y los híbridos. Como mencionan Carcavallo *et al.*, (1997), dicha relación de tamaño entre las especies parentales (*P. chinai* y *P. howardi*) también es cierta para el largo del cuerpo. Por otra parte, de acuerdo a datos de Orozco, (2013), *P. howardi* evidencia un tamaño de alas y cabeza mayor que *P. chinai*. Pese a que a simple vista podría parecer que los boxplots no indican una relación entre los híbridos y sus parentales, los resultados del ANOVA ($p < 0.05$) señalan que el tamaño alar es más cercano al de *P. chinai* que al de *P. howardi*. Esta información coincide con datos de Villacís *et al.*, (datos no publicados), quienes mencionan que, a simple vista, el tamaño de los individuos híbridos se parece más a *P. chinai* que a *P. howardi*. Dicho patrón puede observarse también en las Figuras 2 y 3. Adicionalmente, Dujardin *et al.*, (1999) sugieren que, a medida que pasan las generaciones, los triatominos criados en laboratorio muestran una importante reducción de tamaño, probablemente debido al hecho de que existe mayor probabilidad de supervivencia de los individuos más pequeños.

Acorde con información recabada por Dujardin, (2011), el tamaño del centroide (CS) en híbridos obtenidos a partir del cruce entre *Triatoma brasiliensis* y *Triatoma juazeirensis* (consideradas inicialmente subespecies) aumentó, siendo incluso mayor que los individuos parentales más grandes. Adicionalmente, se observó una relación lineal entre la divergencia de los individuos parentales y el aumento en tamaño de sus descendientes híbridos. Así, si seguimos el mismo principio y tomamos en cuenta que los híbridos del presente estudio mostraron un tamaño inferior (CS) al de sus parentales, podría sugerirse que la divergencia entre los individuos parentales (*P. chinai* y *P. howardi*) no es considerablemente grande.

Por otro lado, en un estudio realizado con colonias de laboratorio de *Triatoma protracta* y varias subespecies del género, se observó que los individuos híbridos mostraban un tamaño intermedio (CS) con respecto a los parentales. De esta manera,

Dujardin, (2011), indica que los híbridos de especies distintas, pero filogenéticamente cercanas, podrían mostrar un aumento de tamaño en algunos caracteres fenotípicos. En contraste, nuestros individuos híbridos fueron más pequeños que sus parentales; consecuentemente, siguiendo este patrón, *P. chinai* y *P. howardi* estarían filogenéticamente distanciadas, lo que sugeriría una importante divergencia entre ambas especies.

6.1.2 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE *Panstrongylus chinai*, *P. howardi* e híbridos PARA MACHOS Y HEMBRAS

Los datos demuestran que, al separar el análisis por sexos, tanto machos como hembras *P. howardi* muestran un mayor tamaño alar (CS) que *P. chinai* y los híbridos. De igual forma, aun cuando el ANOVA ($p < 0.05$) evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, la cercanía en el tamaño del ala (CS) entre los híbridos y los individuos *P. chinai* es mayor que con *P. howardi*. Los análisis de Orozco, (2013) indican que la relación antes mencionada también se aplica en el caso del tamaño de las cabezas, con diferencias marcadas entre las especies parentales (*P. chinai* y *P. howardi*).

6.1.3 VARIACIÓN INTRASPECÍFICA DEL TAMAÑO ALAR ENTRE SEXOS POR ESPECIE

Nuestros resultados señalan que las hembras poseen un mayor tamaño alar que los machos. Este dato concuerda con información brindada por Lent & Wygodzinsky, (1979), quienes indican que, en promedio, las hembras de triatominos tienden a ser más grandes que los machos. Además, existen diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras con respecto al tamaño alar, probando la presencia de dimorfismo sexual en cada grupo (*P. chinai*, *P. howardi* e híbridos). Sin embargo, es preciso aclarar que los valores de p obtenidos mediante ANOVA para *P. howardi* ($p = 0.013$) y, especialmente los híbridos ($p = 0.046$), estarían muy cerca del punto en que el dimorfismo sexual no existe. En contraste, los estudios de Ancca *et al.*, (2008) y Orozco, (2013) demuestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en el tamaño alar (CS) entre

machos y hembras de *P. chinai*, *P. howardi*, y *P. herreri*. Asimismo, el análisis morfométrico de Villacís *et al.*, (datos no publicados), indica que el dimorfismo sexual para el tamaño de alas no fue estadísticamente significativo en *P. chinai* y *P. howardi*.

Según Ancca *et al.*, (2008), el dimorfismo sexual del tamaño es un rasgo que brinda información esencial sobre el modo de vida de los triatominos y debería ser un factor a tomar en cuenta en estudios que busquen entender el proceso de adaptación del vector a ambientes domésticos. En nuestro caso, es necesario mencionar que la mayor parte de los individuos pertenecientes a especies parentales (*P. chinai* y *P. howardi*) utilizados en este estudio fueron colectados en el ambiente intradomiciliar y peridomiciliar, mientras que los individuos híbridos fueron criados completamente en el laboratorio. Soto-Vivas *et al.*, (2007) mencionan que los especímenes que habitan el ambiente domiciliar suelen presentar una reducción en su dimorfismo sexual con respecto a aquellos individuos capturados en el ambiente selvático.

Probablemente, este hecho pueda deberse a que las poblaciones del ambiente domiciliar y el laboratorio alcanzarían su capacidad de carga más rápidamente que las del ambiente selvático. Consecuentemente, cada individuo obtendría menos sangre por ingesta, lo que causaría un aumento en la probabilidad de supervivencia de los individuos más pequeños. Si se considera que las hembras tienen mayores requerimientos nutricionales debido a la producción de gametos con altas demandas energéticas (Fairbairn, 2013), este fenómeno las afectaría en mayor medida que a los machos en virtud de que, además, son más grandes que ellos. De esta forma, con el pasar del tiempo, individuos cada vez más pequeños sobrevivirían y el tamaño promedio de la población disminuiría. Finalmente, el tamaño de las hembras se acercaría cada vez más al de los machos hasta que las diferencias a nivel de dimorfismo sexual del tamaño no sean estadísticamente significativas (Dujardin *et al.*, 1999).

6.2 CONFORMACIÓN (FORMA)

6.2.1 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE *Panstrongylus chinai*, *P. howardi* e híbridos

Los datos obtenidos mediante PCA en este estudio muestran evidencia de una relación considerablemente cercana entre *P. chinai*, *P. howardi* y los híbridos para su conformación alar. Esta información concuerda con Orozco, (2013), cuyos hallazgos sobre la conformación de alas y cabezas en *P. chinai* y *P. howardi* sugiere una clasificación similar al comparar con otras especies de triatomos. En consecuencia, menciona la posibilidad de que su separación se diera mediante especiación alopátrica.

Empero, al enfocar el análisis únicamente en *P. chinai* y *P. howardi*, dicho autor afirma que las similitudes no son suficientemente contundentes a nivel estadístico como para llegar a la conclusión de que son una misma especie. Asimismo, Villacís *et al.*, (datos no publicados), encontró que existen diferencias significativas en la conformación alar entre *P. chinai* y *P. howardi*. En contraste, nuestros resultados podrían reforzar la hipótesis de que *P. chinai* es, efectivamente, una forma melánica de *P. howardi* (Patterson *et al.*, 2009). Sin embargo, si bien es esperable encontrar diferencias de forma entre especies, también pueden encontrarse entre poblaciones de una misma especie (conespecíficas) (Villacís *et al.*, datos no publicados).

Además, la información derivada del dendrograma y las distancias euclidianas demuestra que existe cercanía entre *P. chinai* y los híbridos en su conformación alar, un hecho que concuerda con observaciones de Villacís *et al.*, (datos no publicados). De esta manera, dicho estudio afirma que, mientras el color de los descendientes híbridos es más cercano al de *P. howardi*, su conformación alar parece estar más relacionada con la de *P. chinai*.

En análisis realizados por Costa *et al.*, (2008) y Dujardin, (2011), con híbridos del género *Triatoma*, los datos morfométricos demostraron que la conformación de los híbridos fue un intermedio entre los parentales, un patrón totalmente opuesto a lo observado en el tamaño. Por otra parte, en análisis efectuados por Villacís *et al.*, (datos no publicados), la topología de los árboles filogenéticos mostró una gran monofilia para *P. chinai* y *P. howardi*; vale la pena aclarar que, mientras *P. chinai* resultó ser un clado fuertemente respaldado, *P. howardi* no lo fue. A su vez, de acuerdo a Sempertegui, (2012), el hecho de que la prueba de las pruebas de ITS-2 no detectaran divergencia y las de Citocromo B sí lo hicieran significaría que existe la posibilidad de enfrentar un

escenario en el que *P. chinai* y *P. howardi* podrían ser una sola especie; empero, se encontrarían en el límite de una separación inter e intraespecífica.

Según Barnabé *et al.*, (2019), las afirmaciones de Sempertegui, (2012), con respecto a los análisis moleculares de *P. chinai* y *P. howardi* deberían ser tomadas con cautela en vista de que es altamente probable que haya cometido un error de interpretación debido a la utilización de un solo loci. Así, a partir de análisis moleculares basados en varios loci mitocondriales y nucleares, los autores concluyeron que *P. chinai* y *P. howardi* muestran una distancia significativa (6%) a nivel genético y son mayormente separados en dos clados mediante árboles filogenéticos; por ello, se consideran especies distintas. Adicionalmente, al concatenar dicha información con los resultados de aplicar otras técnicas de la misma naturaleza, afirman que ambas especies comparten un ancestro común, y están cercanamente emparentadas.

6.2.2 VARIACIÓN INTERESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE *Panstrongylus chinai*, *P. howardi* e híbridos PARA MACHOS Y HEMBRAS

Los resultados del PCA muestran que existe un solapamiento claro entre especies tanto para machos como hembras. Esta información coincide con el estudio de Orozco, (2013), cuyos datos muestran una evidente superposición entre grupos. Además, el dendrograma construido a partir de las distancias euclidianas mostró gran cercanía entre *P. chinai* y los híbridos tanto para machos como para hembras, un hecho que es respaldado por los datos de Villacís, *et al.*, datos no publicados sobre la conformación alar.

6.2.3 VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA DE LA CONFORMACIÓN ALAR ENTRE SEXOS POR ESPECIE

La información presentada en el PCA señala que existe solapamiento entre machos y hembras de cada grupo en su conformación alar. Orozco, (2013), expresa algo similar, pues su análisis discriminante demuestra que no existen diferencias significativas en la conformación alar entre machos y hembras de *P. chinai* y *P. howardi*, lo cual tendría

como consecuencia la inexistencia de dimorfismo sexual a este nivel. En cambio, Villacís *et al.*, (datos no publicados), encontraron que existen diferencias significativas entre machos y hembras *P. chinai* y *P. howardi*, tanto en conformación a nivel de alas, como a nivel de cabezas.

También, en el caso de la varianza de la forma, nuestros resultados indican que no existen diferencias estadísticamente significativas a ningún nivel, un hecho que se ve apoyado por Villacís *et al.*, (datos no publicados), cuyo estudio encontró el mismo patrón.

Luego, el dendrograma demostró que los individuos machos y hembras *P. chinai* tienen una mayor cercanía con los híbridos que con *P. howardi*. Esto se ve apoyado por la información de Villacís *et al.*, (datos no publicados). Adicionalmente, Orozco, (2013), menciona que existe una relación, aunque no muy marcada, entre machos y hembras *P. chinai* y *P. howardi*.

Pese a que nuestros dendrogramas fueron construidos a partir de las distancias Euclidianas, con miras a comprobar si estadísticos diferentes apuntaban hacia una misma dirección, también se consideraron las distancias de Mahalanobis. Aunque a nivel de especies y machos ambas distancias apoyaron una mayor cercanía entre *P. chinai* y los híbridos, en el caso de hembras y sexos ocurrió lo contrario; así, los dendrogramas construidos mediante distancias de Mahalanobis acercaron a los híbridos hacia *P. howardi*. Ahora bien, aun cuando este método es una herramienta considerablemente poderosa cuando de clasificación se trata, Dujardin *et al.*, (2010) afirman que es altamente sensible a errores de observación y a la presencia de datos atípicos.

Al comparar nuestros datos para reclasificación validada basada en las distancias de Mahalanobis (CCCMaha) con lo obtenido por Villacís *et al.*, (datos no publicados), se observó que los porcentajes obtenidos en este estudio fueron menores y considerablemente bajos. De esta manera, mientras que Villacís *et al.*, (datos no publicados), obtuvo una mejor reclasificación para *P. howardi*, nuestros datos indican lo contrario, es decir, una mejor reclasificación para *P. chinai*. Con todo, ambos trabajos comparten el hecho de que los porcentajes fueron mejores, en general, para machos que para hembras. Por tanto, nuestros datos no serían ideales para identificar individuos externos o desconocidos (Dujardin & Dujardin, 2018).

En un inicio, *P. chinai* y *P. howardi* se consideraban especies separadas debido principalmente a las diferencias de color entre ellas. No obstante, Patterson *et al.*, (2009), sugeriría que *P. chinai* podría ser una forma melánica de *P. howardi*. Otros autores afirmaron que este fenómeno se podía presentar en otras especies, tales como *Triatoma infestans*, *Rhodnius stali* o *Rhodnius nasutus*. Mas, esta “melanización” no significa necesariamente que exista divergencia, toda vez que el ambiente también puede tener influencia en la variación fenotípica (Villacís *et al.*, datos no publicados).

Chuit *et al.*, (2017) menciona que la teoría tradicional de la dispersión de la enfermedad de Chagas en las primeras poblaciones humanas de Sudamérica indica un ciclo asociado a pequeños mamíferos propios de los bosques orientales de los Andes. De este modo, pasó de los valles tropicales bolivianos a las culturas andinas, con las cuales se domicilió, para posteriormente seguir las rutas comerciales de los Incas a través de las montañas, hasta que llegó a Ecuador. Uno de los primeros registros de la enfermedad fue brindado por el explorador inglés, Edward Whymper, en 1879, quien reportaría la presencia de *Triatoma dimidiata* en Guayaquil. No sería descabellado proponer que la cercana relación encontrada entre *P. chinai* y *P. howardi* pudiera responder a la forma en la que se dispersó el ciclo de la enfermedad a lo largo de los Andes (León, 1949), pero esto es solo una especulación.

Con todo, las especulaciones pueden llevar a propuestas interesantes. Por ello, trayendo a la mesa los resultados de Villacís *et al.*, (datos no publicados), en sus análisis sobre modelamiento de nicho ecológico, afirman que los límites de las provincias de El Oro y Guayas podrían ser un sitio potencial de solapamiento para *P. chinai* y *P. howardi*. De esta manera, Manabí podría ser un área de distribución probable para *P. chinai* y Loja un área a donde, teóricamente, podría llegar *P. howardi*. En consecuencia, ambas provincias compartirían ciertas condiciones ambientales que facilitarían una colonización de ambas especies. Aunque aún no se han reportado híbridos naturales, la cercana relación de tamaño y conformación entre *P. chinai* y los híbridos de laboratorio obtenidos en este trabajo sugiere que el proceso de hibridación es, en efecto, posible y se ve evidenciado en el fenotipo de la descendencia. Empero, yendo un paso más allá, Villacís *et al.*, (datos no publicados), reportó que no se pudo observar copulación entre híbridos. Su estudio también señala que, si bien se encontraron huevos, estos no

mostraban un embrión visible y nunca eclosionaron. Además, el retrocruzamiento no se pudo realizar.

Debido a los datos obtenidos con respecto al tamaño (un factor afectado probablemente por condiciones ambientales), conformación alar (sin diferencias significativas entre grupos), dendrogramas basados en distancias euclidianas y de Mahalanobis contrastantes, porcentajes de reclasificación relativamente bajos y evidencias morfométricas y moleculares de otros autores, podemos decir que no hay razones lo suficientemente contundentes como para afirmar que *P. chinai* es una forma melánica de *P. howardi*. Eso sí, es necesario señalar que la relación entre *P. chinai* y sus híbridos se da a todos los niveles analizados y no es de sorprender que, como se ha reportado en estudios de Usinger *et al.*, (1966) y Dujardin *et al.*, (1999), estas dos especies, al igual que otros miembros de la subfamilia Triatominae, evidencien divergencia morfológica antes de que se establezcan barreras reproductivas (Villacís *et al.*, datos no publicados).

La morfometría es una herramienta esencial para responder a las preguntas que plantea la entomología médica, especialmente cuando de reconocer especies cercanamente emparentadas se trata. Así y todo, el poder de esta técnica no se limita únicamente a la identificación, ya que también permite predecir la presencia de los insectos vectores en ubicaciones inesperadas y dilucidar la estructura de sus poblaciones. Por consiguiente, a través de dicha información, los especialistas pueden implementar estrategias de control y prevención de manera más rápida y eficaz (Dujardin, 2008).

Con esto, no debemos asegurar que la morfometría es el único o el mejor instrumento a utilizar para diferenciar especies. En realidad, como también lo indican Villacís *et al.*, (datos no publicados), debería ser un complemento al amplio espectro de técnicas existentes actualmente y ayudar a responder preguntas taxonómicas desde una perspectiva integrativa. Este estudio aporta información sobre especies del género *Panstrongylus*, un grupo poco estudiado por considerar a la mayor parte de sus miembros como vectores secundarios (Magalhães *et al.*, 2003) y en el campo de la morfometría, una herramienta poco aplicada en el área de la entomología médica en el Ecuador pese a su alta resolución y numerosas ventajas con respecto a otras metodologías (Dujardin, 2008).

7. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que *P. chinai* es una especie distinta de *P. howardi*, pero cercanamente emparentada a nivel morfológico, aportando evidencia para respaldar el rechazo enunciado por otros estudios a la hipótesis de que *P. chinai* es una forma melánica de *P. howardi*. La hibridación observada entre estas dos especies podría deberse a que se ha visto que la divergencia en varias especies de triatomíneos empieza a darse a nivel morfológico antes de que se desarrollen barreras reproductivas.

Se comprobó que el tamaño de las alas de los híbridos fue distinto al de los parentales. Específicamente, los híbridos mostraron el tamaño más pequeño, con *P. chinai* siendo más grande y *P. howardi* sobrepasando a ambos en este aspecto. Además, se observó una mayor cercanía entre los híbridos y *P. chinai* que entre los primeros y *P. howardi* para el tamaño del ala. También, para todos los grupos, el tamaño alar de los machos fue más pequeño que el de las hembras, evidenciando la existencia de dimorfismo sexual a este nivel. Sin embargo, es notable que los machos y hembras híbridos estuviesen estadísticamente cerca de no mostrar dimorfismo sexual, un hecho que podría responder a un rápido alcance de la capacidad de carga debido la competencia que implica su crianza bajo condiciones de laboratorio, con efectos particularmente fuertes en las hembras.

El análisis morfométrico permite concluir que la conformación alar de los híbridos no fue distinta de la de sus parentales. Tampoco se encontraron diferencias en la forma del ala entre machos y hembras *P. chinai*, *P. howardi* o híbridos, por lo que el dimorfismo sexual es casi indetectable en este sentido. Adicionalmente, se encontró una relación cercana entre los tres grupos, pero mucho más marcada entre *P. chinai* y los híbridos que entre los últimos y *P. howardi* para la conformación alar. Los porcentajes de reclasificación obtenidos mediante máxima verosimilitud (CCCMI) y mediante distancias de Mahalanobis (CCCMaha) fueron relativamente bajos, aunque mayores en machos que en hembras. Con todo, nuestros datos no poseen suficiente resolución para ser utilizados como referencia a fin de identificar individuos desconocidos o externos. Finalmente, los resultados de los dendrogramas son contrastantes, especialmente en el

caso de las distancias de Mahalanobis, un suceso cuya causa podría encontrarse en la alta sensibilidad del método ante pequeños errores humanos.

8. RECOMENDACIONES

Por considerarse vectores de la enfermedad de Chagas poco conocidos debido a su clasificación como “secundarios”, se recomienda ampliar el conocimiento de los insectos del género *Panstrongylus* en el Ecuador y en América Latina, además del análisis de otras estructuras tales como cabezas o cuerpos en individuos híbridos. De esta forma, futuros análisis deberían concatenar el enfoque morfológico con técnicas moleculares a efectos de brindar respuestas a la intrincada taxonomía de los triatominos. Este trabajo es pionero en el análisis morfométrico de híbridos del género *Panstrongylus* y servirá de base para otros científicos en el área de la entomología médica que busquen hacer de dicho método un componente de sus investigaciones.

También, se recomienda el uso de la morfometría como una herramienta para la diferenciación de especies por su fácil implementación en estudios de campo y laboratorio, bajo costo, poco requerimiento de potencia computacional, amplio espectro de aplicación, un flujo de trabajo relativamente sencillo de seguir y su alta resolución frente a otras técnicas.

Aun cuando el número de individuos utilizado en este trabajo fue mayor que en el caso de Orozco, (2013), se recomienda aumentar la cantidad de individuos con miras a disminuir el impacto de un n bajo en los análisis estadísticos. A su vez, se recomienda el uso de medio de montaje Hoyer en buen estado para lograr una calidad de visualización óptima. De igual forma, el posicionamiento de las alas, la captura de fotografías y la digitalización deberían realizarse de la manera más cuidadosa posible, con el fin de evitar errores al momento de utilizar las herramientas morfométricas más sensibles a errores de medición.

Finalmente, el uso del programa XYOM frente a su predecesor, CLIC, es totalmente recomendado en virtud de que posee: i) una interfaz más amigable con el usuario, ii) brinda la posibilidad de descargar un sinnúmero de resultados a partir de un

archivo de origen relativamente simple de construir, iii) no requiere instalación porque es totalmente en línea, iv) es totalmente gratuito, v) permite guardar el progreso de nuestros análisis en la nube (Google Drive), vi) se actualiza automáticamente, vii) facilita el procesamiento de algoritmos altamente complejos, viii) permite una mejor interpretación de los resultados y ix) posee una estrecha conexión con la plataforma Plotly, la cual mejora la presentación de los gráficos estadísticos.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad-Franch, F., Paucar, A., Carpio, C., Cuba, C., Aguilar, M & Miles, M. (2001). Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**(5), 611-620.
- Adobe. (2019). Adobe Photoshop Lightroom. Tomado de: <https://www.adobe.com>
Fecha de acceso: (16/05/2019).
- Amura, A. (2004). Compresión de Imagen: JPEG. Tomado de:
<https://web.archive.org/web/20060726143209/http://pub.ufasta.edu.ar/SISD/jpeg/jpg.htm> Fecha de acceso: (09/05/2019).
- Ancca, J., Pinto, J., Vega, S., Cáceres, A & Náquira, C. (2008). Características Morfométricas, Genéticas, Alimenticias y Vectoriales de *Panstrongylus herreri* procedentes de Jaén (Cajamarca) y Cajaruro (Amazonas), Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. **25**(1): 17-25.
- Araujo, J., Telleria, J & Dalenz, J. (2017). History of the Discovery of the American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition)*. pp. 1-22.
- Arias, S. (2019). Todo lo que necesitas saber al exportar una foto en Lightroom. Tomado de: <https://www.dzoom.org.es/exportar-foto-lightroom/> Fecha de acceso: (16/05/2019).
- Aufderheide, A., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., ... Allison, M. (2004). A 9,000 year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**(7), 2034–2039.
- Barnabé, C., Grijalva, M., Santillán-Guayasamín, S., Yumiseva, C., Waleckx, E., Brenière, F & Villacís, A. (2019). Genetic data support speciation between

Panstrongylus howardi and *Panstrongylus chinai*, vectors of Chagas disease in Ecuador. Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID). ID: MEEGID-D-19-00426.

- Baus, E. (2015). Desarrollo endógeno local: creando contextos saludables para la prevención y control de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas de la provincia de Loja. Tesis de Maestría en Gestión para el Desarrollo Local Comunitario. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. pp. 42.
- Bärtsch, P & Gibbs, S. (2007). Effect of Altitude on the Heart and Lungs. Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine. **116**(19).
- Benítez, H & Puschel, T. (2014). Modelando la Varianza de la Forma: Morfometría Geométrica Aplicaciones en Biología Evolutiva. International Journal of Morphology. **32**(3): 998-1008.
- Bookstein, F. (1982). Foundation of Morphometrics. Annual Review of Ecology and Systematics. **13**: 451-470.
- Carcavallo, R., Girón, I., Jurberg, J & Lent, H. (1997). Atlas of Chagas Disease in the Americas Vol II. Primera Edición. Editorial Fiocruz. Rio de Janeiro, Brasil. 407-773.
- Castillo, F. (2017). Ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación de *Panstrongylus howardi* (Neiva, 1911) endémico de la provincia de Manabí, y su posible distribución en el Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2015). Parasites-American Trypanosomiasis: Biology. Tomado de: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> Fecha de acceso: (22/07/2018).

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2019). Parasites-American Trypanosomiasis: Antiparasitic Treatment. Tomado de: https://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/tx.html Fecha de acceso: (18/11/2019).
- Chuit, R., Curto, S., Ling, C. (2017). Difusión de la Enfermedad de Chagas en América Del Sur. Latinoamérica: una mirada desde el presente hacia el pasado. Centro de Investigaciones Precolombinas. Primera Edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 285-306.
- Costa, J., Peterson, A., Dujardin, J.P., (2008). Indirect evidences suggest homoploid hybridization as a possible mode of speciation in Triatominae (Hemiptera, Heteroptera, Reduviidae). *Infection, Genetics & Evolution*. **9**(2), 263-270.
- CVISION. (2019). TIFF Image Compression. Tomado de: <http://www.cvisiontech.com/library/ocr/image-ocr/tiff-image-compression.html> Fecha de acceso: (09/05/2019).
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Gonzalez, L., Tablada, E., Díaz, M., Robledo, C & Balzarini, M. (2005). Estadística para las Ciencias Agropecuarias. Séptima Edición. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina. pp. 18.
- Dujardin, JP., Steindel, M., Chavez, T., Machane, M., Schofield, C. (1999). Changes in the Sexual Dimorphism of Triatominae in the Transition from Natural to Artificial Habitats. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **94**(4): 565-569.
- Dujardin, JP., Schofield, C & Panzera, F. (2002). Los Vectores de la Enfermedad de Chagas. Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer. Bruselas, Bélgica.
- Dujardin, JP & Slice, D. (2006). Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies. Chapter 25: Contributions of Morphometrics to Medical Entomology. pp. 433-442.

- Dujardin, *JP.*, Beard, C & Ryckman, R. (2007). The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution*. **7**: 161-167.
- Dujardin, *JP.* (2008). Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution*. **8**(6): 875-890.
- Dujardin, *JP.*, Kaba, D & Henry, A. (2010). The exchangeability of shape. *BMC Research Notes*. **3**: 266.
- Dujardin, *JP.* (2011). Modern Morphometrics of Medically Important Insects. In book: *Genetics and Evolution of Infectious Disease*. Elsevier Insights. pp.285-311.
- Dujardin, *JP.* (2018-2019). XYOM-CLIC. Tomado de: <http://xyom-clic.eu/xyom-analyzes/> Fecha de acceso: (01/12/2018).
- Dujardin, *JP.* (2019). XYOM-CLIC. Tomado de: <https://xyom-clic.eu/bienvenido-a-mome/> Fecha de acceso: (12/06/2019)
- Dujardin, S & Dujardin, *JP.* (2019). Geometric morphometrics in the cloud. *Infection, Genetics and Evolution*. **70**: 189-196.
- El Telégrafo. (2016). La riqueza económica de Manabí se centra en la agricultura, la pesca y el turismo. Tomado de: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/ecuador/1/la-riqueza-economica-de-manabi-se-centra-en-la-agricultura-la-pesca-y-el-turismo> Fecha de acceso: (28/11/2018).
- Fairbairn, D. (2013). *Odd Couples: Extraordinary Differences between the Sexes in the Animal Kingdom*. Princeton University Press. Princeton, NJ, USA.
- García, V., Zaragoza, C., Ramírez, J., Guerrero, A & Ruiz, C. (2015). Caracterización rápida de la biodiversidad usando morfometría geométrica: Caso de estudio con

abejas sin aguijón (Apidae: Meliponini) del sur de Ecuador. *Avances en Ciencias e Ingenierías*. 7(1).

Garros, C & Dujardin, JP. (2013). Genetic and Phenetic Approaches to Anopheles Systematics. *Anopheles Mosquitoes - New Insights into Malaria Vectors*. Malaria. 10.5772/56090.

Garza-Ulloa, J. (2018). *Applied Biomechanics Using Mathematical Models*. Chapter 6: Application of mathematical models in biomechanics: artificial intelligence and time-frequency analysis. Academic Press. Cambridge, MA, USA. pp. 373-524.

GeoHack. (2018). Coordenadas de las provincias de Loja y Manabí. Tomado de: <https://tools.wmflabs.org/geohack/> Fecha de acceso: (18/08/2018).

González, N. (2013). Dinámica poblacional de triatominos (Hemiptera- Reduviidae) relacionados con la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en Paraguay, con énfasis en *Triatoma sordida*.

GPL (Gobierno Provincial de Loja). (2011). Diagnóstico del Sistema Económico Productivo. Tomado de: [https://www.prefectura Loja.gob.ec/documentos/.../DIAGNOSTICO ECONOMICO.pdf](https://www.prefectura Loja.gob.ec/documentos/.../DIAGNOSTICO_ECONOMICO.pdf) Fecha de acceso: (28/11/2018).

GPM (Gobierno Provincial de Manabí). (2018). Datos Geográficos. Tomado de: <http://www.manabi.gob.ec/datos-manabi/datos-geograficos> Fecha de acceso: (18/08/2018).

Grijalva, M., Villacís, A., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C., Moncayo, A & Baus, E. (2015). Comprehensive Survey of Domiciliary Triatomine Species Capable of Transmitting Chagas Disease in Southern Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(10).

Hernández, O. (1998). Temas de Análisis Estadístico Multivariado. Primera Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp. 9.

INHAMI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). (2017). Anuario Meteorológico. Tomado de:
http://www.serviciometeorologico.gob.ec/docum_institucion/anuarios/meteorologicos/Am_2013.pdf Fecha de acceso: (18/08/2018).

ISGLOBAL. (2018). La enfermedad de Chagas. Tomado de:
<http://www.infochagas.org/es/como-evitarlo> Fecha de acceso: (21/07/2018).

Justi, S & Galvao, C. (2017). The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. Trends in Parasitology. **33**(1): 42-52.

Keas, B. (1999). Taxonomic Classification of *Trypanosoma cruzi*. Tomado de:
<https://msu.edu/course/zol/316/tcrutax.htm> Fecha de acceso: (15/01/2019).

La Hora. (2011). Manabí es la provincia más agrícola. Tomado de:
<https://lahora.com.ec/noticia/1101194165> Fecha de acceso: (28/11/2018).

Lent H & Wygodzinsky P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. New York: Bulletin of the American Museum of Natural History. **63**(3).

Lee, B., Bacon, K., Botazzi, M., Hotez, P. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. The Lancet Infectious Diseases. **13**(4): 342-348.

León, L. (1949). Información sobre el problema de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. **28**: 569-585.

López, A. (2015). Morfometría geométrica: el estudio de la forma y su aplicación en Biología. Temas de Ciencia y Tecnología. **19**(55): 53-59.

- Magalhães dos Santos, C., Jurberg, J., Galvão, C., da Silva Rocha, D., y Rodriguez, J. 2003. Estudio Morfométrico do Gênero *Panstrongylus* Berg, 1879 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **98**(7): 939-944
- Mendonça, V., Alevi, C., Pinotti, H., Gurgel-Gonçalves, R., Pita, S., Guerra, A *et al.* (2016). Revalidation of *Triatoma bahiensis* Sherlock & Serafim, 1967 (Hemiptera: Reduviidae) and phylogeny of the *T. brasiliensis* species complex. Zootaxa. **4107**(2): 239–254.
- Menes, M. (2004). Diferencias métricas entre poblaciones de *Triatoma dimidiata* Latreille (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) de México, Centro América y Colombia: Efecto de laprocedencia geográfica y el ecotopo. Universidad de San Carlos de Guatemala. Ciudad de Guatemala, Guatemala.
- Mosquera, K., Villacís, A & Grijalva, M. (2016). Life Cycle, Feeding, and Defecation Patterns of *Panstrongylus chinai* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Under Laboratory Conditions. Journal of Medical Entomology. **53**(4): 776-781.
- Municipio de Loja. (2018). Ubicación Geográfica. Tomado de: <http://www.loja.gob.ec/contenido/ubicacion-geografica> Fecha de acceso: (28/12/2018).
- Muñoz, C., Solari, A., Apt, W & Zulantay, I. (2013). Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología. **72**(1): 5-21.
- Murray, C., López, A., Jamison, D. (1994). The global burden of disease in 1990: Summary results, sensitivity analysis and future directions. Bulletin of the World Health Organization. **72**(3): 495-509.
- Noboa, M. (2015). Caracterización Morfométrica de la Biodiversidad del barrenador del fruto *Neoleucinodes elegantilis* (Gueneé) en el cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense*) en diez localidades. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

- Ocaña-Mayorga, S., Lewellyn, M., Costales, J., Miles, M & Grijalva, M. (2010). Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. **4**: 01-08.
- Olympus. (2019). Cámara color SC100. Tomado de: <https://www.olympus-lifescience.com/es/camera/color/sc100/> Fecha de acceso: (09/05/2019).
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2008). The Global Burden of Disease (2004 update). Table A2: Burden of disease in DALYs by cause, sex and income group in WHO regions, estimates for 2004.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2018). Chagas Disease. Tomado de: <http://www.who.int/chagas/disease/en/> Fecha de acceso: (21/07/2018).
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2018). Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY). Tomado de: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/ Fecha de acceso: (11/12/2018).
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). (2014). Enfermedad de Chagas. Tomado de: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en Fecha de acceso: (11/12/2018).
- Orozco, M. (2013). Análisis y comparación morfométrica de cabezas y alas de cuatro especies de *Panstrongylus* en tres provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas en el Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Patterson, J., Barbosa, S & Feliciangeli, M. (2009). On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta Tropica*. **110**: 187-199.

- Perez, C., Lymbery, A & Thompson, A. (2015). Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. *Trends in Parasitology*. **31**(11): 595-603.
- Ramen, F. (2002). *Sleeping sickness and other parasitic tropical diseases*. First Edition. The Rosen Publishing Group, Inc. New York, NY, USA. pp. 20-22.
- Riofrío, A. (2007). La Economía de Loja. Tomado de:
<https://lahora.com.ec/noticia/572532> Fecha de acceso: (28/11/2018).
- Romo, R. (2018). Morfometría geométrica de alas en estudios poblacionales de *Anopheles albimanus* y *Anopheles calderoni*, vectores de malaria en la costa del Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Santillán, S. (2016). Identificación morfométrica y caracterización de los huevos de cuatro especies de triatomíneos (*Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*) en Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Santillán, S., Villacís, A., Grijalva, M & Dujardin, J. (2017). The modern morphometric approach to identify eggs of Triatominae. *Parasites and Vectors*. **10**(55).
- Schofield, C & Gálvao, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*. **110**: 88-100.
- Schurman, K. (2019). Differences between JPEG, TIFF, and RAW. Tomado de:
<https://www.lifewire.com/differences-between-jpeg-tiff-and-raw-493186> Fecha de acceso: (09/05/2019).
- Searle, S., Casella, G & McCulloch, C. (2006). *Variance Components*. First Edition. John Wiley & Sons, Inc. pp. 35.
- Sempertegui, C. (2012). Phylogenetic and Phylogeographic studies of *Panstrongylus* sp., Vectors of Chagas Disease in Loja and Manabí Provinces, Ecuador. Ohio University. Athens, OH, USA.

- Soto-Vivas, A., Rodríguez, C., Bonfante-Cabarca, R & Aldana, E. (2007). Morfometría geométrica de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) de ambientes doméstico y peridoméstico, estado Lara, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. **47**(2): 231-235.
- Soto-Vivas, A., Liria, J & Luna, E. (2011). Morfometría geométrica y filogenia en *Rhodniini* (Hemiptera, Reduviidae) de Venezuela. *Acta Zoológica Mexicana*. **27**(1).
- Tirado, R. (2013). Contexto Social y Productivo de la Provincia de Manabí. Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí. Tomado de: <https://studylib.es/doc/5427650/contexto-social-y-productivo-de-la-provincia-de-manabi> Fecha de acceso: (02/12/2018).
- TOLWEB (Tree of Life Web Project). (2009). *Trypanosoma cruzi*. Tomado de: http://tolweb.org/Trypanosoma_cruzi/98037 Fecha de acceso: (15/01/2019).
- Tyler, K & Engman, D. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*. **31**(5-6): 472-481.
- Usinger, R., Wygodzinsky, P & Ryckman, R. (1966). The biosystematics of Triatominae. *Annual Review of Entomology*. **11**: 309-330.
- Vallegas, J. (2001). Caracterización Morfológica de Marcas Hexacorales y Morfometría de Huevos de Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), Vectores de la Enfermedad de Chagas, por medio de Microscopía Electrónica de Barrido. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
- Vallejo, G. (1992). Análisis Multivariantes Aplicados a las Ciencias Comportamentales. Primera Edición. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo. Oviedo, España. pp. 225.

- Villacís, A., Dujardin, J., Yumiseva, C., Santillán, S., Orozco, M., Mosquera, K., Panzera, F., Pita, S & Grijalva, M. (Datos no publicados). Chagas vectors *Panstrongylus chinai* (Del Ponte, 1929) and *Panstrongylus howardi* (Neiva, 1911): chromatic forms or true species? Systematic Entomology. ID: SYEN-2017-01-004.R1.
- Villacís, A., Arcos-Terán, L & Grijalva, M. (2008). Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. **103**(7): 690-695.
- Villacís, A., Grijalva, M & Catalá, S. (2010). Phenotypic Variability of *Rhodnius ecuadoriensis* Populations at the Ecuadorian Central and Southern Andean Region. Journal of Medical Entomology. **47**(6): 1034-1043.
- Villacís, A., Ocaña, S., Lascano, M., Yumiseva, C., Baus, E & Grijalva, M. (2015). Abundance, Natural Infection with Trypanosomes, and Food Source of an Endemic Species of Triatomine, *Panstrongylus howardi* (Neiva 1911), on the Ecuadorian Central Coast. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. **92**(1): 187-192.
- Whalley, R. (2016). Understanding RAW format photography. Tomado de: <https://lenscraft.co.uk/photo-editing-tutorials/tutorial-understanding-raw-format-photography/> Fecha de acceso: (09/05/2019).
- Zelditch, M., Swiderski, D., Sheets & Fink, W. (2004). Glossary. In Geometric Morphometrics for Biologists: A primer. pp. 410- 428. California: Elsevier Academic Press.
- Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., & Fernandes, O, Guhl, F., Machado, C., Miles, M., Romanha, A., Sturm, N., Tibayrenc, M & Schijman, A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, **104**(7), 1051-1054.

10. FIGURAS

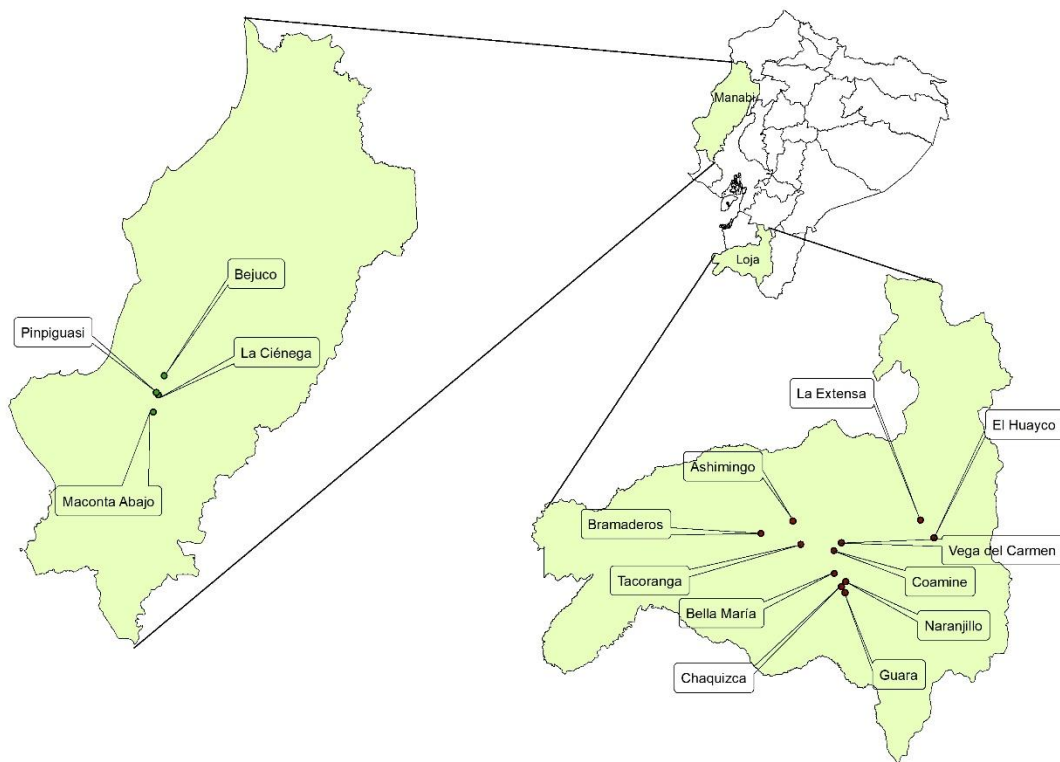


Figura 1. Mapa del Ecuador con las localidades de origen de los triatominos parentales utilizados en el estudio.

(A) Se muestran las cuatro localidades de la provincia de Manabí donde se colectaron los parentales de *P. howardi* (B) Se muestran las once localidades de la provincia de Loja donde se colectaron los parentales de *P. chinai*.

Mapa elaborado por: Daphne Armas

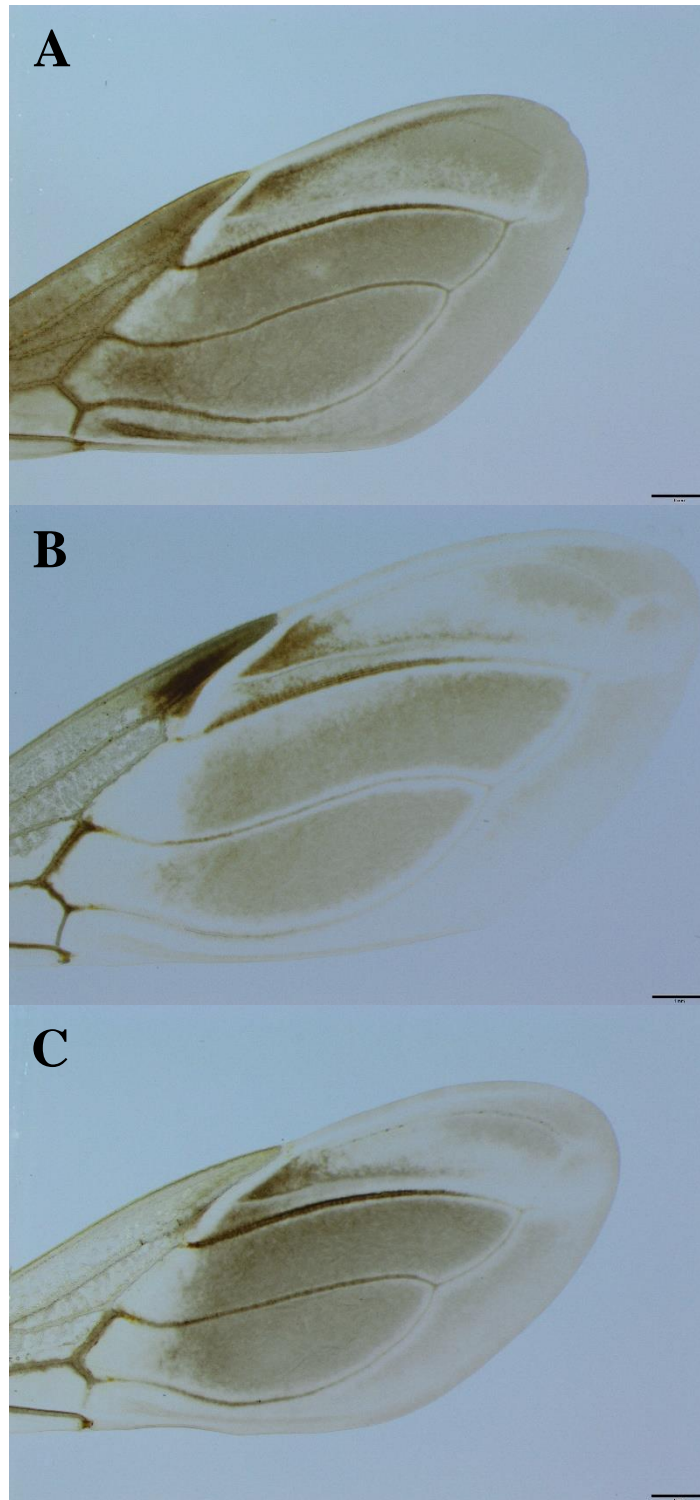


Figura 2. Fotografías del ala derecha de triatominos utilizadas en el estudio. (A) Macho parental *P. chinai*, (B) Hembra parental *P. howardi*, (C) Macho híbrido. Se muestran las diferencias en color, tamaño y conformación del ala de los parentales y su híbrido correspondiente.

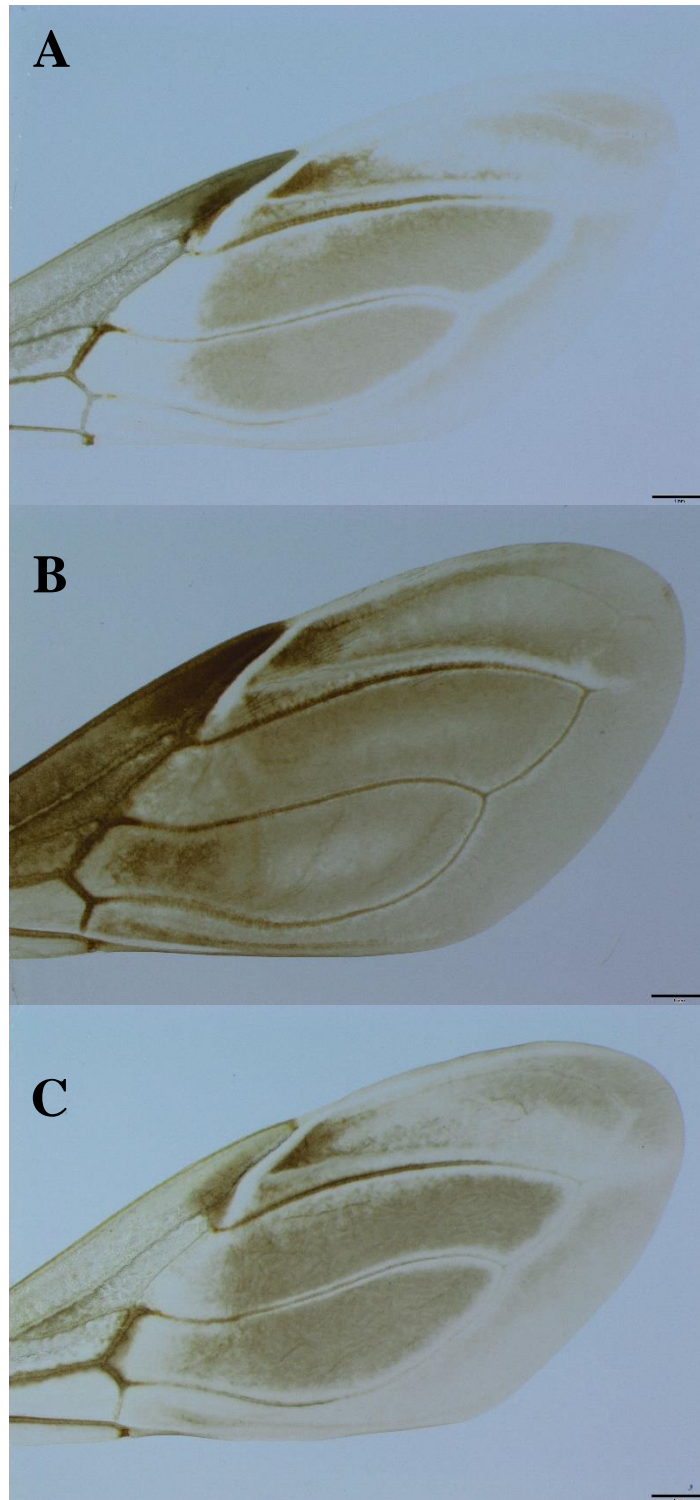


Figura 3. Fotografías del ala derecha de triatominos utilizadas en el estudio. (A) Macho parental *P. howardi*, (B) Hembra parental *P. chinai*, (C) Hembra híbrida. Se muestran las diferencias en color, tamaño y conformación del ala de los parentales y su híbrido correspondiente.



Figura 4. Puntos de referencia (landmarks) usados en el estudio. Los puntos verdes muestran los landmarks utilizados en cada ala para el análisis morfométrico.

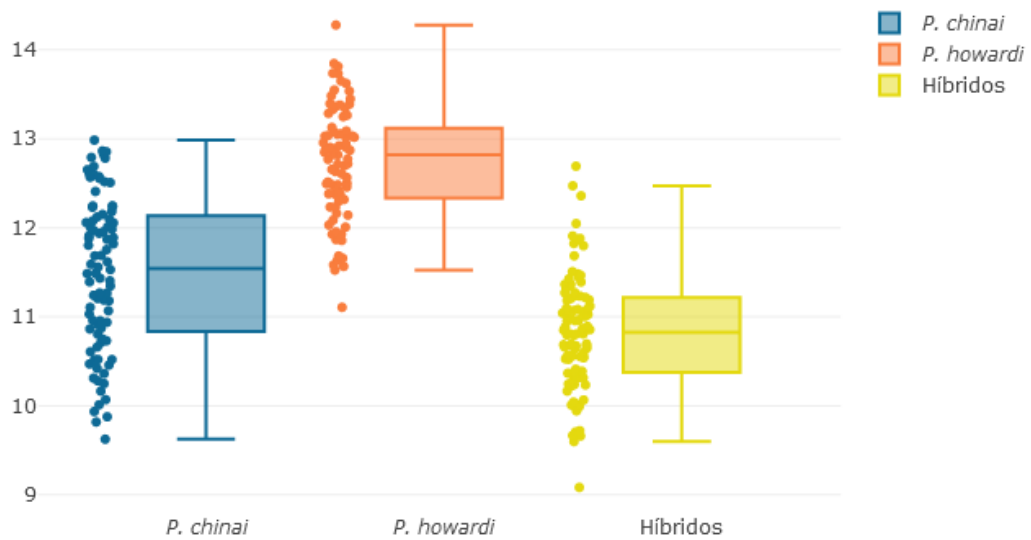


Figura 5. Diagramas de caja (bloxplots) del tamaño del centroide (Centroid Size) que muestran la variación interespecífica del tamaño alar para *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. Los puntos al lado izquierdo de cada caja representan a los individuos, la línea que corta la caja por la mitad representa la mediana (Me), los extremos de las cajas son los cuartiles (Q1 y Q3) y las líneas horizontales que se extienden más allá de los límites de las cajas son el extremo superior (ES) e inferior (EI). La escala se muestra en milímetros. El tamaño del centroide de los individuos *P. howardi* es el mayor, seguido por *P. chinai* y este, a su vez, por los individuos híbridos.

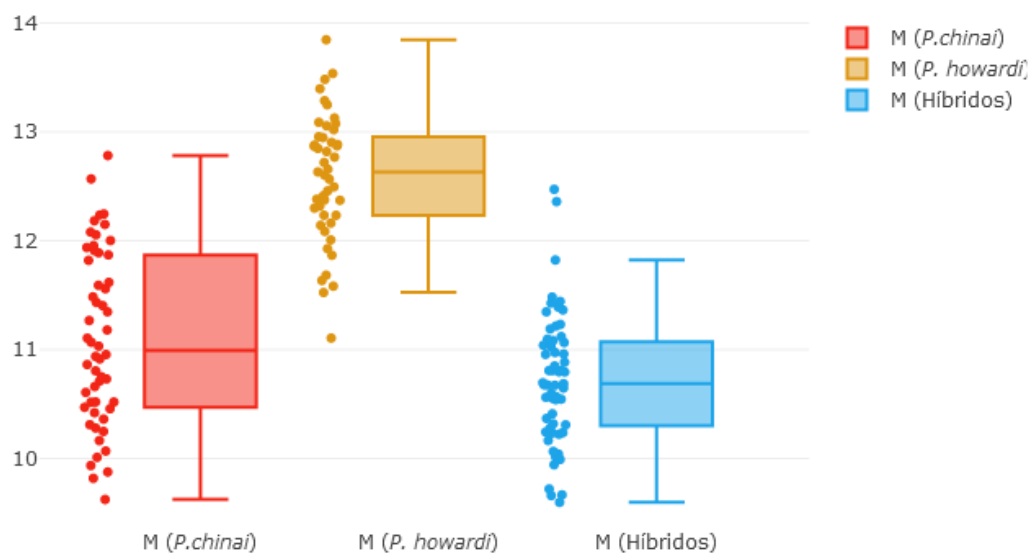


Figura 6. Diagramas de caja (bloxplots) del tamaño del centroide (Centroid Size) que muestran la variación interespecífica del tamaño alar para machos *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. Donde M: macho. De izquierda a derecha: *P. chinai*, *P. howardi*, Híbridos. Los puntos al lado izquierdo de cada caja representan a los individuos, la línea que corta la caja por la mitad representa la mediana (Me), los extremos de las cajas son los cuartiles (Q1 y Q3) y las líneas horizontales que se extienden más allá de los límites de las cajas son el extremo superior (ES) e inferior (EI). La escala se muestra en milímetros. Los machos *P. howardi* evidencian un tamaño del centroide mayor que el de *P. chinai* y los híbridos; no obstante, estos dos últimos muestran poca diferencia entre sí.

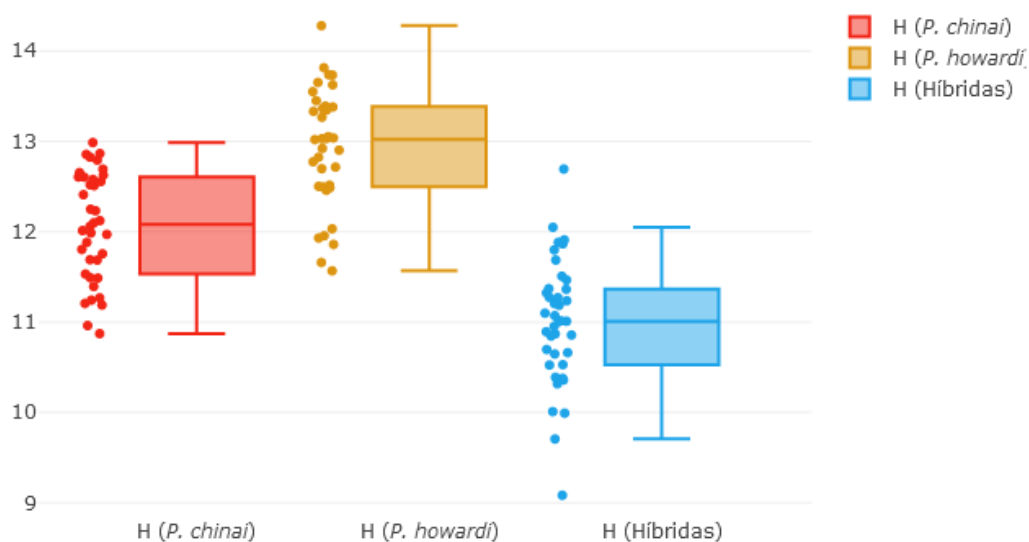


Figura 7. Diagramas de caja (bloxplots) del tamaño del centroide (Centroid Size) que muestran la variación interespecífica del tamaño alar para hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridas. Donde H: hembra. De izquierda a derecha: *P. chinai*, *P. howardi*, Híbridas. Los puntos al lado izquierdo de cada caja representan a los individuos, la línea que corta la caja por la mitad representa la mediana (Me), los extremos de las cajas son los cuartiles (Q1 y Q3) y las líneas horizontales que se extienden más allá de los límites de las cajas son el extremo superior (ES) e inferior (EI). La escala se muestra en milímetros. Las hembras que pertenecen a *P. howardi* poseen un tamaño del centroide considerablemente más grande que las *P. chinai*, siendo las híbridas las que presentan el menor tamaño del grupo.

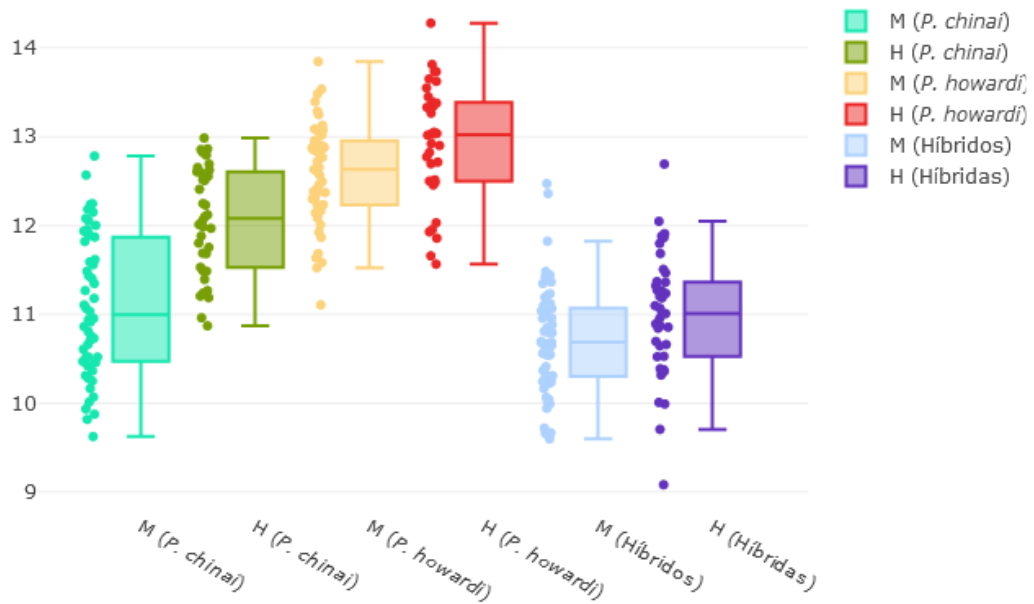


Figura 8. Diagramas de caja (bloxplots) del tamaño del centroide (Centroid Size) que muestran la variación interespecífica e intraespecífica del tamaño alar para machos y hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. Donde M: macho y H: hembra. Los puntos al lado izquierdo de cada caja representan a los individuos, la línea que corta la caja por la mitad representa la mediana (Me), los extremos de las cajas son los cuartiles (Q1 y Q3) y las líneas horizontales que se extienden más allá de los límites de las cajas son el extremo superior (ES) e inferior (EI). La escala se muestra en milímetros. A nivel de sexo entre especies, *P. howardi* presenta el tamaño del centroide más grande, seguido por *P. chinai* y este último, a su vez, por los híbridos.

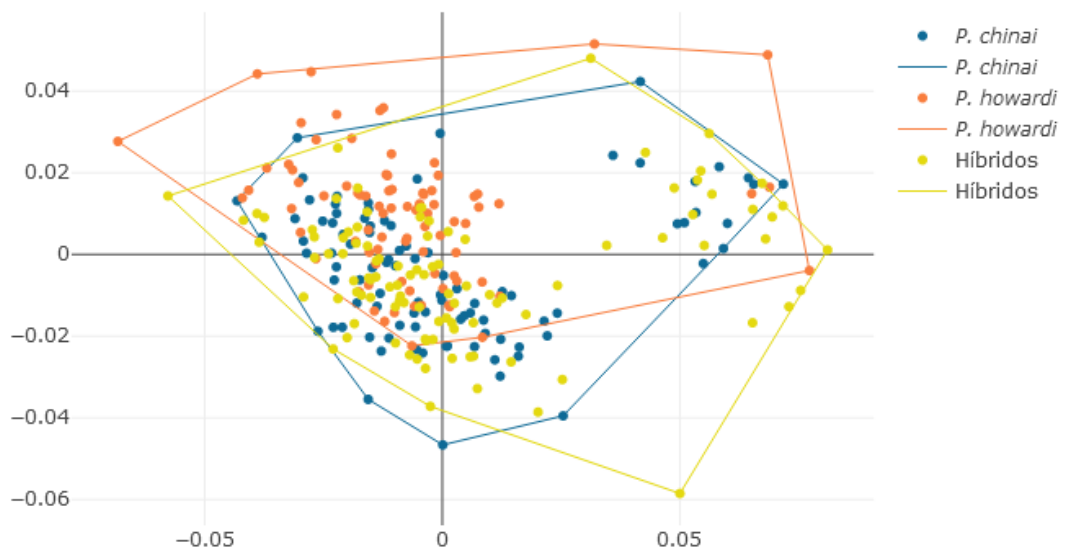


Figura 9. Análisis de Componentes Principales (PCA) que muestra la variación interespecífica de la conformación alar para *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. Se observa un evidente solapamiento en la conformación alar entre especies.

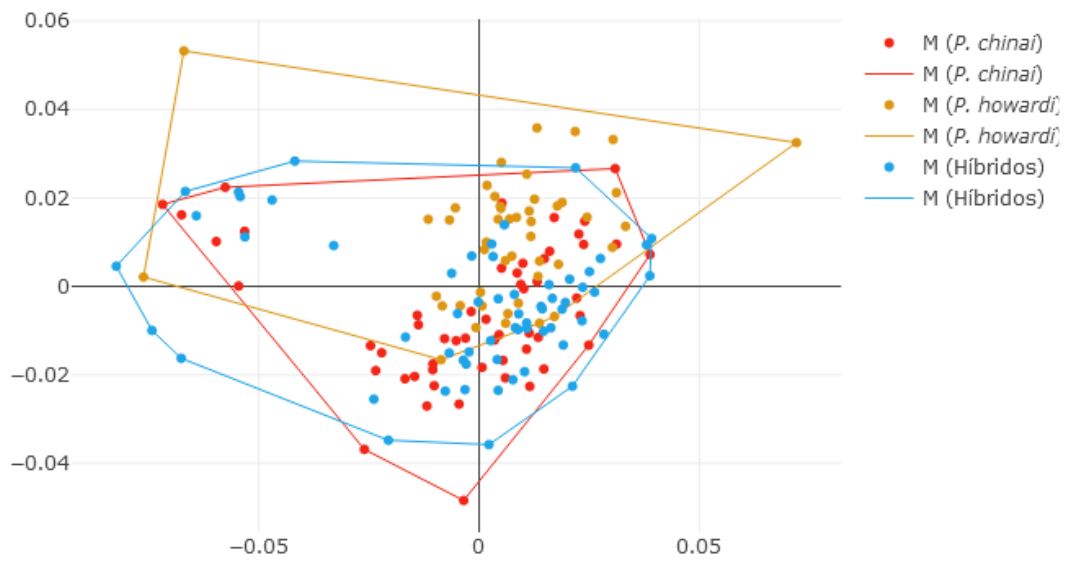


Figura 10. Análisis de Componentes Principales (PCA) que muestra la variación interespecífica de la conformación alar para machos *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. Donde M: macho. Se demuestra que existe solapamiento entre los grupos analizados a nivel de machos entre especies en relación a la conformación alar.

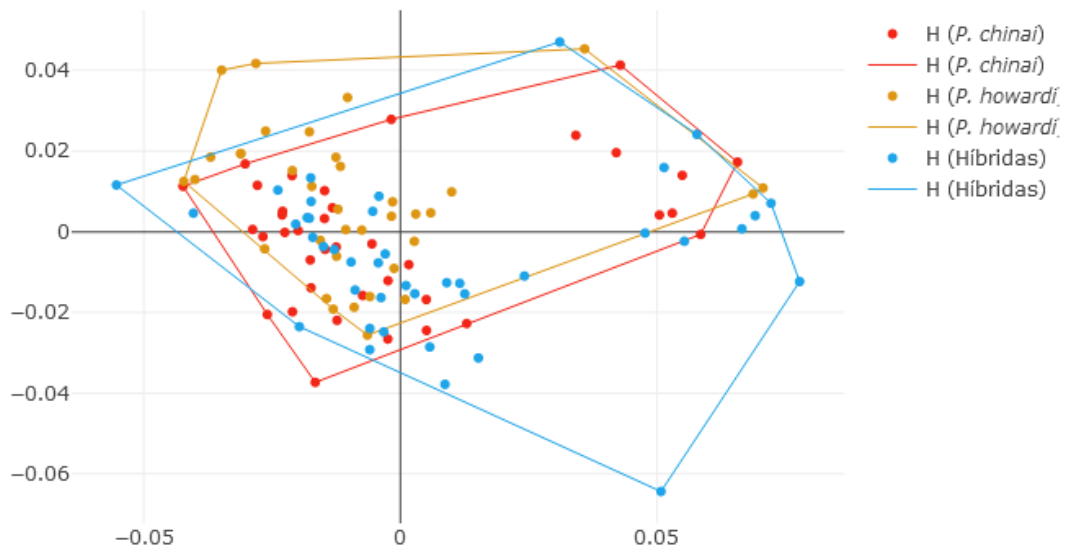


Figura 11. Análisis de Componentes Principales (PCA) que muestra la variación interespecífica de la conformación alar para hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridas. A nivel de hembras entre especies se observa un claro solapamiento de los grupos estudiados en cuanto a la conformación alar se refiere.

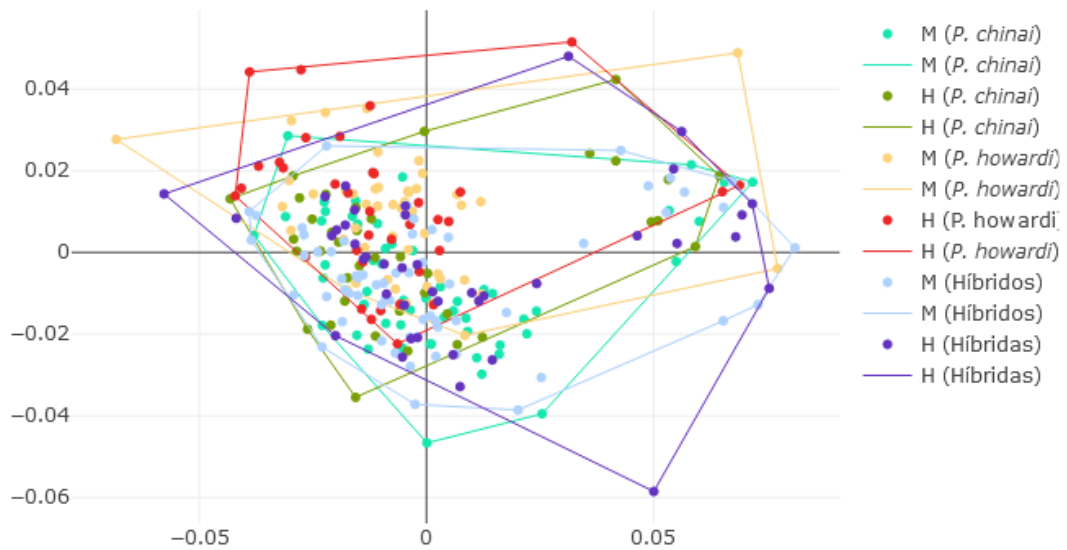


Figura 12. Análisis de Componentes Principales (PCA) que muestra la variación interespecífica e intraespecífica de la conformación alar para machos y hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. Donde M: macho y H: hembra. Ocurre un solapamiento a nivel de sexo entre especies con respecto a la conformación alar.

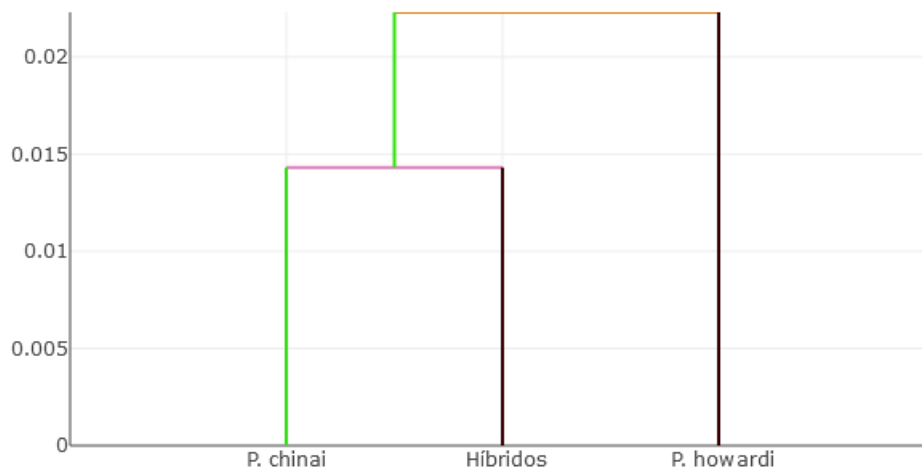


Figura 13. Dendrograma (Single Linkage Tree) basado en las distancias Euclidianas de la conformación alar para *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. El árbol muestra que existe una relación más cercana con respecto a la conformación alar entre *P. chinai* y los híbridos que entre los híbridos y *P. howardi* a nivel de especies.

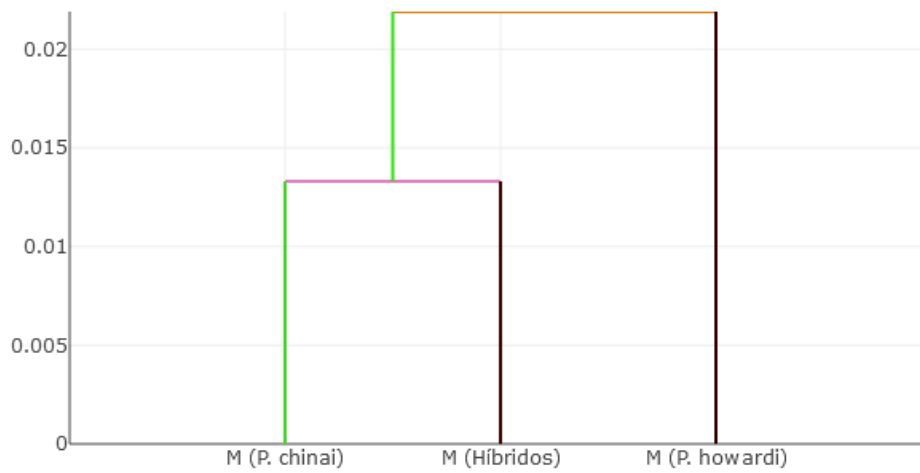


Figura 14. Dendrograma (Single Linkage Tree) basado en las distancias Euclidianas de la conformación alar para machos *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. Se muestra que, a nivel de machos entre especies, la conformación alar de *P. chinai* es más cercana a la de los híbridos, de lo que lo es entre los híbridos y los *P. howardi*.

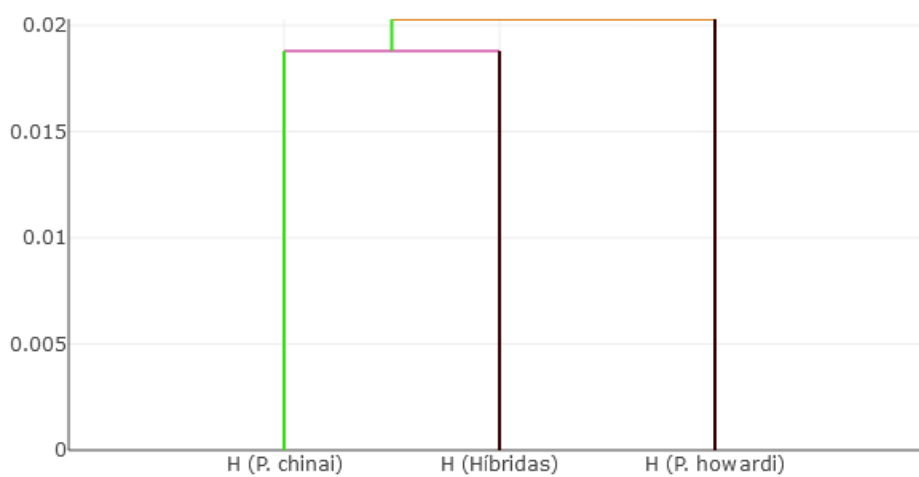


Figura 15. Dendrograma (Single Linkage Tree) basado en las distancias Euclidianas de la conformación alar para hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridas. Entre hembras a nivel de especie, se observa claramente que existe mayor relación entre *P. chinai* e híbridas que entre estas últimas y *P. howardi* en cuanto a conformación alar se refiere.

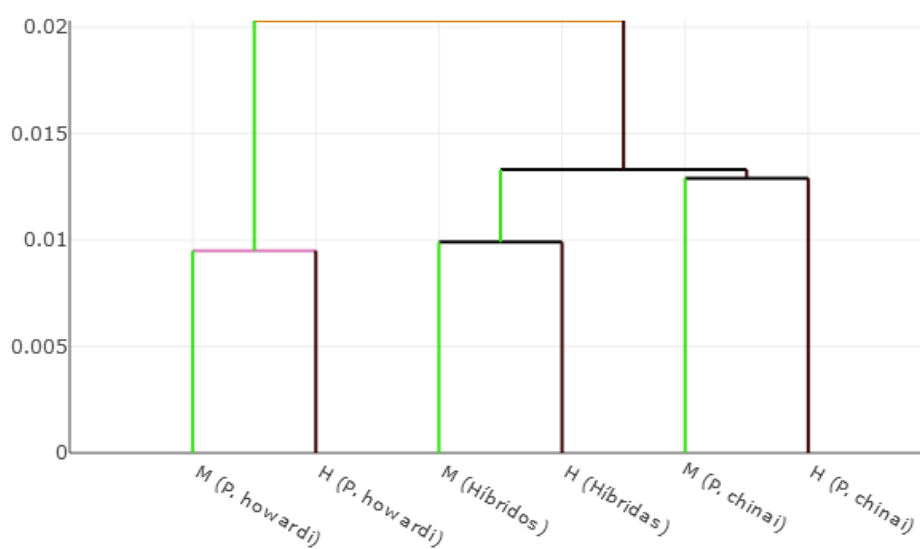


Figura 16. Dendrograma (Single Linkage Tree) basado en las distancias Euclidianas de la conformación alar para machos y hembras *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos. A nivel de sexos entre especies, el árbol evidencia mayor cercanía en la conformación alar entre *P. chinai* e híbridos que entre estos últimos y *P. howardi*.

11. TABLAS

Tabla 1. Localidades y número de individuos para triatomino parentales e híbridos utilizados en el estudio

Grupo	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Machos	Hembras	
<i>P. chinai</i>	Loja	Ashimingo (AH)	-4,043615	-79,73047	942	0	3	
		Bella María (BM)	-4,194885	-79,610214	1106	8	0	
		Bramaderos (BR)	-4,079349	-79,822342	916	5	5	
		Coamine (CE)	-4,12942	-79,6112	1215	0	5	
		Chaquizca (CQ)	-4,23263	-79,5901	1123	4	8	
		La Extensa (EX)	-4,0395	-79,361833	1262	0	1	
		Guara (GA)	-4,25007	-79,57979	1081	13	8	
		El Huayco (HY)	-4,091017	-79,322817	1449	8	0	
		Naranjillo (NJ)	-4,218536	-79,577633	1113	0	3	
		Tacoranga (TC)	-4,11105	-79,7074	1612	8	0	
		Vega del Carmen (VC)	-4,106107	-79,590123	1141	8	5	
						Total (sexo)	54	38
						Total (<i>P. chinai</i>)		92
<i>P. howardi</i>	Manabí	Bejuco (BJ)	-0,949592	-80,3365	383	34	29	
		La Ciénega (CN)	-1,02000	-80,3590	52	11	6	
		Maconta Abajo (MB)	-1,0848	-80,3781	136	0	1	
		Pimpiguasí (PI)	-1,01147	-80,3664	50	2	0	
						Total (sexo)	47	36
				Total (<i>P. howardi</i>)		83		
Híbridos	---	H (BJ) - M (BM)	---	---	---	7	10	
		H (BJ) - M (GA)	---	---	---	7	5	
		H (BJ) - M (HY)	---	---	---	1	1	
		H (BJ) - M (TC)	---	---	---	9	4	
		H (BJ) - M (VC)	---	---	---	14	10	
		H (BR) - M (BJ)	---	---	---	7	0	
		H (CQ) - M (BJ)	---	---	---	3	3	
		H (GA) - M (BJ)	---	---	---	2	2	
		H (HY) - M (BJ)	---	---	---	10	5	
		H (VC) - M (BJ)	---	---	---	1	1	
				Total (sexo)	61	41		
				Total (híbridos)		102		
				TOTAL (estudio)		277		

M: Macho, H: Hembra.

Las localidades cercanas a las de los parentales originales de los híbridos se resaltan en negrillas.

Tabla 2. Datos de los diagramas de caja (boxplots) para el tamaño del centroide (Centroid Size) de *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos

	Grupo	EI	Q1	Me	Q3	ES
Especie	<i>P. chinai</i>	9.625199	10.83523	11.54549	12.13646	12.98596
	<i>P. howardi</i>	11.52562	12.33217	12.81942	13.11785	14.27888
	Híbridos	9.598749	10.37705	10.82707	11.21803	12.47291
Sexo	M (<i>P. chinai</i>)	9.625199	10.47093	10.99424	11.87076	12.78314
	H (<i>P. chinai</i>)	10.87183	11.53086	12.07897	12.60375	12.98596
	M (<i>P. howardi</i>)	11.52562	12.23439	12.63256	12.95407	13.84673
	H (<i>P. howardi</i>)	11.56647	12.49846	13.02385	13.38424	14.27888
	M (Híbridos)	9.598749	10.30304	10.68781	11.0708	11.82386
	H (Híbridos)	9.706228	10.5274	11.00908	11.3644	12.04785

EI: Extremo inferior, Q1: Cuartil 1, Me: Mediana, Q3: Cuartil 3, ES: Extremo superior

Tabla 3. Valores de p obtenidos mediante ANOVA de las comparaciones a nivel de especie, machos, hembras y sexo para el tamaño del centroide (Centroid Size)

	Combinación	p valor
Especie	Especie (ch, hw, hb)	3.09E-47***
	<i>P. chinai</i> vs <i>P. howardi</i>	6.31781E-21***
	<i>P. chinai</i> vs Híbridos	4.28E-09***
	<i>P. howardi</i> vs Híbridos	2.02107E-48***
Machos	Machos (ch, hw, hb)	4.1739E-31***
	M (<i>P. chinai</i>) vs M (<i>P. howardi</i>)	5.38273E-18***
	M (<i>P. chinai</i>) vs M (Híbridos)	0.004862263**
	M (<i>P. howardi</i>) vs M (Híbridos)	1.10744E-30***
Hembras	Hembras (ch, hw, hb)	1.83263E-23***
	H (<i>P. chinai</i>) vs H (<i>P. howardi</i>)	9.44164E-08***
	H (<i>P. chinai</i>) vs H (Híbridos)	1.46335E-10***
	H (<i>P. howardi</i>) vs H (Híbridos)	2.81135E-20***
Sexo	Sexo (M y H)	1.15932E-05***
	M y H ch, M y H hw, M y H hb	3.4944E-55***
	M (<i>P. chinai</i>) vs H (<i>P. chinai</i>)	1.05615E-08***
	M (<i>P. howardi</i>) vs H (<i>P. howardi</i>)	0.013637099*
	M (Híbridos) vs H (Híbridos)	0.046569196*

M: Macho, H: Hembra, ch (*P. chinai*), hw (*P. howardi*), hb: híbridos.

A mayor valor de p, las diferencias entre grupos son menos significativas

***Se muestran valores altamente significativos

**Se muestran valores medianamente significativos

*Se muestran valores significativos

Tabla 4. Distancias Euclidianas (ED) y de Mahalanobis (MD) a nivel de especie, machos, hembras y sexo de *P. chinai*, *P. howardi* e Híbridos

	Grupos	ED	MD
Especie	<i>P. chinai</i> vs <i>P. howardi</i>	0.022268487	3.46497322
	<i>P. chinai</i> vs Híbridos	0.014308334	2.465086574
	<i>P. howardi</i> vs Híbridos	0.022377885	2.465137778
Machos	M (<i>P. chinai</i>) vs M (<i>P. howardi</i>)	0.024212503	3.644753441
	M (<i>P. chinai</i>) vs M (Híbridos)	0.013270049	2.405805591
	M (<i>P. howardi</i>) vs M (Híbridos)	0.02188722	2.687711682
Hembras	H (<i>P. chinai</i>) vs H (<i>P. howardi</i>)	0.020327876	3.324963456
	H (<i>P. chinai</i>) vs H (Híbridos)	0.018813458	2.69940995
	H (<i>P. howardi</i>) vs H (Híbridos)	0.024524093	2.25311749
Sexo	M (<i>P. chinai</i>) vs H (<i>P. chinai</i>)	0.01293759	1.228854729
	M (<i>P. chinai</i>) vs H (<i>P. howardi</i>)	0.025680697	3.452274672
	M (<i>P. chinai</i>) vs H (Híbridos)	0.01788153	2.725619757
	H (<i>P. chinai</i>) vs M (<i>P. howardi</i>)	0.022805421	3.635640614
	H (<i>P. chinai</i>) vs M (Híbridos)	0.017188922	2.523704565
	M (<i>P. howardi</i>) vs H (<i>P. howardi</i>)	0.009455028	0.809250153
	M (<i>P. howardi</i>) vs H (Híbridos)	0.025574922	2.681191586
	H (<i>P. howardi</i>) vs M (Híbridos)	0.022425799	2.358810989
	M (Híbridos) vs H (Híbridos)	0.009928115	0.814769057

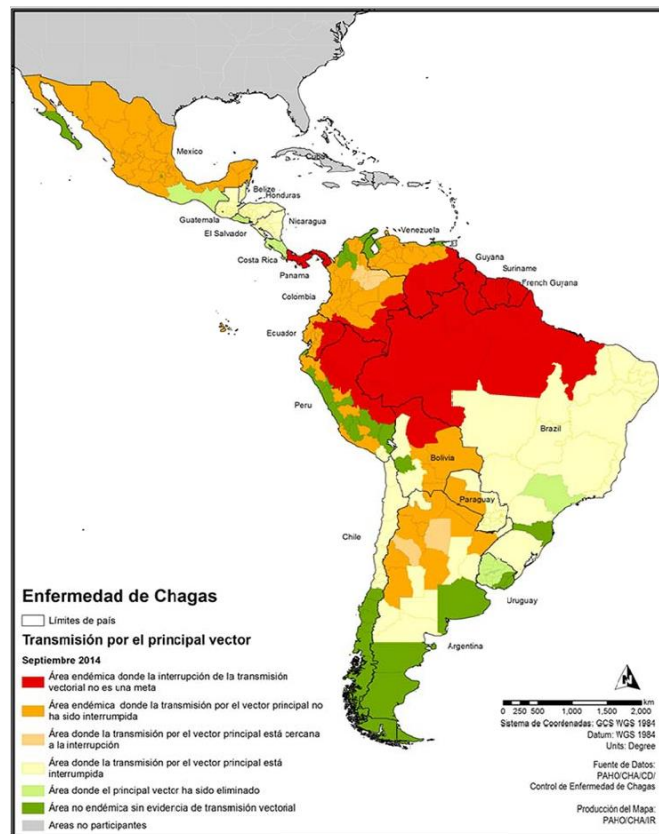
M: Macho, H: Hembra

Tabla 5. Reclasificación validada basada en el índice de máxima verosimilitud (CCCMli) y en la distancia de Mahalanobis (CCCMaha) a nivel de especie, machos, hembras y sexo.

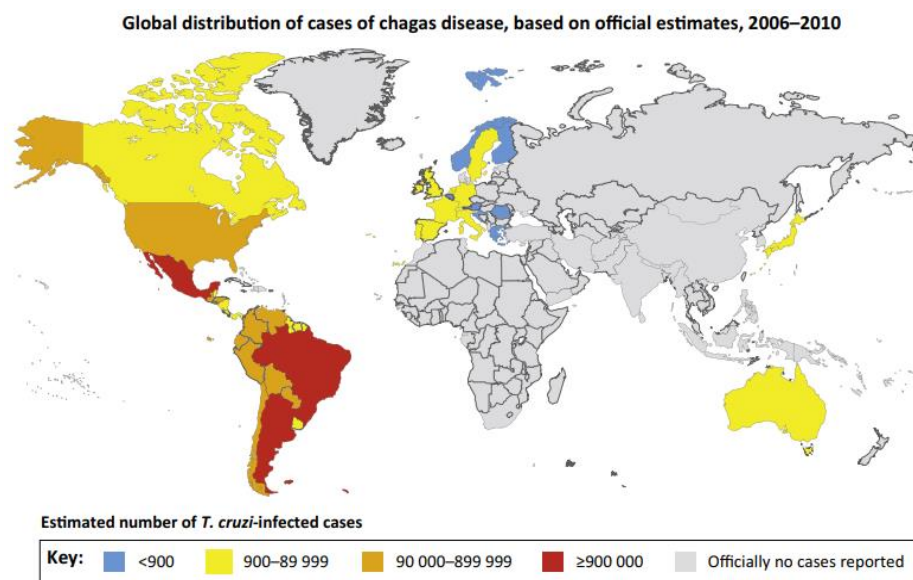
	Grupo	Total de individuos	Reclasificados por CCCMli	Reclasificados por CCCMaha	% por CCCMli	% por CCCMaha
Especie	<i>P. chinai</i>	92	83	81	90.22	88.04
	<i>P. howardi</i>	83	58	71	69.88	85.54
	Híbridos	102	80	81	78.43	79.41
				Rendimiento	79.51	84.33
Machos	M (<i>P. chinai</i>)	54	50	46	92.59	85.19
	M (<i>P. howardi</i>)	47	35	42	74.47	89.36
	M (Híbridos)	61	45	45	73.77	73.77
				Rendimiento	80.28	82.77
Hembras	H (<i>P. chinai</i>)	38	27	33	71.05	86.84
	H (<i>P. howardi</i>)	36	24	28	66.67	77.78
	H (Híbridas)	41	31	32	75.61	78.05
				Rendimiento	71.11	80.89
Sexo	M (<i>P. chinai</i>)	54	44	35	81.48	64.81
	H (<i>P. chinai</i>)	38	14	23	36.84	60.53
	M (<i>P. howardi</i>)	47	12	26	25.53	55.32
	H (<i>P. howardi</i>)	36	17	12	47.22	33.33
	M (Híbridos)	61	17	35	27.87	57.38
	H (Híbridas)	41	26	16	63.41	39.02
				Rendimiento	47.06	51.73
			TOTAL	69.49	74.93	

M: Macho, H: Hembra

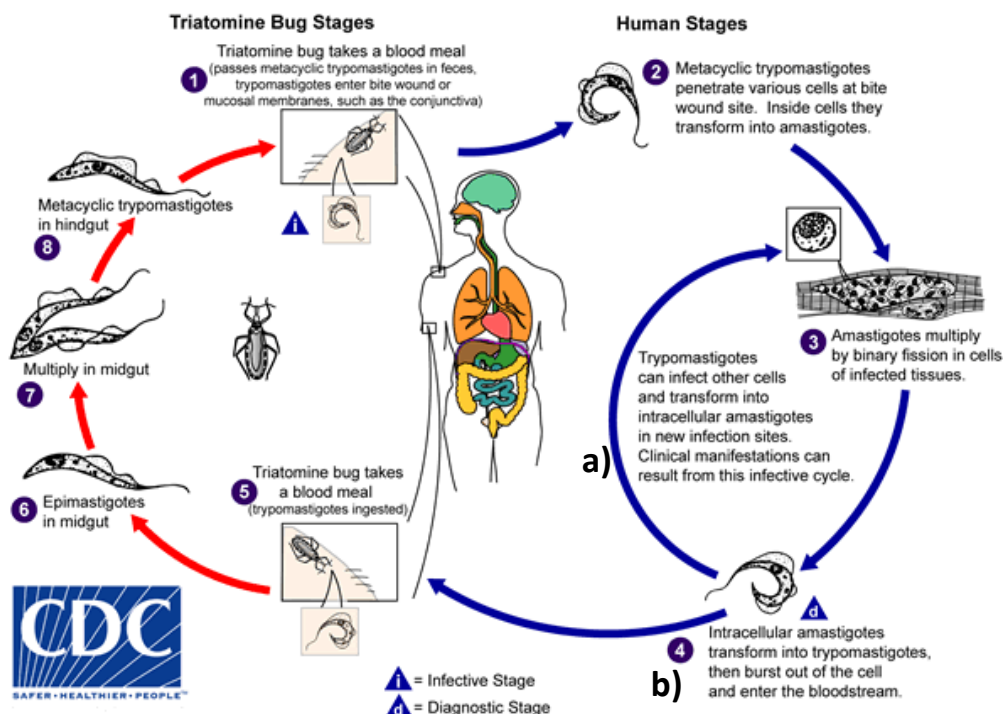
12.ANEXOS



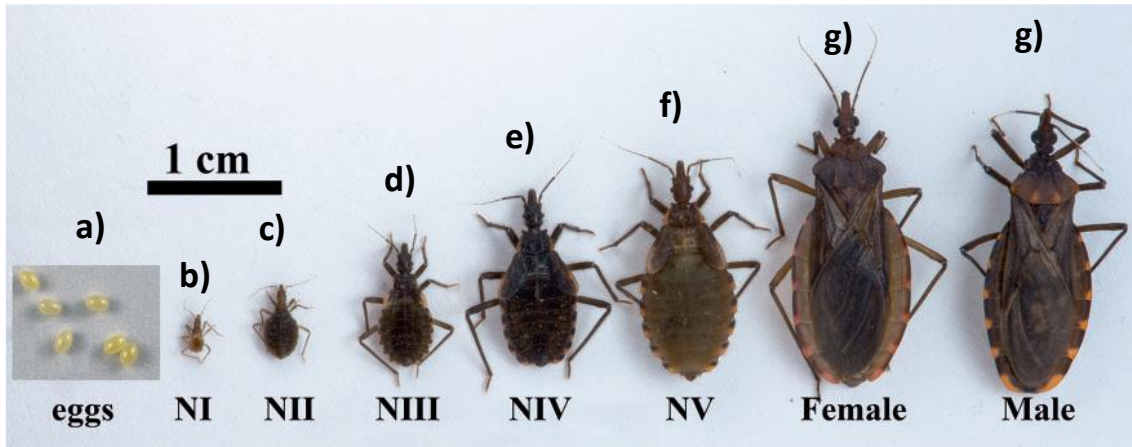
Anexo 1. Mapa del rango de distribución de la enfermedad de Chagas en América. De acuerdo a datos de la OPS (2014), la enfermedad de Chagas está presente desde el norte de México hasta el norte de Argentina.



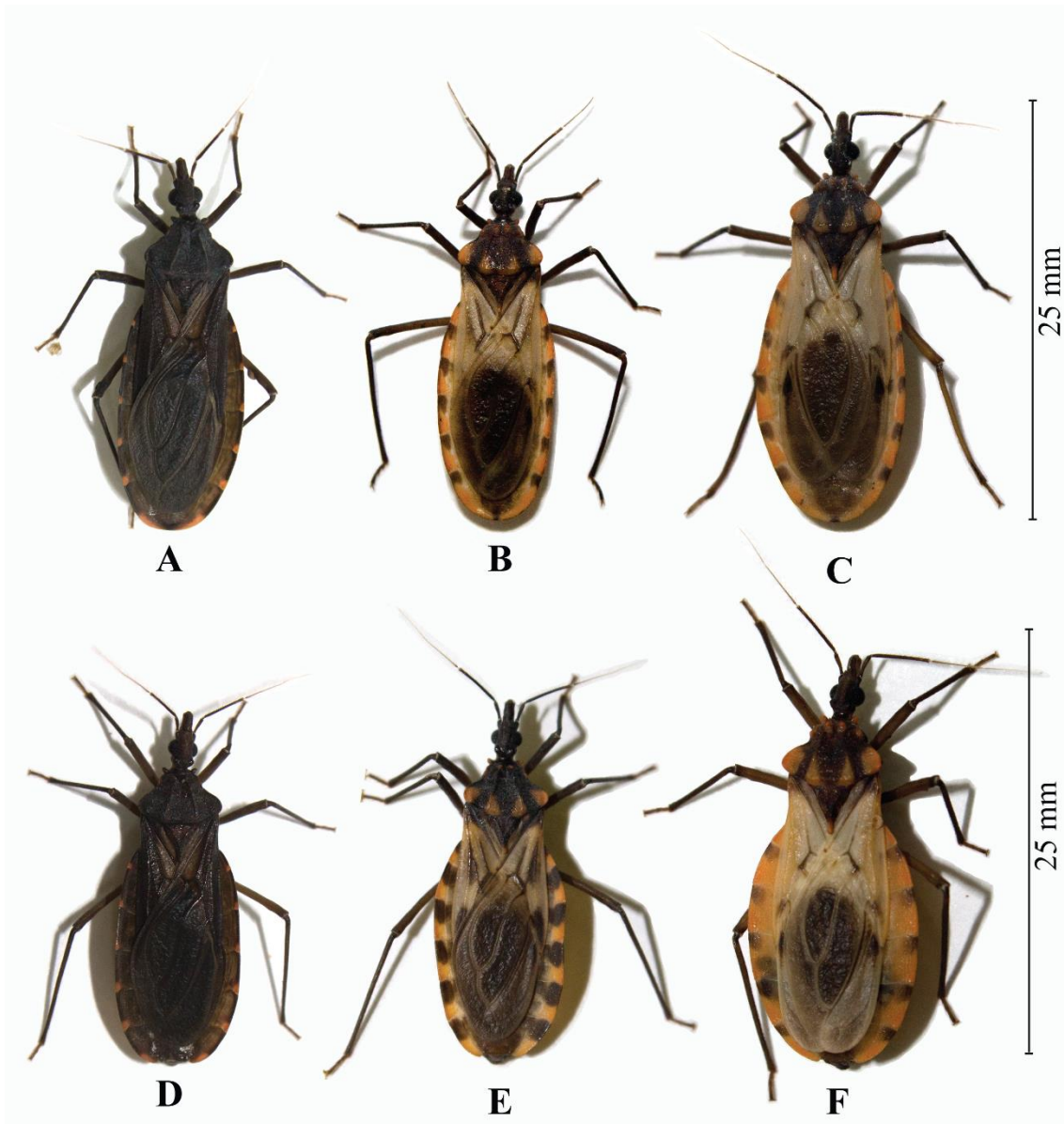
Anexo 2. Mapa del rango de distribución de la enfermedad de Chagas en el mundo. Se muestra el número de casos alrededor del mundo de acuerdo a información recabada por Perez *et al* (2015).



Anexo 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. El ciclo inicia cuando **1)** el vector infectado se alimenta de sangre y defeca en o cerca de la herida. **2)** Una vez dentro del hospedero vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células de la herida y se transforman en amastigotes intracelulares. **3)** Luego, se multiplican por fisión binaria. **4)** Posteriormente, los amastigotes se convierten en tripomastigotes, pudiendo tomar dos caminos: **a)** o bien los tripomastigotes infectan otras células y se transforman nuevamente en amastigotes, **b)** o bien rompen la célula afectada y entran al torrente sanguíneo. **5)** Cuando el triatomino se alimenta de la sangre del hospedero vertebrado infectado, ingiere una gran cantidad de tripomastigotes que, **6)** al alcanzar el intestino medio, se convierten en epimastigotes y **7)** se multiplican. **8)** Finalmente, los epimastigotes alcanzan el intestino posterior y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, iniciando un nuevo ciclo de infección. (Figura modificada de CDC, 2015).



Anexo 4. Ciclo de vida de un triatomino (Modelo: *Panstrongylus chinai*). El ciclo de vida del vector inicia en la fase de **a)** huevo, que puede demorar aproximadamente 25 días hasta alcanzar el estadio **b)** NI. Luego, para llegar al estadio **c)** NII tarda unos 38 días. Después, en llegar a **d)** NIII demora 42 días y hasta **e)** NIV son 51 días. Posteriormente, hasta el estadio **f)** NV demora 73 días. Finalmente, NV se convierte en **g)** adulto después de 168 días (Figura modificada de Mosquera *et al.*, 2016).



Anexo 5. Adultos de las especies analizadas en el estudio. Macho (A) *P. chinai*, (B) Híbrido, (C) *P. howardi* y hembra (D) *P. chinai*, (E) Híbrida, (F) *P. howardi*.

(Villacís *et al.*, Datos no publicados)

ANEXO 6. UTILIZACIÓN DE LA FUNCIÓN “RANDBETWEEN” Y MEDICIÓN DEL LARGO DEL CUERPO EN TRIATOMINOS

PROTOCOLO DE MEDICIÓN DE TRIATOMINOS ESCOGIDOS AL AZAR DE LA BASE DE DATOS DE LA UNIDAD DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA - CISEAL

Con miras a comprender las diferencias de tamaño que existen entre *P. chinai*, *P. howardi* y sus respectivos híbridos, se realizó una búsqueda al azar de individuos en una base de datos y se midió el tamaño en milímetros del cuerpo desde el clípeo hasta la genitalia mediante un calibrador Mitutoyo CD-6’’C ($\Delta \pm 0.01$).

Se utilizó un total de 90 individuos, con 30 individuos por cada grupo (*P.chinai*, *P. howardi* e híbridos) (15 machos y 15 hembras).

1.- Se generan 3 tablas con la siguiente información:

Especie	MACHOS			HEMBRAS			
	P o H	# DE IND	Código	Tamaño (mm)	# DE IND	Código	Tamaño (mm)
		1					
		2					
		3					
		4					
		5					
		6					
		7					
		8					
		9					
		10					
		11					
		12					
		13					
		14					
		15					
		PROM			PROM		
		STDEV			STDEV		

2.- Luego, se filtra y se coloca a machos y hembras de cada grupo en una base de datos individual:



3.- Después, se asigna un número a cada individuo de la base de datos (a partir de este punto, se tomará a los machos *P. chinai* como ejemplo):

	A	B	N	Y
1	ID	Código UEM	exo/Estad	Número
2	1730	ND1730	M	1
3	2253	BR2253	M	2
4	2255	BR2255	M	3
5	2257	BR2257	M	4
6	2258	BR2258	M	5
7	2260	BR2260	M	6
8	2408	AH2408	M	7
9	2421	AH2421	M	8
10	2445	AH2445	M	9
11	2446	SY2446	M	10
12	2668	EX2668	M	11
13	2688	SF2688	M	12
14	2692	EX2692	M	13
15	2985	ST2985	M	14

4.- Más tarde, se crea la columna “Azar” y se utiliza la función “RANDBETWEEN” para generar 15 números del 1 al 234 (cantidad de individuos machos presentes en la base de datos).

	A	B	N	Y	Z	AA
1	ID	Código UEM	exo/Estad	Número	Azar	
2	1730	ND1730	M	=RANDBETWEEN(1,234)		

5.- Una vez generados, los números se ordenan en orden ascendente:

	A	B	N	Y	Z
1	ID	Código UEM	exo/Estad	Número	Azar
2	1730	ND1730	M	1	6
3	2253	BR2253	M	2	9
4	2255	BR2255	M	3	16
5	2257	BR2257	M	4	17
6	2258	BR2258	M	5	19
7	2260	BR2260	M	6	32
8	2408	AH2408	M	7	59
9	2421	AH2421	M	8	60
10	2445	AH2445	M	9	66
11	2446	SY2446	M	10	73
12	2668	EX2668	M	11	79
13	2688	SF2688	M	12	81
14	2692	EX2692	M	13	82
15	2985	ST2985	M	14	96
16	2994	JP2994	M	15	138

6.- Después, en la columna “Número”, se aplica un filtro y se escoge únicamente aquellos presentes en la columna “Azar”.

	A	B	N	Y
1	ID	Código UEM	exo/Estad	Número
7	2260	BR2260	M	6
10	2445	AH2445	M	9
17	3007	CY3007	M	16
18	3008	CY3008	M	17
20	3086	CY3086	M	19
33	4027	BR4027	M	32
60	6492	GG6492	M	59
61	6493	GG6493	M	60
67	6840	GA6840	M	66
74	6849	GA6849	M	73
80	7316	BM7316	M	79
82	8308	TC8308	M	81
83	8310	TC8310	M	82
97	9316	BM9316	M	96
139	9404	TC9404	M	138

7.- Finalmente, se copian los códigos “ID” en la columna “Código” de la tabla creada en el Paso 1. Así, este procedimiento se repite para completar la información del resto de grupos.

Especie	MACHOS			HEMBRAS			
	P o H	# DE IND	Código	Tamaño (mm)	# DE IND	Código	Tamaño (mm)
		1	2260				
		2	2445				
		3	3007				
		4	3008				
		5	3086				
		6	4027				
		7	6492				
		8	6493				
		9	6840				
		10	6849				
		11	7316				
		12	8308				
		13	8310				
		14	9316				
		15	9404				
			PROM			PROM	
			STDEV			STDEV	

8.- Para la medición, se coloca a cada individuo en una caja Petri y se toma el largo desde el clípeo hasta la genitalia utilizando un calibrador:



9.- Finalmente, una vez obtenidos los datos, se calcula el promedio del tamaño y la desviación estándar (en milímetros).

<i>P chinai</i>	MACHOS			HEMBRAS			
	Parentales	# DE IND	Código	Tamaño (mm)	# DE IND	Código	Tamaño (mm)
		1	2260	22.72	1	2254	24.14
		2	2445	22.19	2	2259	25.77
		3	3007	24.58	3	2993	24.55
		4	3008	23.66	4	2995	22.87
		5	3086	24.23	5	4016	23.39
		6	4027	23.43	6	6431	25.01
		7	6492	23.20	7	6491	25.24
		8	6493	24.15	8	7178	24.78
		9	6840	22.18	9	7179	26.05
		10	6849	22.01	10	8413	24.41
		11	7311	23.52	11	TC 204 002	22.82
		12	8308	23.19	12	TC 204 003	21.24
		13	8310	24.25	13	TC 204 011	21.38
		14	9316	21.68	14	TC 204 015	22.43
		15	9404	22.82	15	TC 204 016	23.83
			PROM	23.19		PROM	23.86
			STDEV	0.91		STDEV	1.48

ANEXO 7. FABRICACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE HOYER

MEDIO DE MONTAJE PARA ALAS DE MOSQUITOS Y TRIATOMINOS

Componentes de la solución de Hoyer:

Cantidad	Componente
50 mL	Agua destilada
30 g	Goma arábica (gum arabic)
20 mL	Glicerina
200 g	Hidrato de cloral (chloral hydrate)

Protocolo de preparación de la solución de Hoyer:

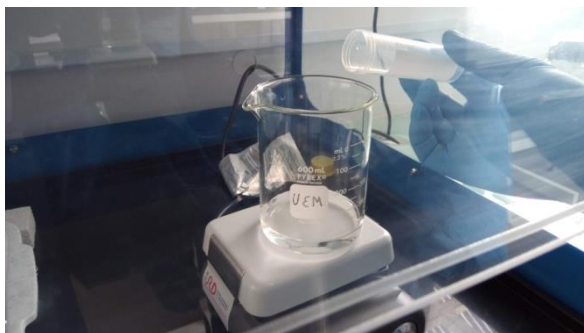
**¡ATENCIÓN! ¡TODO EL PROCEDIMIENTO DEBE HACERSE EN UNA
SORBONA!**



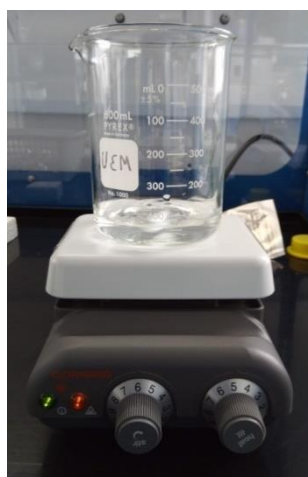
1. Limpiar un vaso de precipitación de 500 mL, una barra de agitación magnética y una varilla de vidrio.

Nota: Lavar con solución de Cloro al 10% y luego con agua destilada.

2. Añadir 50 mL de agua destilada en el vaso de precipitación y colocar la barra de agitación magnética.



3. Calentar a fuego lento y encender el sistema de agitación magnética. Espere hasta que el vidrio se sienta caliente al contacto.



Nota: Es preferible no pasar de Nivel 5 de temperatura y mantener encendido el sistema de agitación magnética a un máximo de 7 durante todo el protocolo.

4. Añadir lentamente 30 g de goma arábiga en pequeñas cantidades con agitación constante.



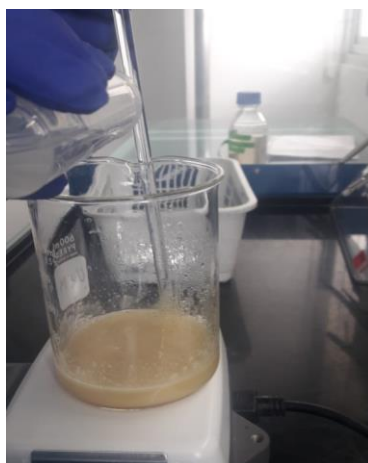


Nota: Para agilizar la disolución de la goma, introduzca una varilla de vidrio en el vaso de precipitación y haga “saltar” a la barra de agitación magnética; esto le permitirá deshacerse de los grumos fácilmente.

5. Minimizar el calor para evitar la caramelización de la goma arábica.

¡Atención! Es esencial evitar temperaturas muy altas, pues, una vez caramelizada, la goma arábica no podrá disolverse. Controle la temperatura constantemente.

6. Añadir 20 mL de glicerol (líquido viscoso) con una jeringuilla o una pipeta de 5 mL.



7. Añadir 200 g de hidrato de cloral (10 g a la vez).

¡Atención! El hidrato de cloral es una sustancia cancerígena; manipular con mucho cuidado durante la pesada y la preparación de la solución Hoyer.



8. Permita que todos los componentes se disuelvan por completo; puede ayudarse con la varilla de vidrio.



9. Deje que el medio repose por 10 a 15 días, sin ser movido, para que las burbujas desaparezcan.

¡ATENCIÓN! Para almacenar el medio, colóquelo en un frasco oscuro con gotero o en un frasco claro envuelto con papel aluminio. MANTÉNGALO ALEJADO DE LA LUZ.

Resultados:

- Una vez terminado el procedimiento, debería poder observar una sustancia de tonalidad amarilla a dorada, relativamente líquida.
- Obtendrá aproximadamente el triple del volumen que colocó de agua, por lo que se recomienda utilizar vasos de precipitación de 300 a 500 ml.
- El medio debería sentirse pegajoso al contacto; si esto no es así, lo más probable es que la goma arábiga esté caducada.

ANEXO 8. UTILIZACION DE LA CÁMARA OLYMPUS SC100 Y DEL PROGRAMA IRFANVIEW (v. 4.38)

PROTOCOLO PARA CAPTURAR FOTOS DE ALAS DE TRIATOMINOS DESDE UN ESTEREOSCOPIO (CON ESCALA)

A fin de capturar correctamente los puntos de interés en alas de triatominos *P. chinai* y *P. howardi*, se escogió trabajar con un estereoscopio OLYMPUS SZX7, una fuente de luz guía de fibra óptica OLYMPUS SZ2-CL y una cámara OLYMPUS SC100, que puede capturar imágenes a una resolución máxima de 3840 x 2748 pixeles y con una calidad de 10.6 megapixeles (OLYMPUS, 2019).



Tómese en cuenta que, para tomar fotografías en el programa IrfanView, es recomendable mantener condiciones de iluminación relativamente uniformes. Si desea medir la intensidad de la luz de la fuente que se encuentre utilizando, puede ayudarse del sensor frontal de un teléfono móvil y una aplicación o de un luxómetro.

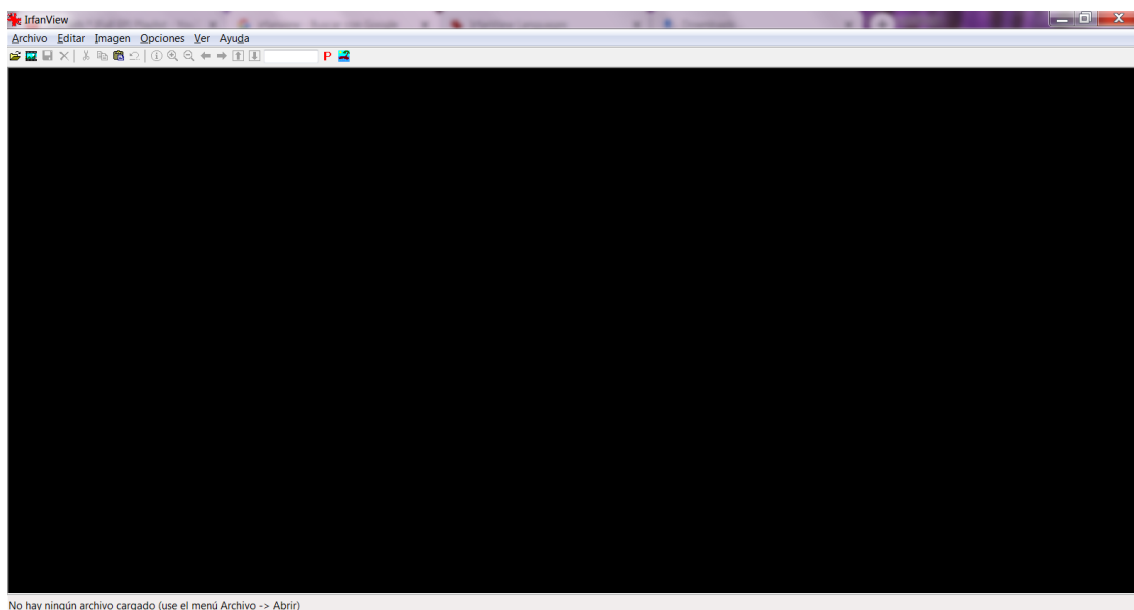
La intensidad de la luz en la platina del estereoscopio fue de 1300 lx, mientras que la intensidad en las luces guía fue de 35 0000 lx (ambos valores son aproximados). Por otra

parte, debido a que el tamaño de las alas de *P. chinai* y *P. howardi* puede variar, se trabajó con el menor aumento que brinda el estereoscopio (0.8x).

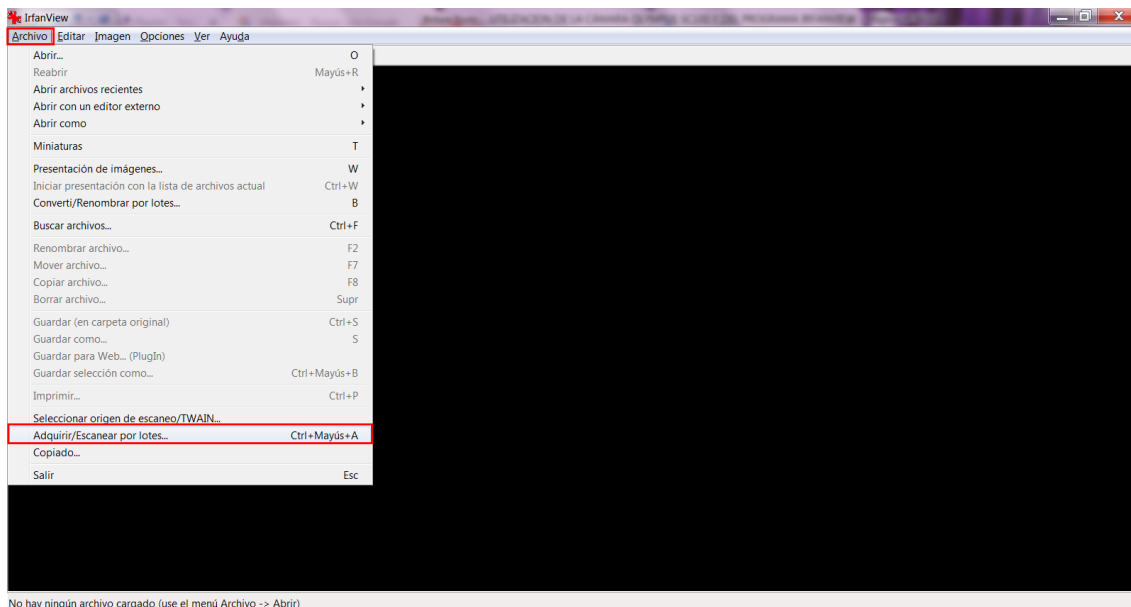
Una vez se han considerado los factores relacionados al equipo y la iluminación, puede empezar a trabajar con el software para captura de fotografías: IrfanView (v. 4.38).



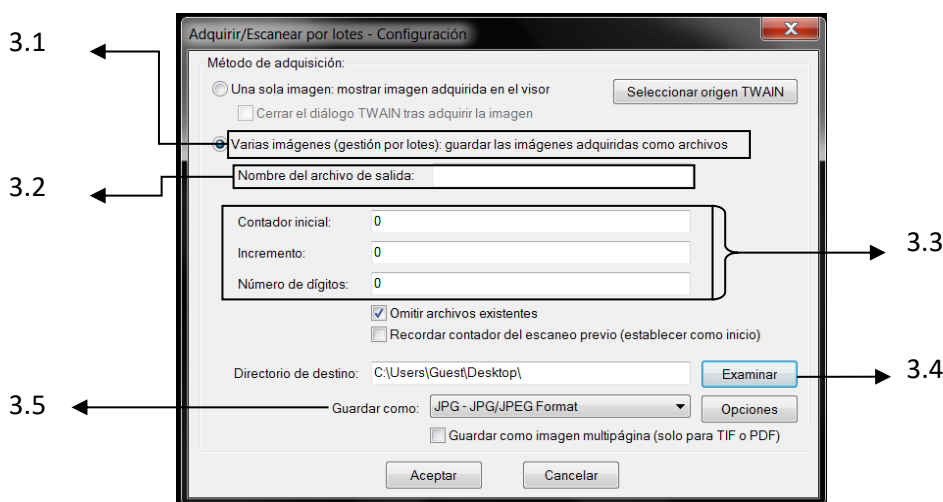
1.- Al entrar al programa, nos encontraremos con una ventana en negro:



2.- Haga clic en “**Archivo**” y escoja la opción “**Adquirir/Escanear por lotes**”:



3.- Al hacer clic, observará aparecer la siguiente ventana emergente:



3.1 “Varias imágenes (gestión por lotes)”: En esta opción, usted puede guardar su imagen como archivo en la computadora.

3.2 “Nombre de archivo de salida”: Este cuadro le da la posibilidad de darle un nombre a su imagen relleno el campo vacío.

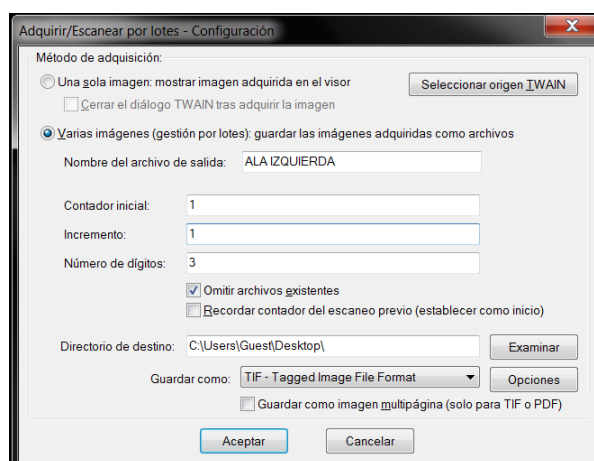
3.3. “Contador inicial”, “Incremento” y “Número de dígitos”: Facilita la enumeración automática de cada fotografía (se acopla al nombre del archivo).

3.4 “Directorio de destino”: Permite escoger el lugar donde desea que se guarde su archivo al dar clic en “**Examinar**”.

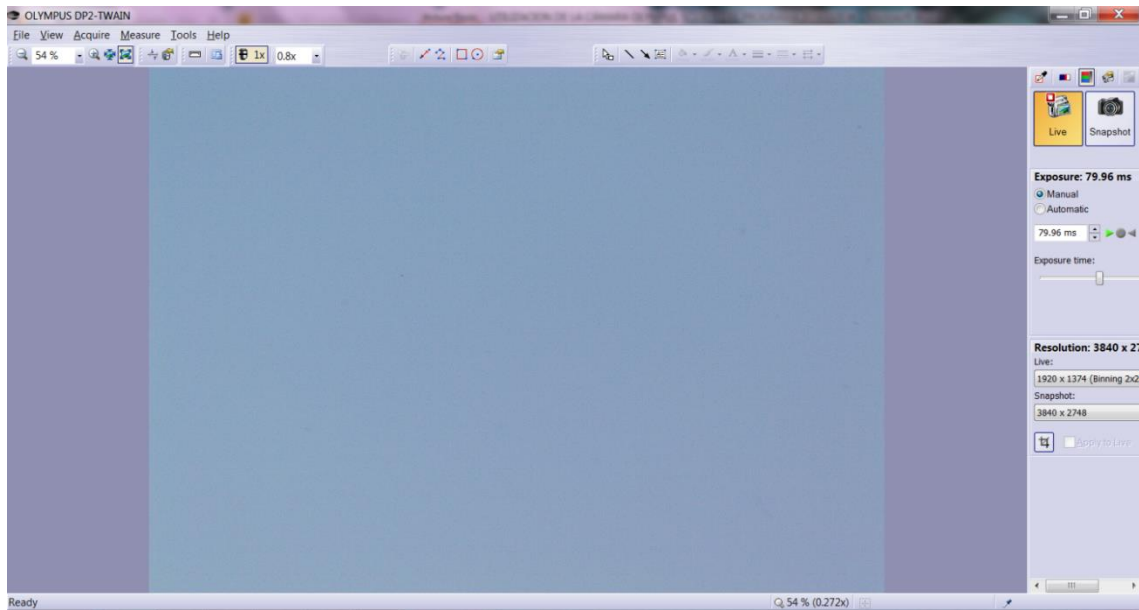
3.5 “Guardar como”: Al presionar sobre la flecha negra que sigue al texto

¡ATENCIÓN!: IrfanView guarda las imágenes en el formato JPG/JPEG por defecto. A pesar de que es un formato ampliamente utilizado que brinda una calidad de imagen relativamente buena, el proceso de compresión que sufre al guardarse como imagen sacrifica información a cambio de entregarnos un archivo liviano (Amura, 2004). Si necesita editar sus imágenes en un software especializado (Photoshop o Lightroom) o capturar detalles puntuales, se recomienda utilizar el formato RAW o TIFF (**Ver NOTA 1**).

4.- Para el siguiente ejemplo, tome en cuenta estos parámetros:

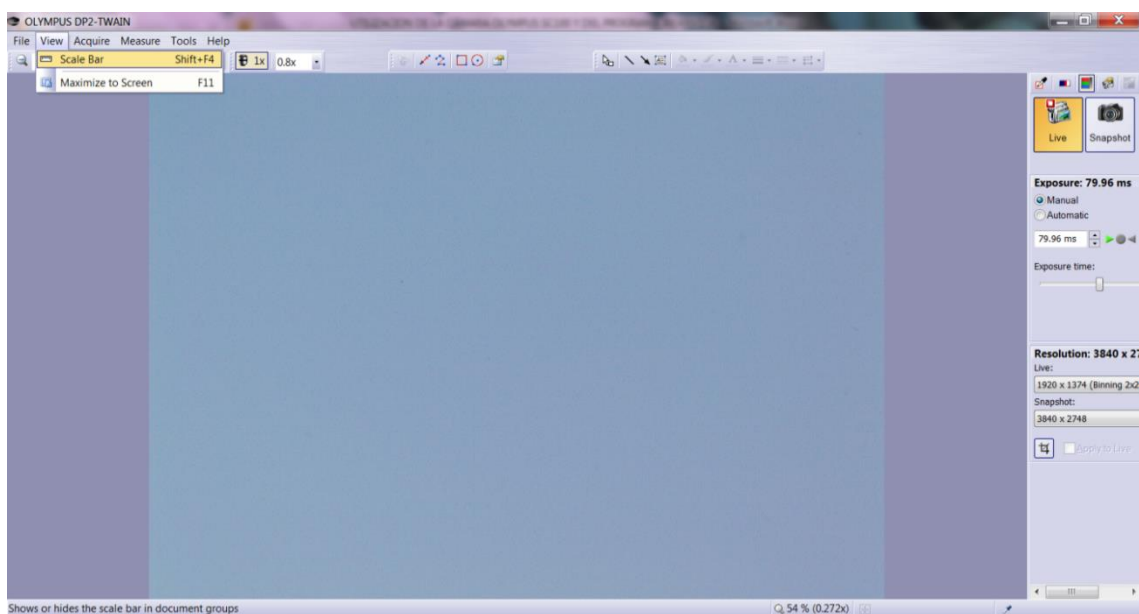


5.- Cuando pulse aceptar, se desplegará la siguiente ventana:

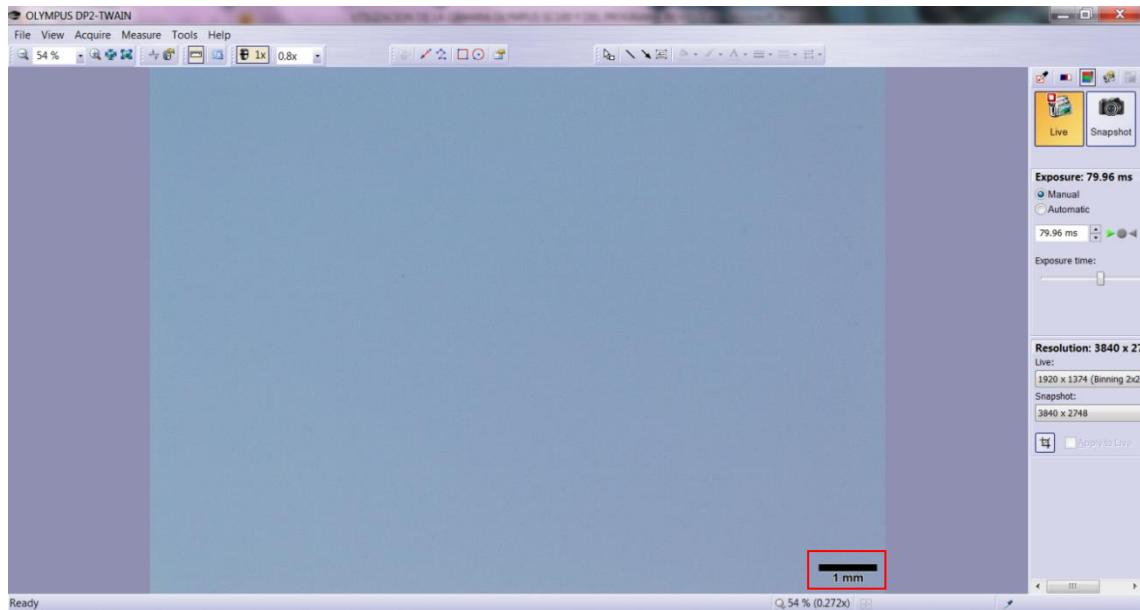


La cámara SC100 incluye un software que trabaja en conjunto con IrfanView para realizar la captura de imágenes. Si bien el programa nos permite realizar una diversa gama de tareas, tales como: medir la distancia entre dos puntos, el área de un cuadrado o el área de un círculo, también incluye una escala ajustable.

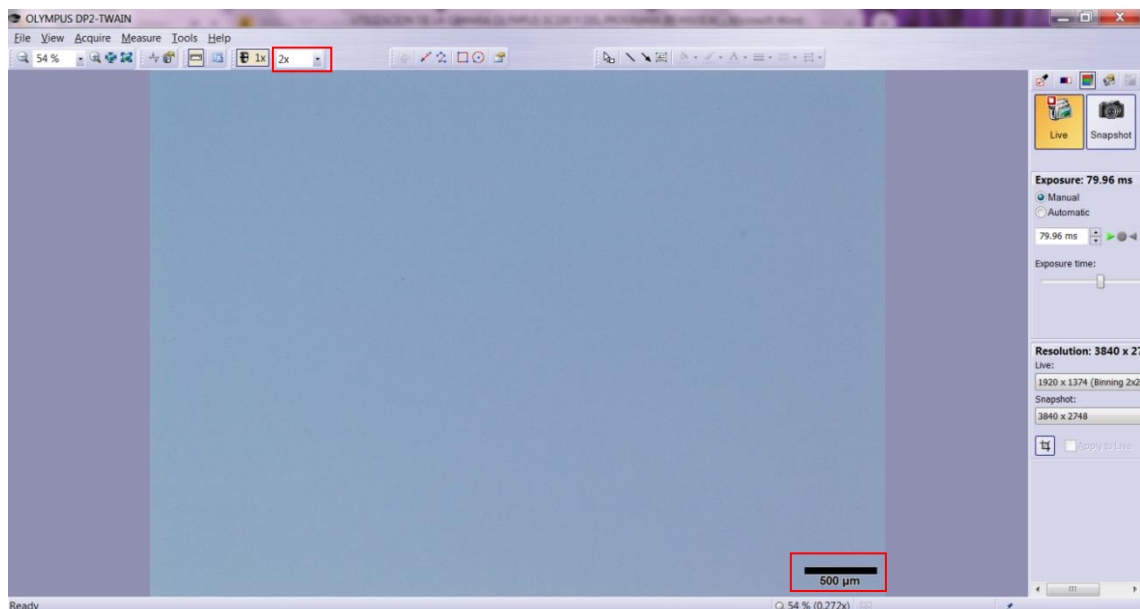
6.- Haga clic en “**View**” y seleccione “**Scale Bar**”:



Ahora, podrá observar una barra en la parte inferior derecha de su pantalla:

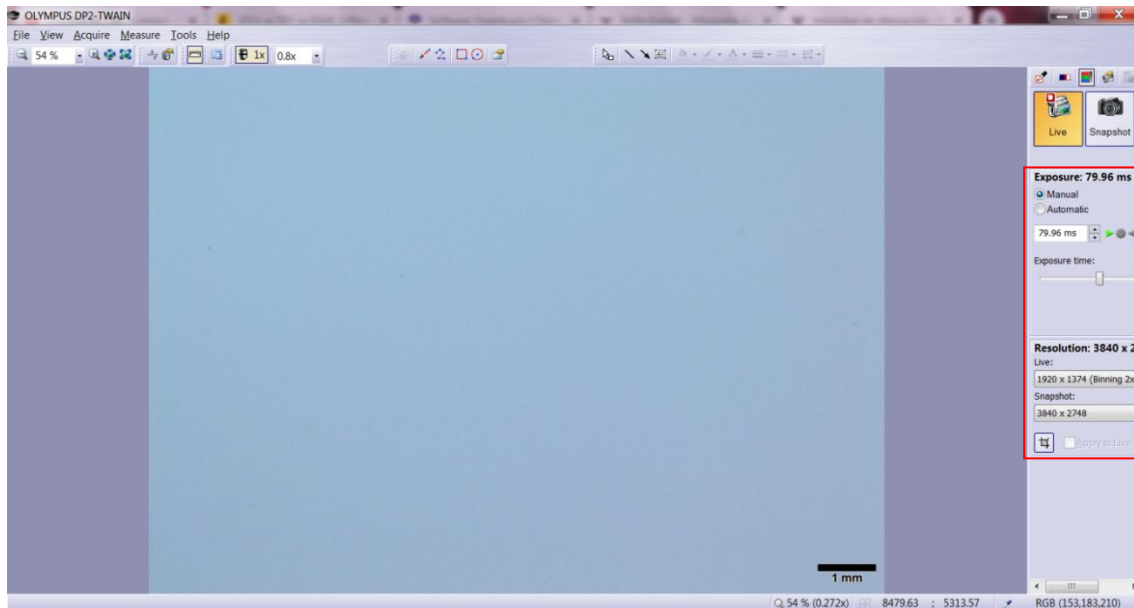


El programa ajusta el tamaño de la barra de escala al aumento especificado. Así, si modifica la magnificación a 2x, la escala cambia:



¡ATENCIÓN!: Recuerde que la magnificación de su estereoscopio en la rueda de zoom debe coincidir con la magnificación especificada en la sección correspondiente del programa; caso contrario, cuando exporte su imagen para posterior análisis, la escala estará incorrecta.

7.- También puede modificar el tiempo de exposición de su fotografía, así como la resolución en tiempo real y la resolución de la fotografía exportada. Dicha información la puede encontrar en la parte derecha de la ventana:



8.- Adicionalmente, tiene la opción de cambiar el tiempo de exposición manual o automáticamente. Ahora bien, el modo automático ajusta la exposición de acuerdo a lo que el programa cree conveniente en función de la fuente de iluminación, no obstante, incluso si la luz es uniforme, el color y la reflectancia del objeto pueden modificar los valores de exposición.

Este factor es especialmente importante cuando se desea trabajar en programas de edición de fotografía, donde la sobreexposición de la luz resulta en información que se pierde y no se puede recuperar.



En consecuencia, se escogió el modo manual y se trabajó con un tiempo de exposición definido (79.96 ms) para todas las alas de ambas especies.

9.- En cuanto a la resolución se refiere, la alternativa que escojamos para la imagen en tiempo real dependerá de la potencia de nuestra computadora, su tarjeta gráfica y su resolución máxima. Algunos programas son capaces de soportar resoluciones excelentes a cambio de un retraso entre el movimiento del objeto en la realidad y la acción que ocurre en pantalla.

En este caso, se escogió trabajar con una resolución en vivo de 1920 x 1374 píxeles. Mientras que una resolución mayor ralentiza drásticamente el movimiento, una resolución menor hace la pantalla de visualización demasiado pequeña.



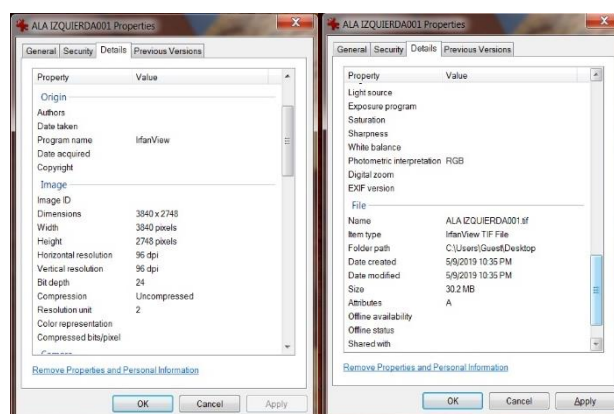
10.- Por otro lado, la resolución de exportación de la imagen tendrá un efecto en la calidad y tamaño del archivo (**Ver NOTA 2**). Pese a que trabajar con archivos grandes puede consumir tiempo valioso, la cantidad de detalle que se obtiene merece la pena.



11.- Finalmente, presione F8 o haga clic sobre “Snapshot”:



12.- Comprobemos la presencia del archivo con todos los parámetros que indicamos inicialmente:



NOTA 1: En fotografía, los formatos RAW y TIFF se consideran los mejores para trabajar en edición debido a que poseen toda la información que se puede capturar en una imagen. Con todo, existe una diferencia crucial entre ellos (Schurman, 2019).

Por su parte, RAW (crudo en inglés) es el “negativo digital” de una fotografía, puesto que no cambia ningún atributo del archivo y puede llegar a ser extremadamente pesado. Aunque a simple vista podría considerarse una fotografía, en realidad es un archivo que contiene toda la información no procesada del sensor de una cámara (Schurman, 2019) (Whaley, 2016).

En cambio, TIFF (Tagged Image File Format, por sus siglas en inglés), es un formato de compresión que utiliza el algoritmo LZW (Lempel-Ziv-Welch) para evitar la pérdida de información (Schurman, 2019), (CVISION, 2019).

NOTA 2: Considere que, independientemente de la resolución en tiempo real que escoja, al seleccionar una resolución menor a la máxima para realizar la exportación de la imagen, el programa puede subir arbitrariamente la exposición aun trabajando en modo manual. Por tanto, debe tener cuidado al momento de escoger la resolución de ambos campos.

ANEXO 9. UTILIZACIÓN DE ADOBE PHOTOSHOP LIGHTROOM PARA EDICIÓN DE FOTOGRAFÍAS

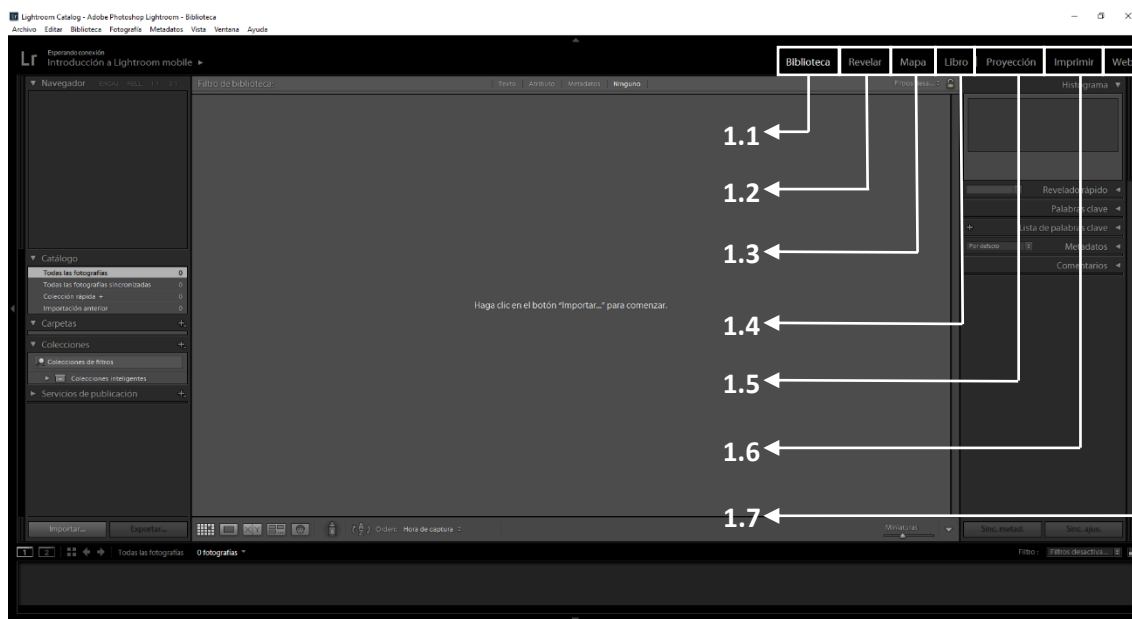
PROTOCOLO PARA LA UTILIZACIÓN DE ADOBE PHOTOSHOP LIGHTROOM EN LA VISUALIZACIÓN DE INTERSECCIONES ENTRE VENAS EN ALAS DE TRIATOMINOS

Adobe Photoshop Lightroom es un programa de edición fotográfica que permite una amplia gama de posibilidades al momento de modificar las propiedades de una imagen. Además, cuenta con una interfaz que hace del flujo de trabajo en fotografía una tarea sencilla y ordenada (Adobe, 2019).

Considérese que el programa soporta varios formatos de imagen (JPEG, DNG, RAW, TIFF). No obstante, es recomendable trabajar con RAW y TIFF debido a la gran cantidad de información que pueden llegar a almacenar (**Ver Anexo 8, Nota 1**).

Para este protocolo trabajaremos con el formato TIFF.

1.- Al hacer doble clic en el icono del programa, se encontrará con la siguiente ventana:



El programa se compone de 7 módulos; cada uno juega un papel esencial en el flujo de trabajo. Así, tenemos:

1.1 “Biblioteca”: Permite gestionar el origen de las imágenes, la adición de nuevas fotografías al proyecto y la exportación de archivos.

1.2 “Revelar”: Contiene todas las herramientas para modificar iluminación, sombras, ruido, enfoque y color en una fotografía.

1.3 “Mapa”: Si las fotos se han tomado con coordenadas GPS, este módulo las clasificará de acuerdo a su ubicación.

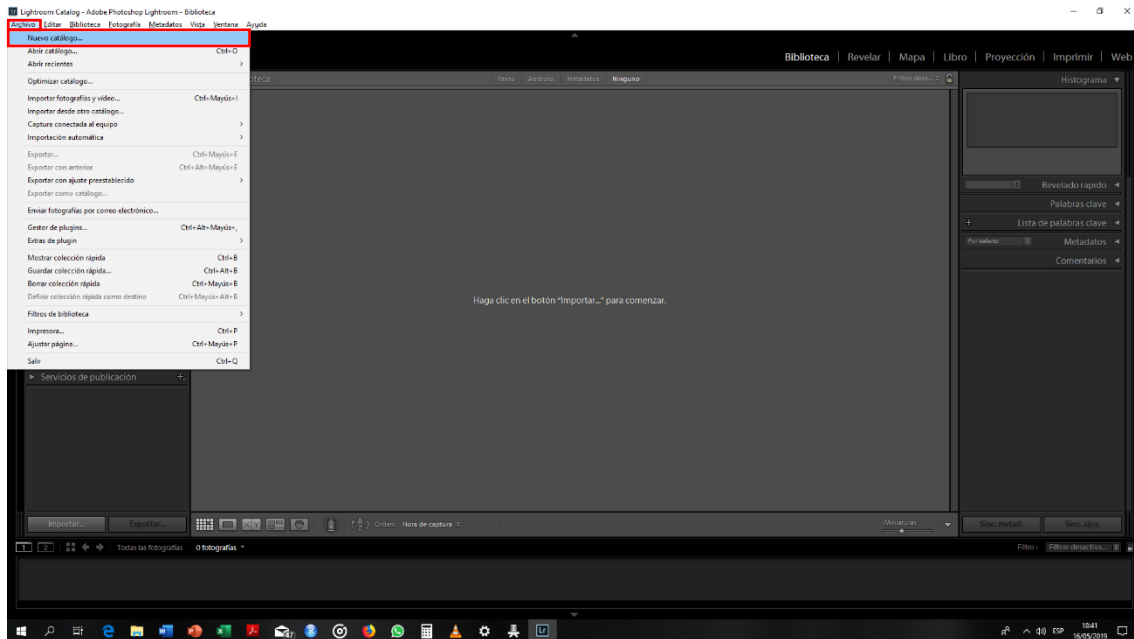
1.4 “Libro”: Facilita la creación de un álbum virtual que puede ser exportado e impreso.

1.5 “Proyección”: Da paso a la creación de presentaciones con diapositivas o videos a partir de fotografías.

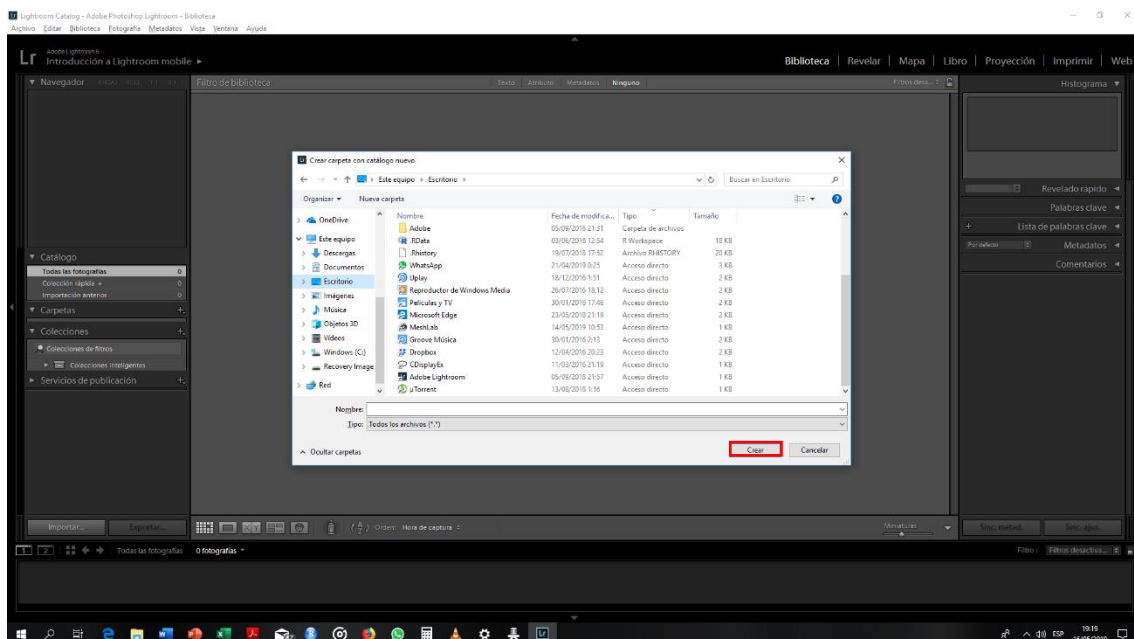
1.6 “Imprimir”: Este módulo da paso a la modificación de los parámetros de impresión.

1.7 “Web”: Está diseñado para utilizar las fotografías en la creación de una página web.

2.- Para comenzar un nuevo proyecto, primero debe abrir un nuevo catálogo. Haga clic en “**Archivo**” y en “**Nuevo catálogo...**”



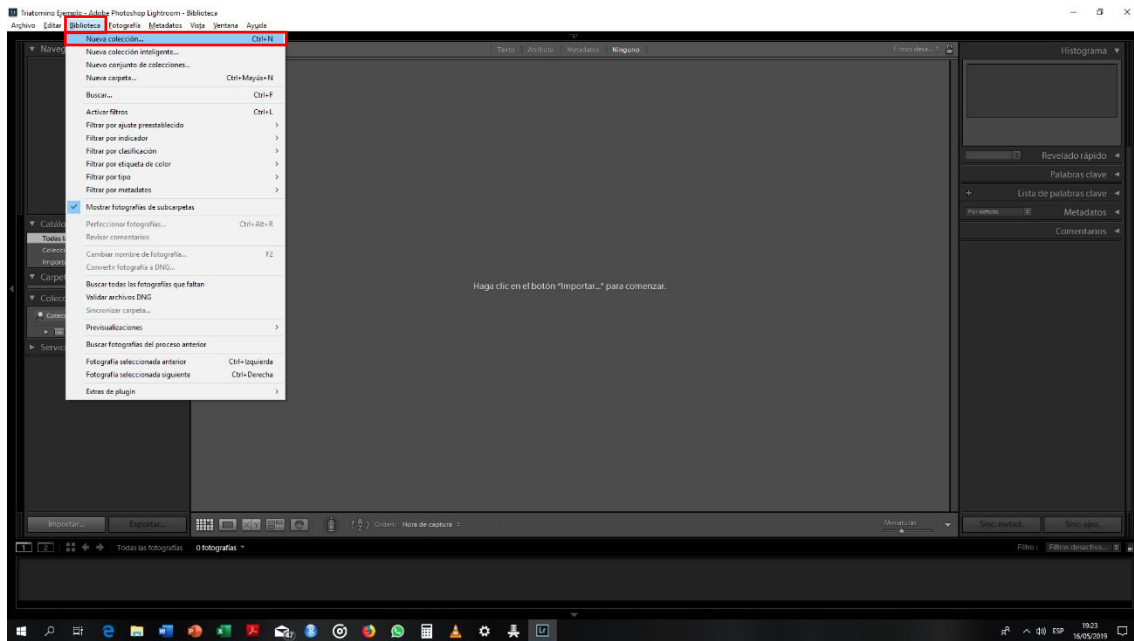
3.- Se desplegará la siguiente ventana:



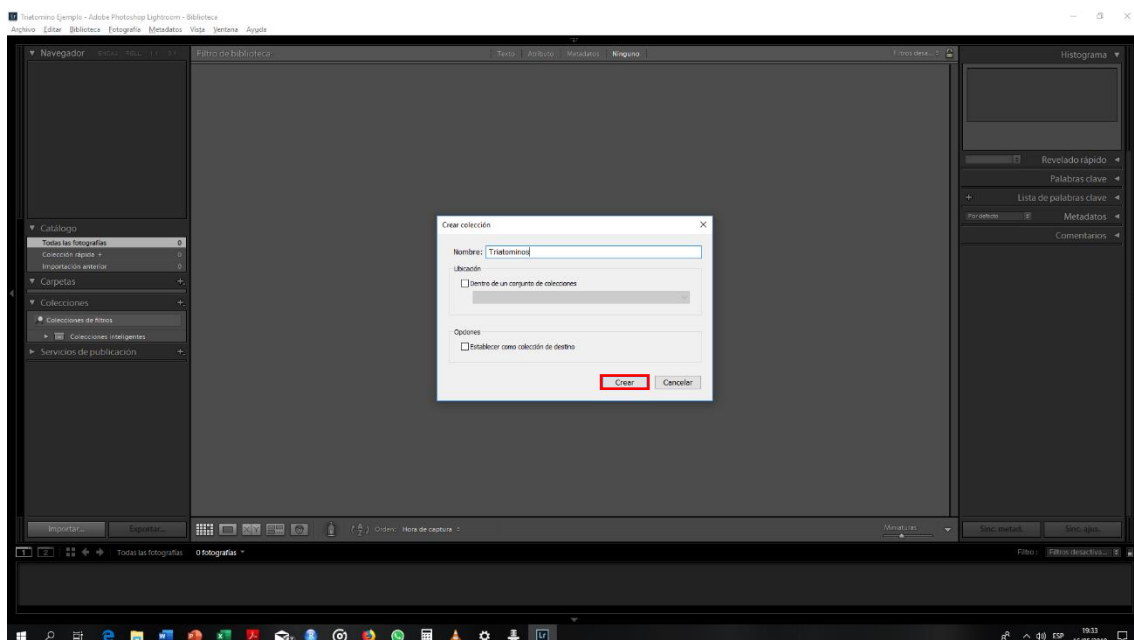
Escoja el lugar donde desee guardar su catálogo, asígnele un nombre y presione “**Crear**”.

4.- En este punto, el programa se cerrará y se volverá a abrir (puede ver cómo el nombre del catálogo cambió de “Lightroom Catalog” a “Triatomino Ejemplo” en el extremo superior izquierdo de su pantalla). Ahora, vamos a crear una colección donde podamos guardar nuestro trabajo:

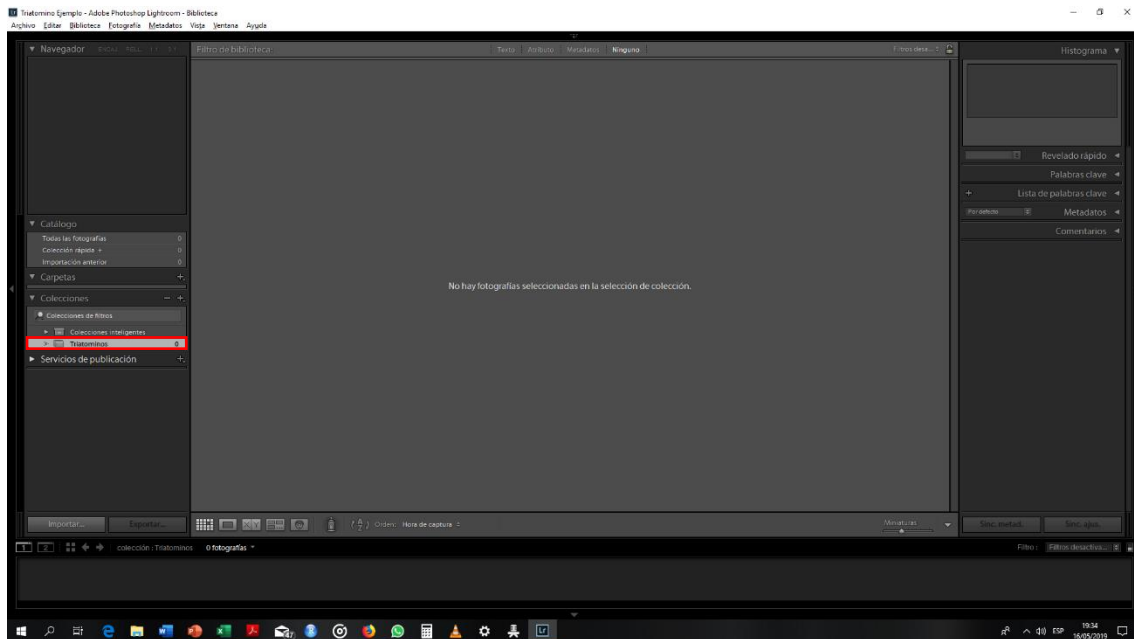
Haga clic en “**Biblioteca**”, luego en “**Nueva colección**”:



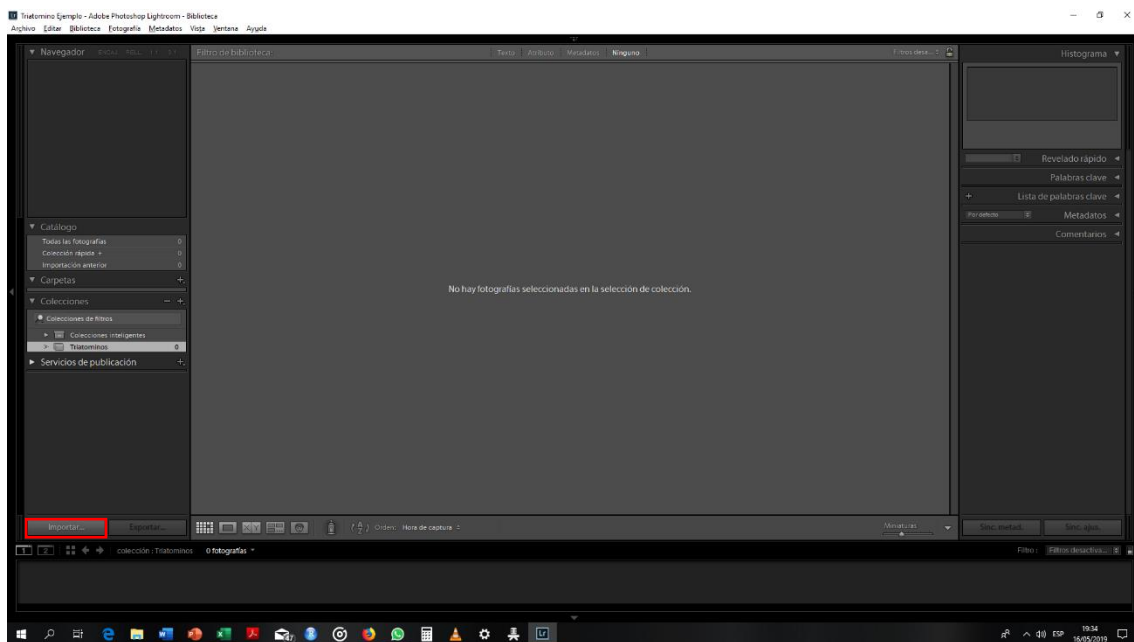
Coloque un nombre a su colección y presione “**Crear**”. En este caso, vamos a llamar a la colección “Triatominos”.



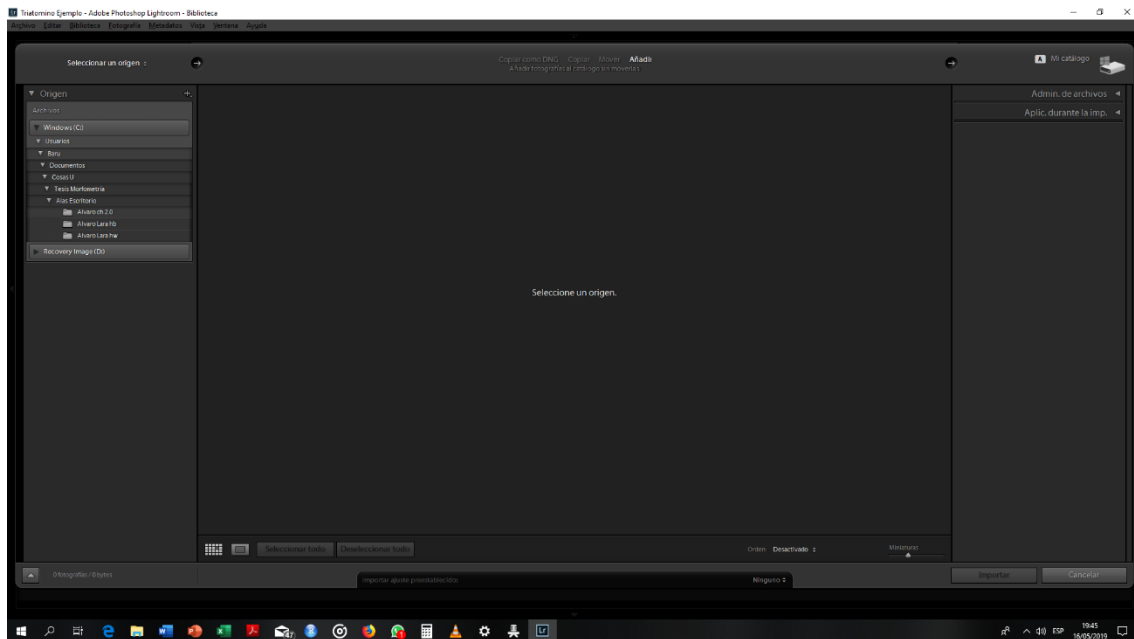
Podrá observar su colección en la parte izquierda de la pantalla:



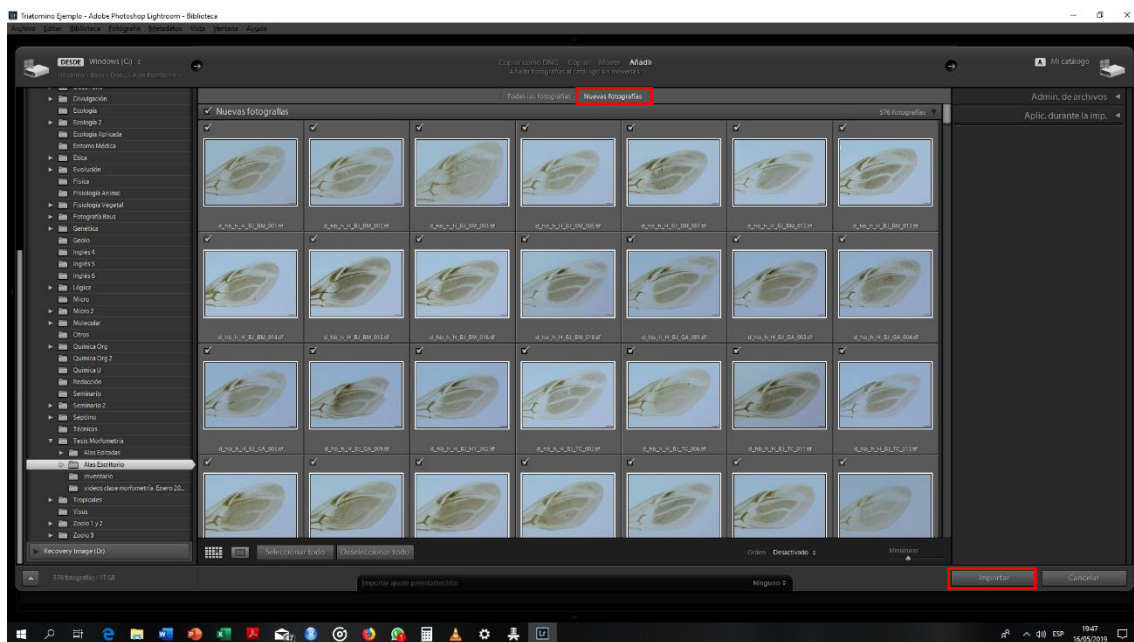
5.- Ahora, vamos a introducir nuestras fotos en el programa. Para ello, haga clic en **“Importar”**:



Se desplegará la siguiente ventana:

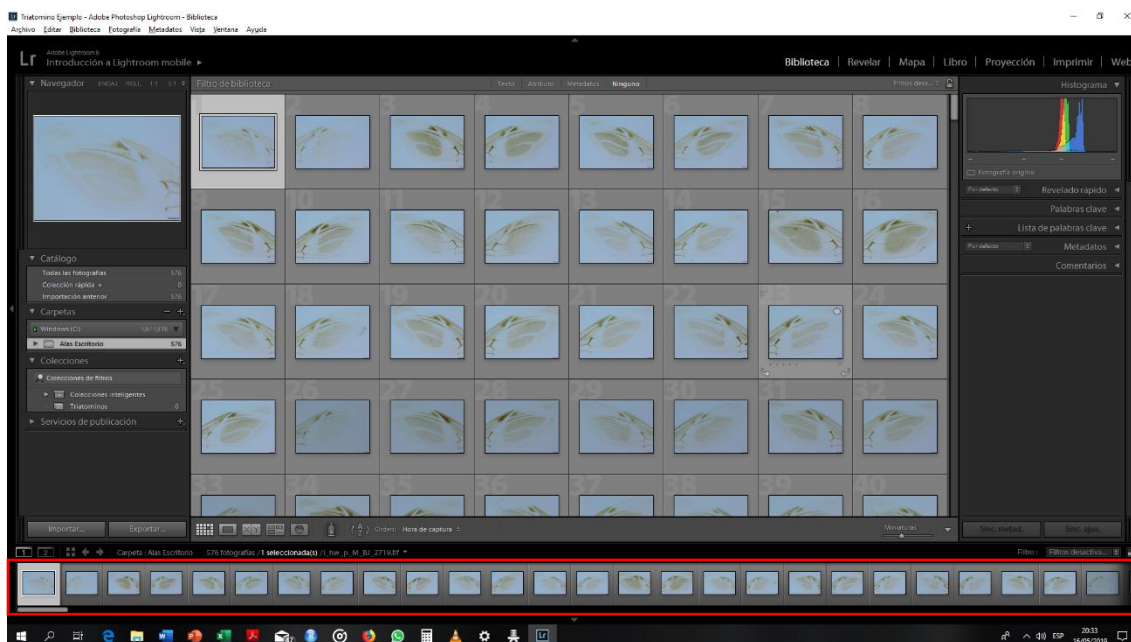


En la columna de la izquierda, seleccione la carpeta donde se encuentren sus fotos y haga clic en “Importar”:

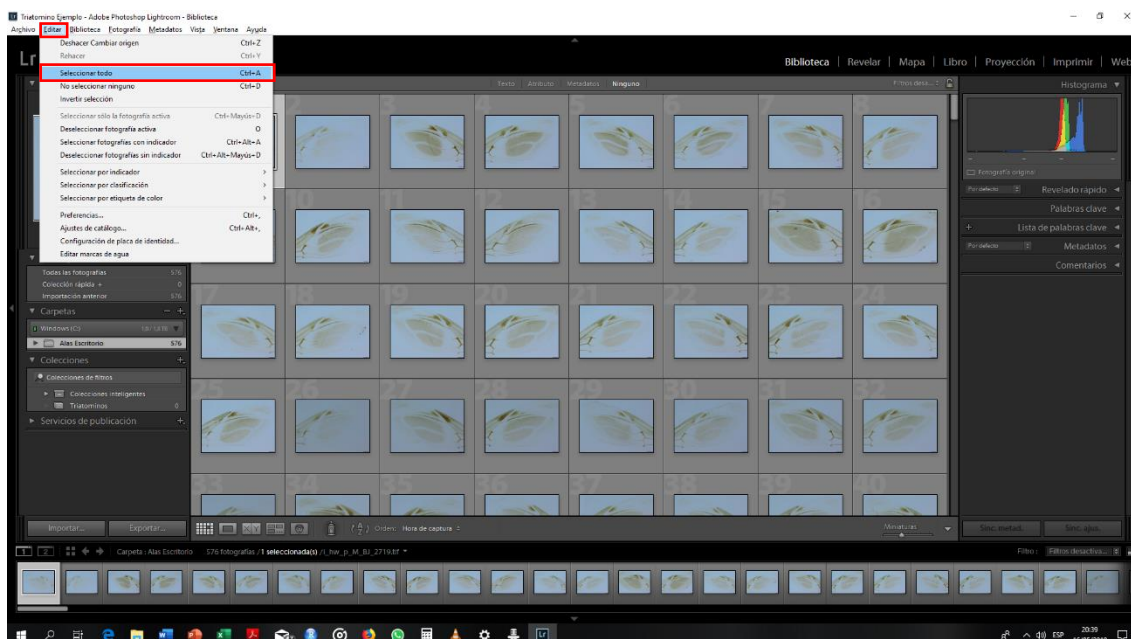


¡ATENCIÓN!: Si desea importar nuevas fotografías a su catálogo en futuras sesiones, no olvide escoger la opción “**Nuevas fotografías**”.

A continuación, podrá observar que todas las fotos se añaden a una barra en la parte inferior de la pantalla:

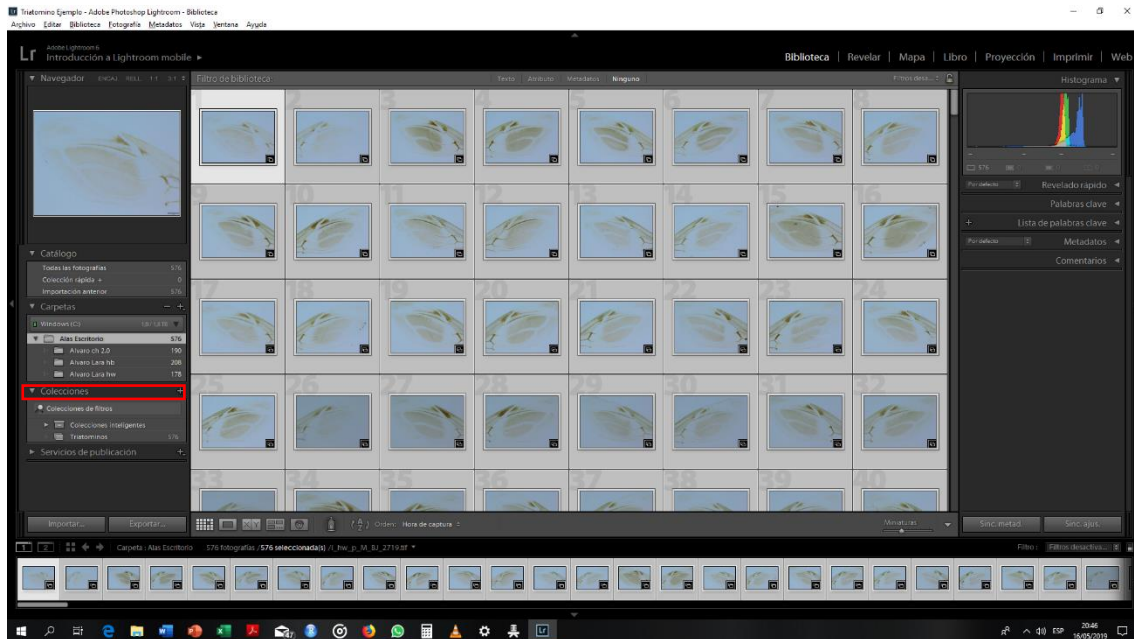


6.- Con el fin de añadir nuestras fotos al catálogo “Triatominos”, debemos hacer clic en “Editar” y después en “Seleccionar Todo”:



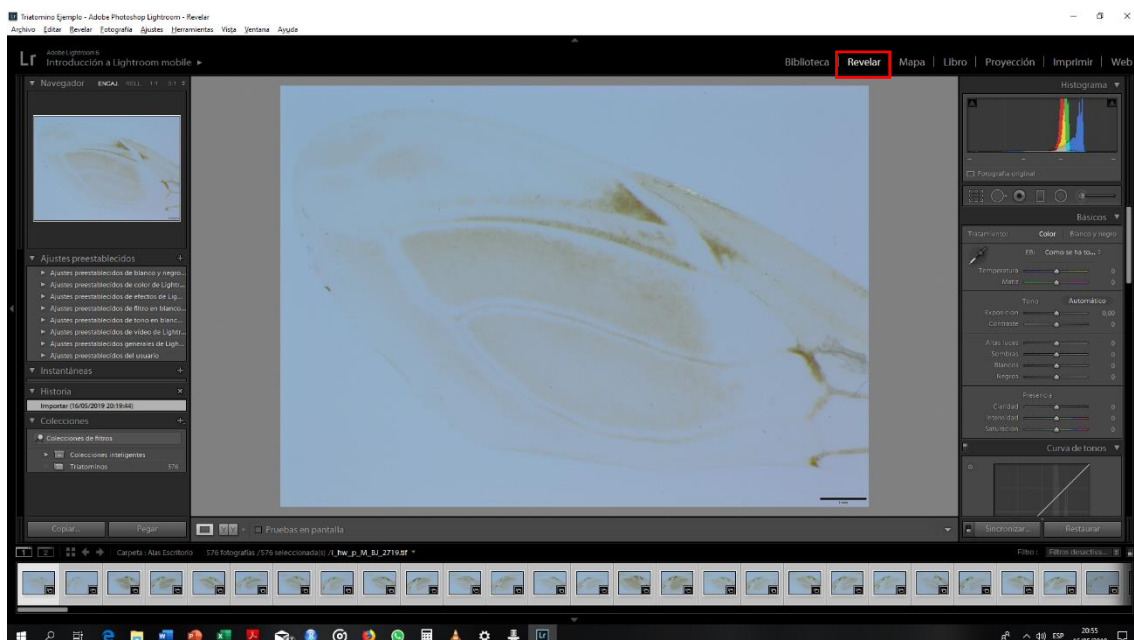
También puede utilizar el atajo de teclado “Ctrl A” para seleccionar todas sus fotografías.

Después, arrastre sus fotos desde la pantalla general o desde la barra inferior hacia la carpeta que contiene la colección:



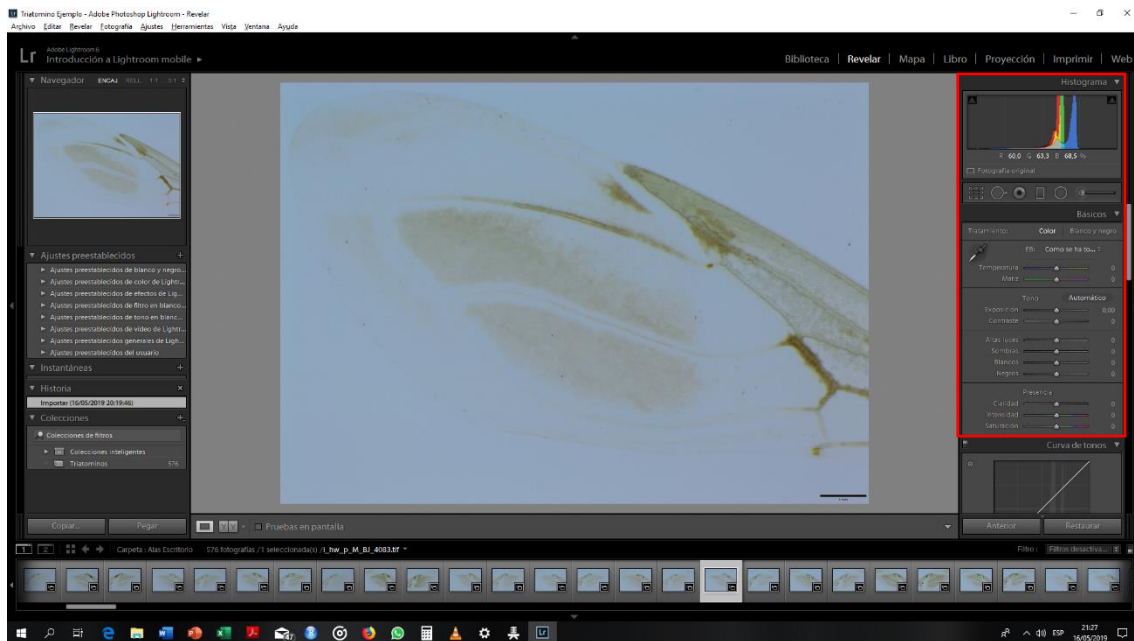
Ahora, cada una de sus fotos presenta un icono negro en la parte inferior de la pantalla; esto significa que sus imágenes fueron añadidas exitosamente a la colección.

7.- Una vez que hemos añadido todo a la colección, pasemos al módulo “**Revelar**” para el proceso de edición y exportación. Haga clic en Revelar y observe las opciones que se despliegan ante usted:



En la columna derecha de su pantalla, podrá observar opciones para modificar las propiedades de su fotografía (exposición, contraste, ruido, intensidad, saturación, etc). En algunos casos, los puntos de cruce entre venas se pueden ver claramente; no obstante, no es el caso para todas las alas.

8.- Escojamos un ala cuyas venas sean poco perceptibles a simple vista y hagamos algunos cambios a los ajustes de revelado:



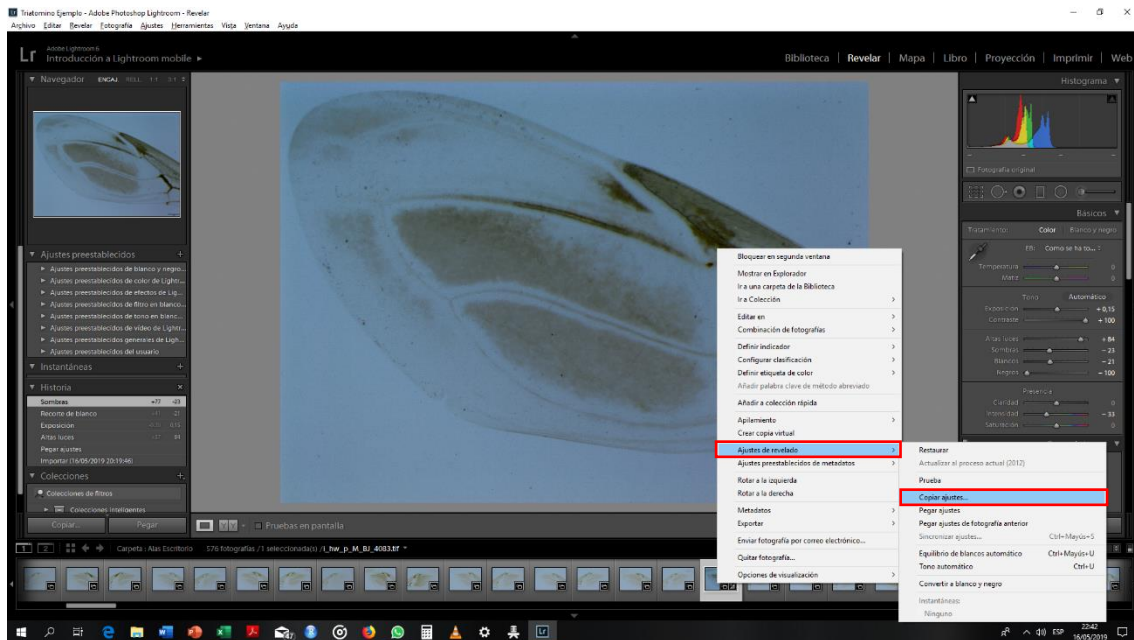
Modificamos algunos parámetros...



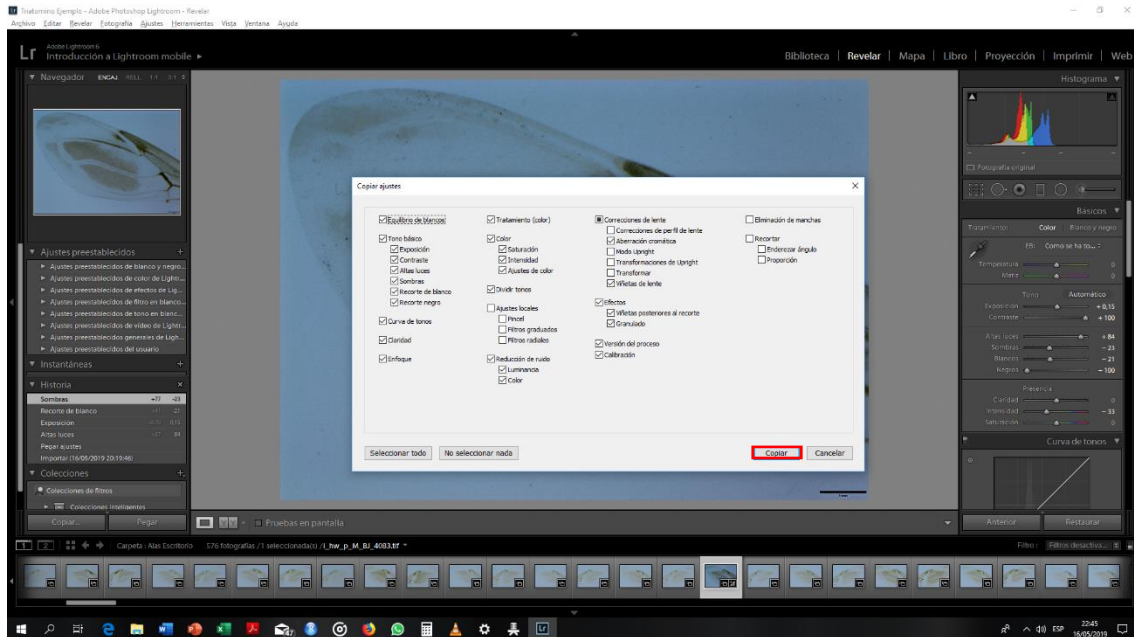
Y listo, ya podemos visualizar de mejor manera los puntos de intersección entre venas. Recuerde, una foto editada presenta un icono en la parte inferior derecha de la miniatura, al lado del indicador de adición a la colección.

9.- Tomando en cuenta que todas las fotos fueron tomadas con una iluminación relativamente uniforme y que podría haber más de un ala cuyas venas son poco perceptibles, aplicar individualmente los mismos ajustes de revelado a cada foto sería una tarea demasiado larga.

Por este motivo, Lightroom incluye una función que permite tomar los ajustes de una foto y aplicárselo a cuantas imágenes deseemos a la vez. Para ello, haga clic derecho sobre la imagen cuyos ajustes desee trasladar y coloque el ratón sobre “**Ajustes de revelado**”. Debería poder observar una nueva ventana con opciones; dentro de dicha ventana, seleccione “**Copiar ajustes...**”:



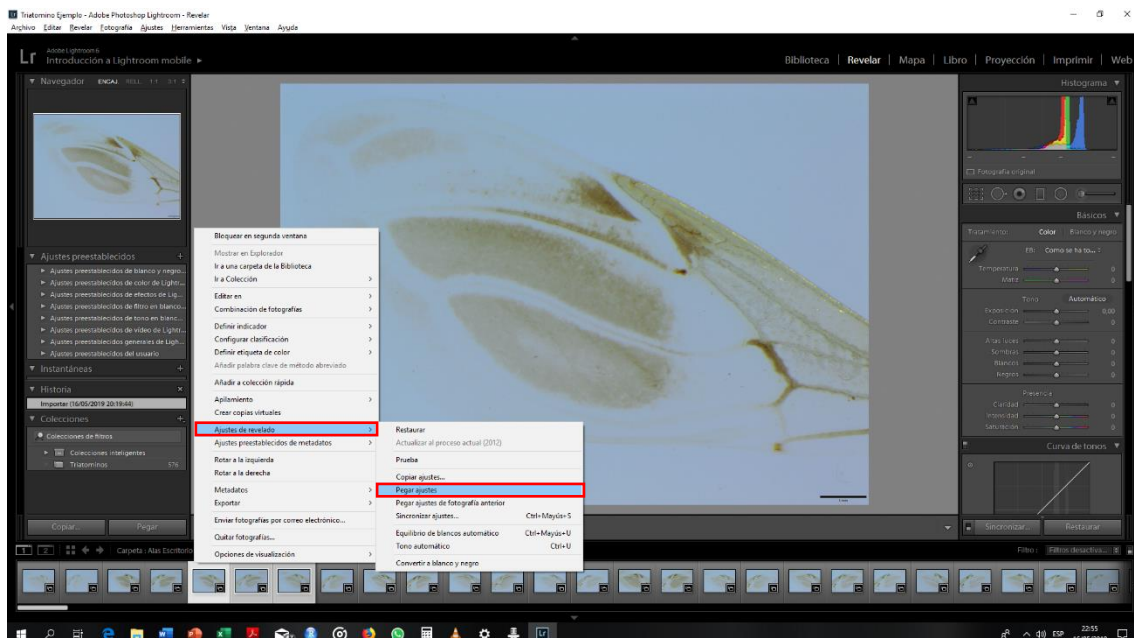
Aparecerá una ventana emergente:



Aquí, usted puede seleccionar los parámetros que desee transferir a otras fotografías.

Cuando haya escogido sus ajustes, haga clic en “**Copiar**”:

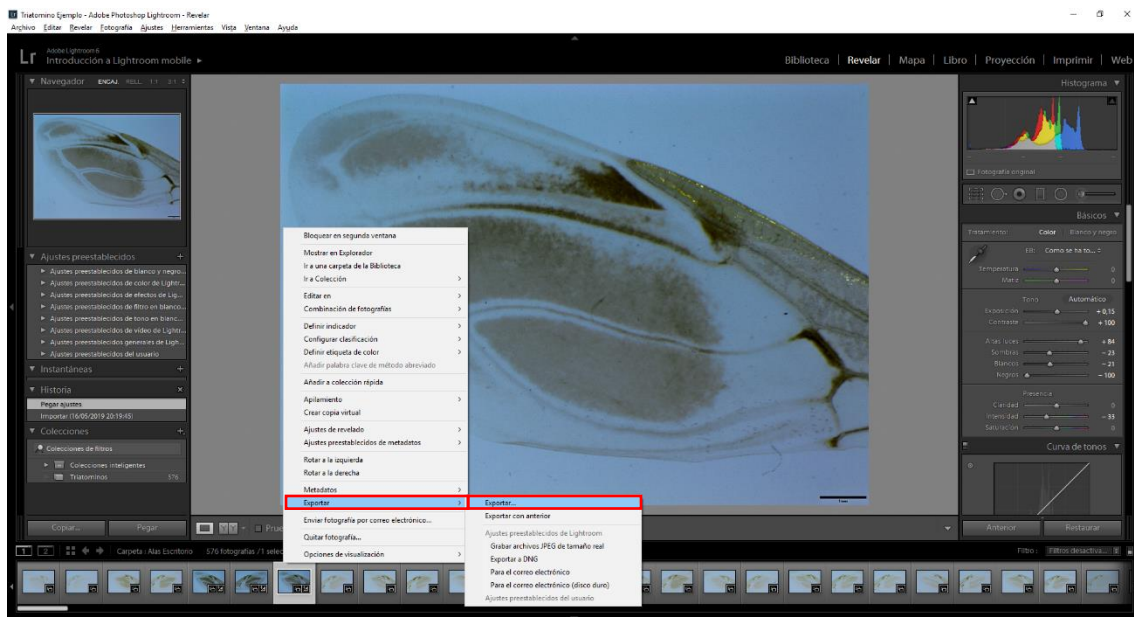
Seleccione todas las fotos a las que quiera aplicar los ajustes copiados y haga clic derecho sobre cualquiera. Vamos a dirigirnos hacia el mismo punto que se describió al inicio del paso 9; empero, esta vez vamos a hacer clic sobre “**Pegar ajustes...**”



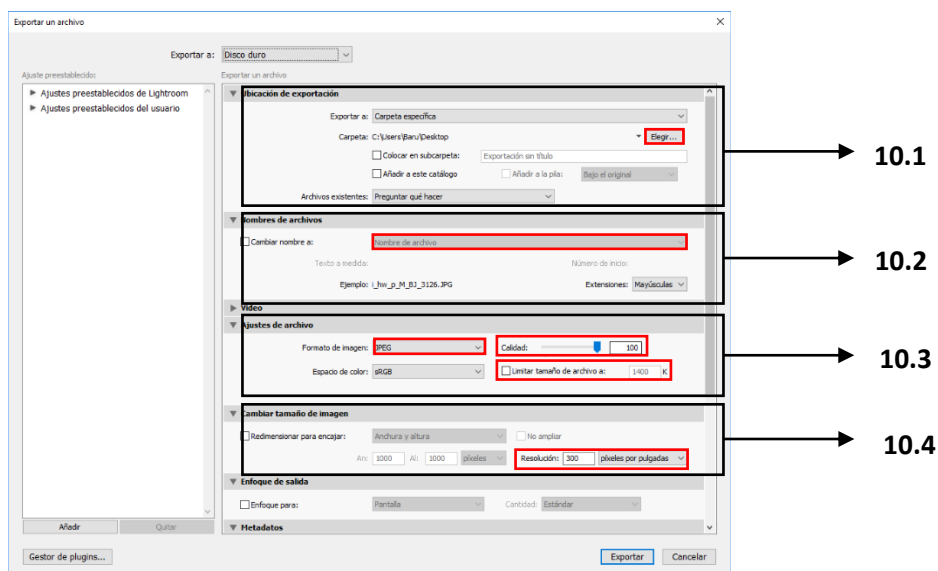
Si desea visualizar el antes y el después de la edición en su fotografía, haga clic sobre el icono que se encuentra al lado izquierdo de la opción “**Pruebas en pantalla**”. Al presionar varias veces, podrá alternar entre distintas opciones de comparación:



10.- Una vez hemos realizado la edición, pasemos a la exportación de los archivos. Elija sus fotos, haga clic derecho y presione sobre “**Exportar**”:



Aparecerá una nueva ventana (los ajustes más importantes se detallan a continuación):



10.1 “Ubicación de exportación”: Aquí puede escoger la carpeta de destino de sus fotografías al presionar en “Elegir”.

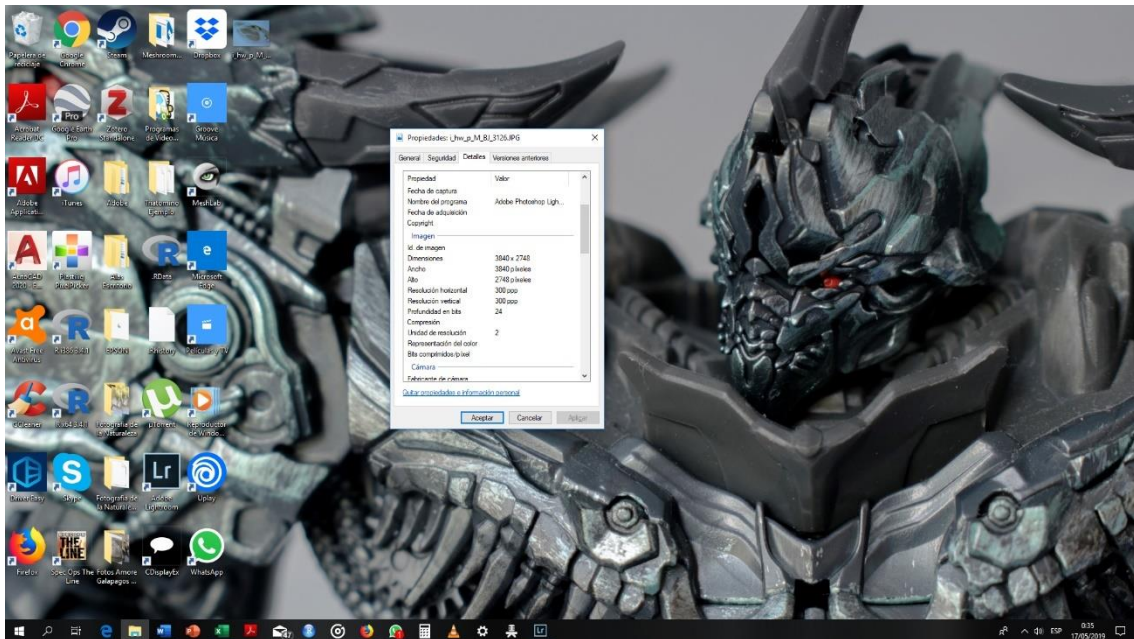
10.2 “Nombres de archivos”: Puede proporcionarle a su archivo un nombre nuevo o conservar el nombre original.

10.3 “Ajustes de archivo”: En esta sección puede cambiar el formato de imagen (DNG, JPEG, TIFF), la calidad de exportación e incluso limitar el tamaño de su archivo.

Es recomendable trabajar con una calidad máxima (100) para garantizar la mayor cantidad de detalle en la fotografía. En este caso, se escogió el formato JPEG; ya que la compresión redujo el tamaño de la imagen a una tercera parte del original, no hizo falta limitar el tamaño del archivo.

10.4 “Cambiar tamaño de imagen”: Finalmente, podemos redimensionar la imagen a nuestro gusto y modificar la resolución. Lightroom exporta las fotos a una resolución de 72 ppp (píxeles por pulgada) por defecto; sin embargo, este valor puede ser modificado acorde a su uso. Si desea observar sus imágenes en cualquier pantalla, la resolución por defecto basta. Pero, dado caso que el objetivo sea la impresión, es preferible exportar el archivo entre los 240 y los 300 ppp (Arias, 2019).

11.- Presione en “**Expotar**” y compruebe que su archivo se encuentra en el lugar correcto y cumple con todas las especificaciones dadas:



ANEXO 10. UTILIZACIÓN DE XYOM PARA LA DIGITALIZACIÓN DE LANDMARKS EN ALAS DE TRIATOMINOS

PROTOCOLO PARA LA DIGITALIZACIÓN DE LANDMARKS EN ALAS DE TRIATOMINOS MEDIANTE EL USO DEL SOFTWARE XYOM

El software XYOM es una versión online actualizada del programa CLIC para análisis morfométrico (Dujardin, 2019). Con el objeto de obtener resultados estadísticos que permitan realizar inferencias de carácter biológico, el primer paso es informar al programa cómo se encuentran distribuidos los puntos de interés en la estructura que deseamos analizar.

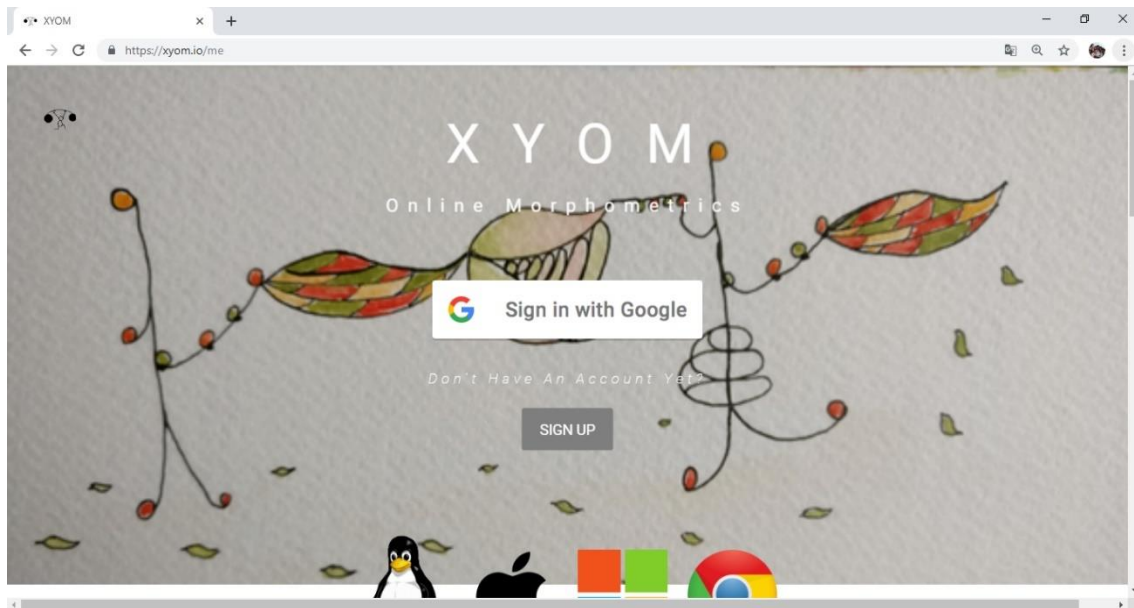
Este proceso se conoce como **DIGITALIZACIÓN**:

¡ATENCIÓN!: Antes de empezar, debe tener una cuenta activa en Google Drive; XYOM guarda todo su progreso en esta plataforma de almacenamiento y requerirá que aprenda a familiarizarse con su uso.

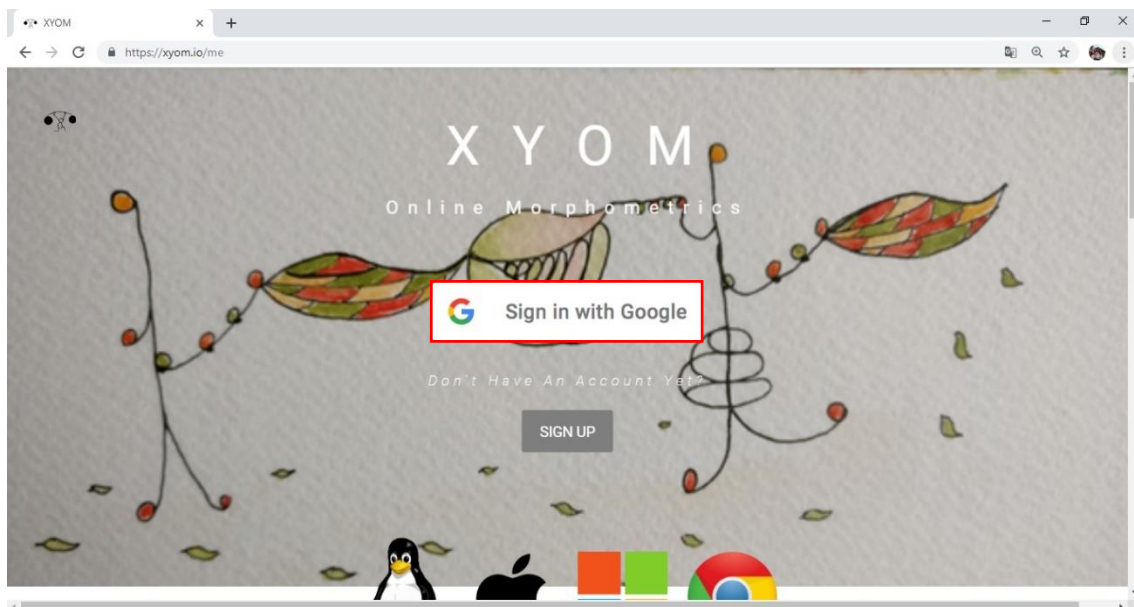
Dependiendo de la resolución y tamaño de su pantalla, tendrá que acercar o alejar el zoom de su navegador para visualizar todos los elementos. Es recomendable trabajar con un zoom único cuando realice la digitalización. Vamos a trabajar con un zoom del 110%.

Por otro lado, asegúrese de que todas las fotos que va a digitalizar se encuentran subidas a la plataforma Google Drive. Es preferible clasificarlas en carpetas, de manera que pueda acceder a ellas fácilmente.

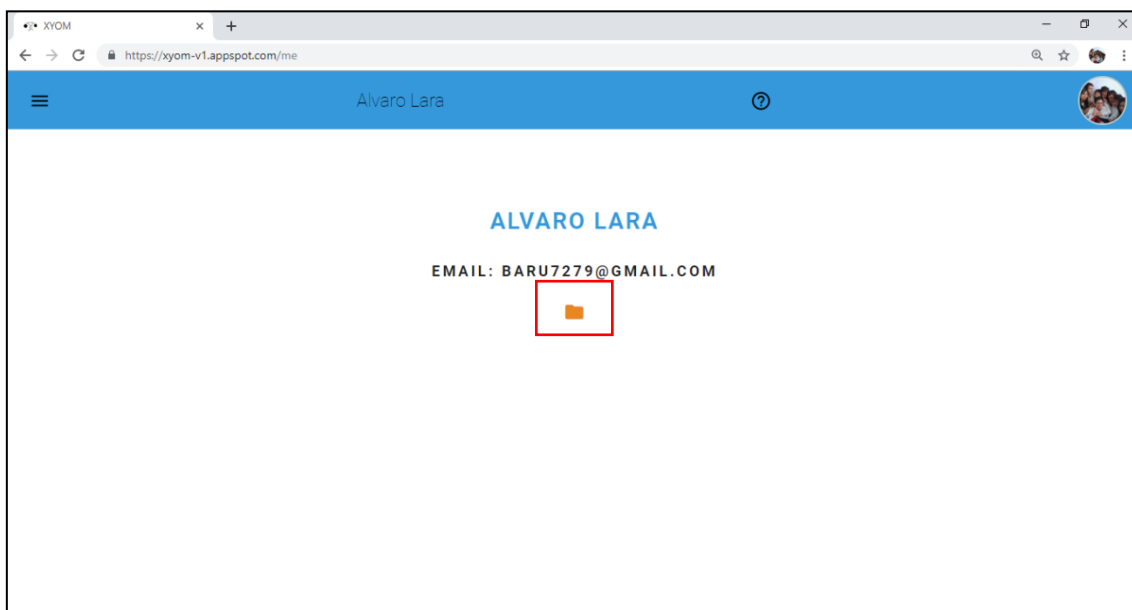
1.- Vaya a la siguiente dirección electrónica: <https://xyom.io/>. Aparecerá la siguiente pantalla:



2.- Haga clic en la opción “**Sign in with Google**” e ingrese a su cuenta:



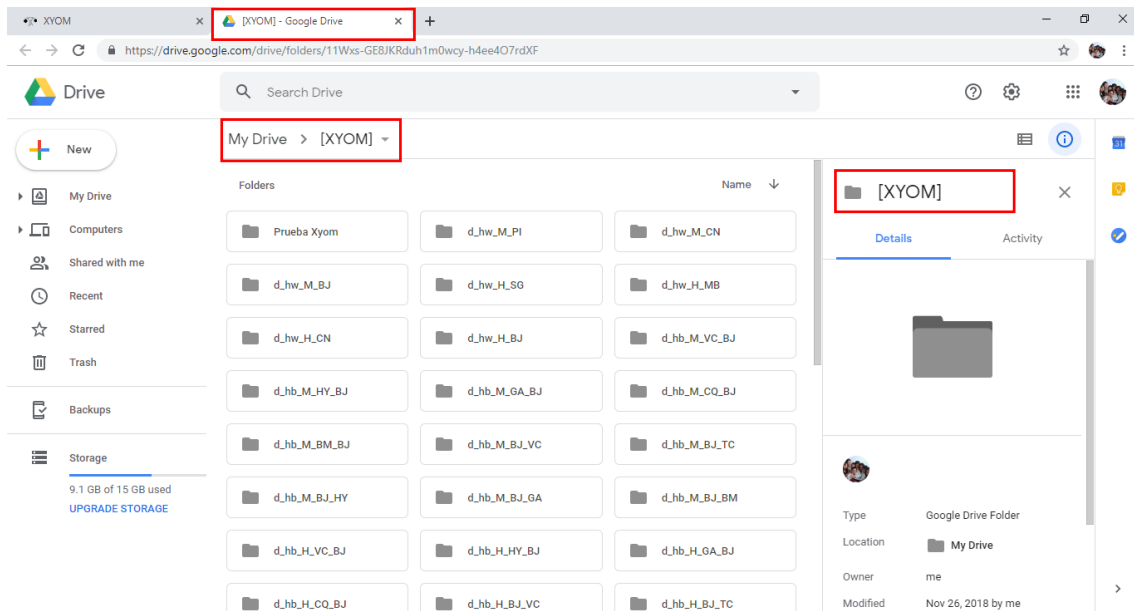
3.- Si inició correctamente la sesión en su cuenta, aparecerá la siguiente ventana:



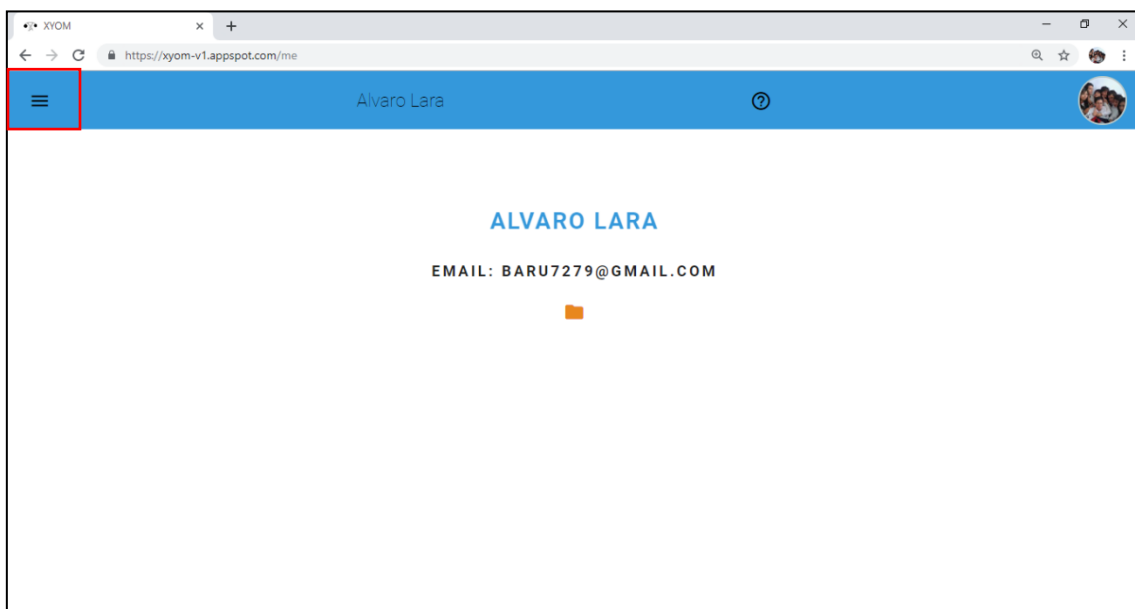
La primera vez que inicie sesión en XYOM mediante su cuenta de Google, el programa creará automáticamente una carpeta en Google Drive.

4.- Haga clic en el icono amarillo bajo su correo; debería abrirse una nueva pestaña en el navegador. Inicie sesión en Google Drive si así se lo solicita la plataforma y compruebe la existencia de una carpeta vacía con el nombre [XYOM].

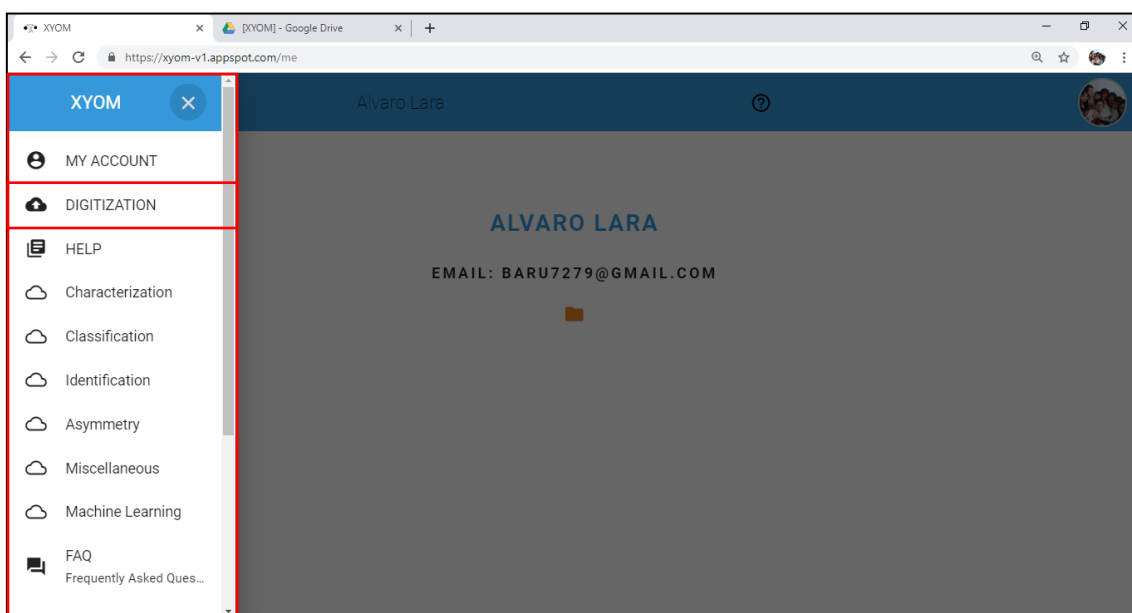
Es recomendable mantener la sesión iniciada en Google para evitar realizar el proceso cada vez que desee ingresar a XYOM o a la plataforma Google Drive.



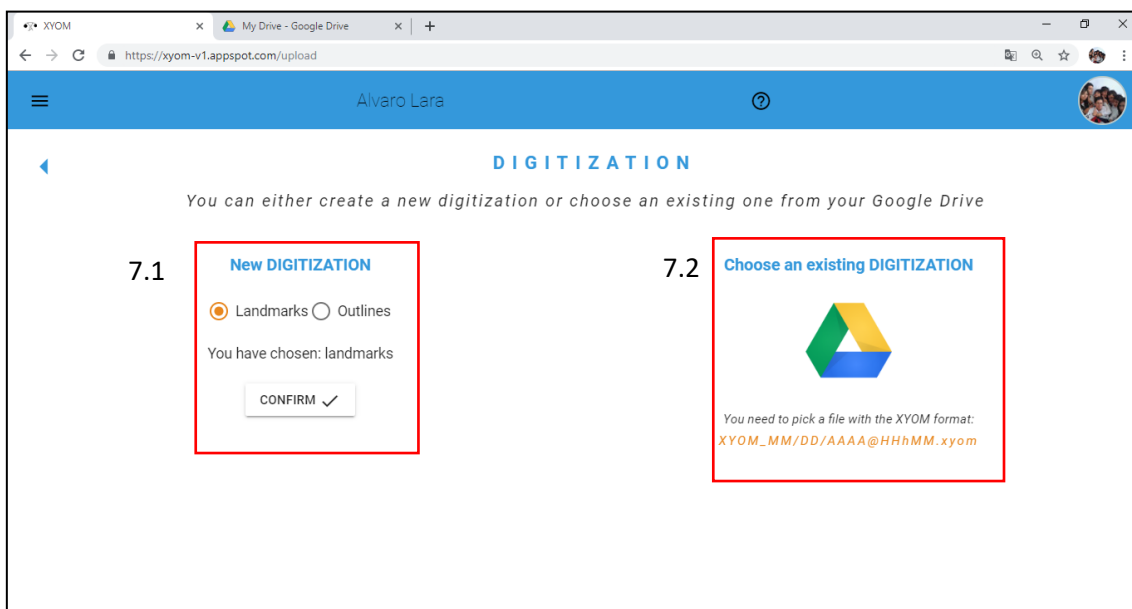
5.- Regrese a la pestaña del programa XYOM y haga clic sobre el icono resaltado en rojo:



6.- Podrá ver que se despliega una lista de opciones en la parte izquierda de su pantalla. Haga clic en la opción “**DIGITIZATION**”:

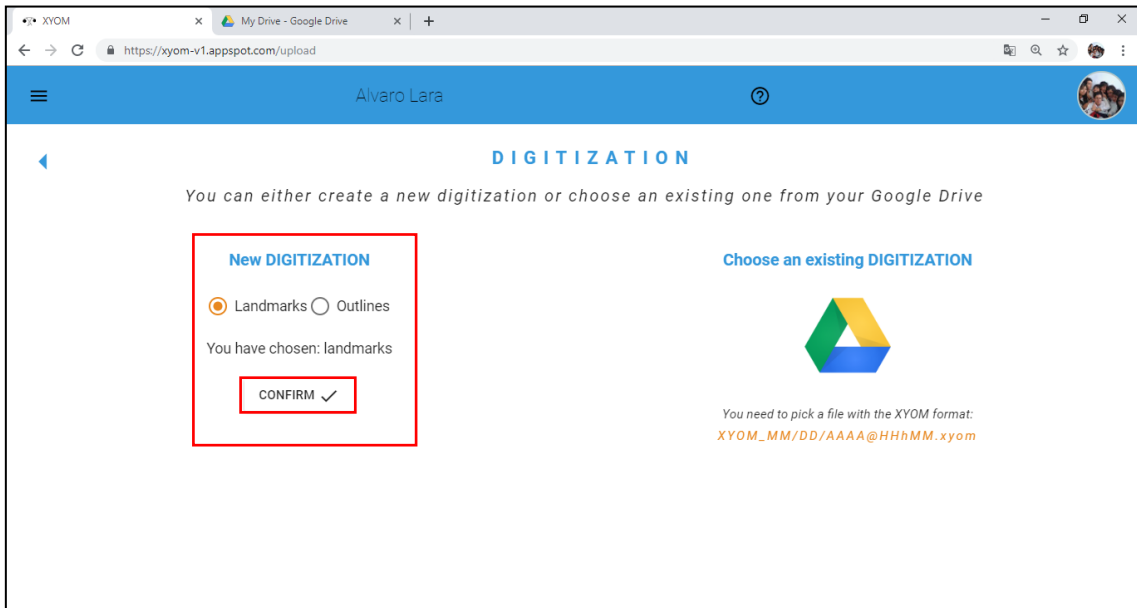


7.- Debería poder visualizar la siguiente ventana:

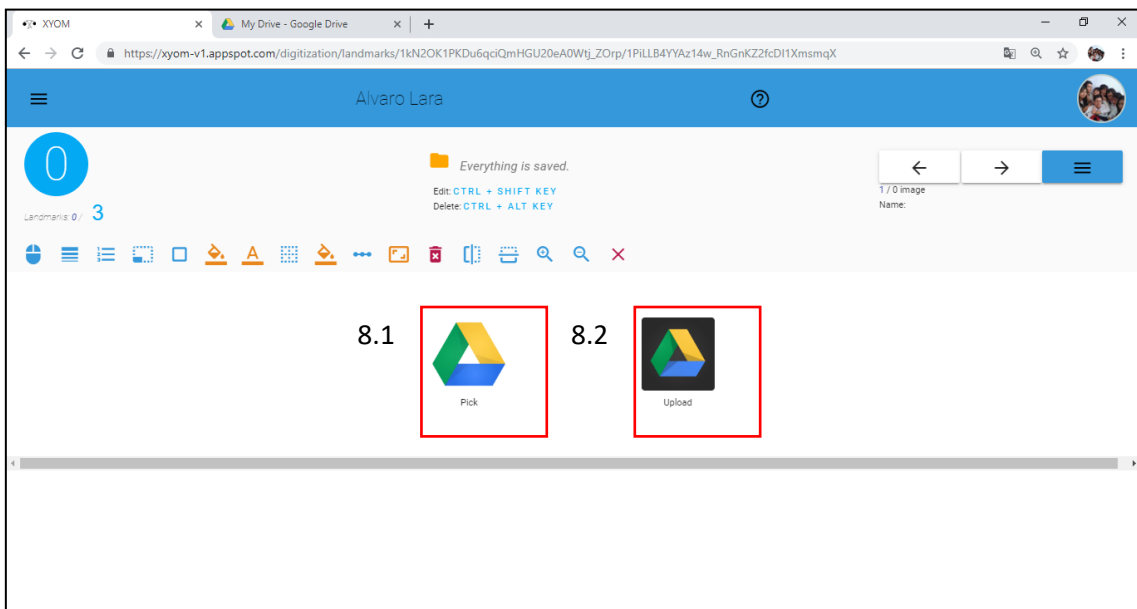


XYOM nos permite hacer **7.1 “New DIGITIZATION”** una nueva digitalización o **7.2 “Choose an existing DIGITIZATION”** continuar una que dejamos pendiente.

Vamos a realizar una nueva digitalización. Para ello, en “**New DIGITIZATION**” haga clic en “**Landmarks**” y presione sobre la opción “**Confirm**”:

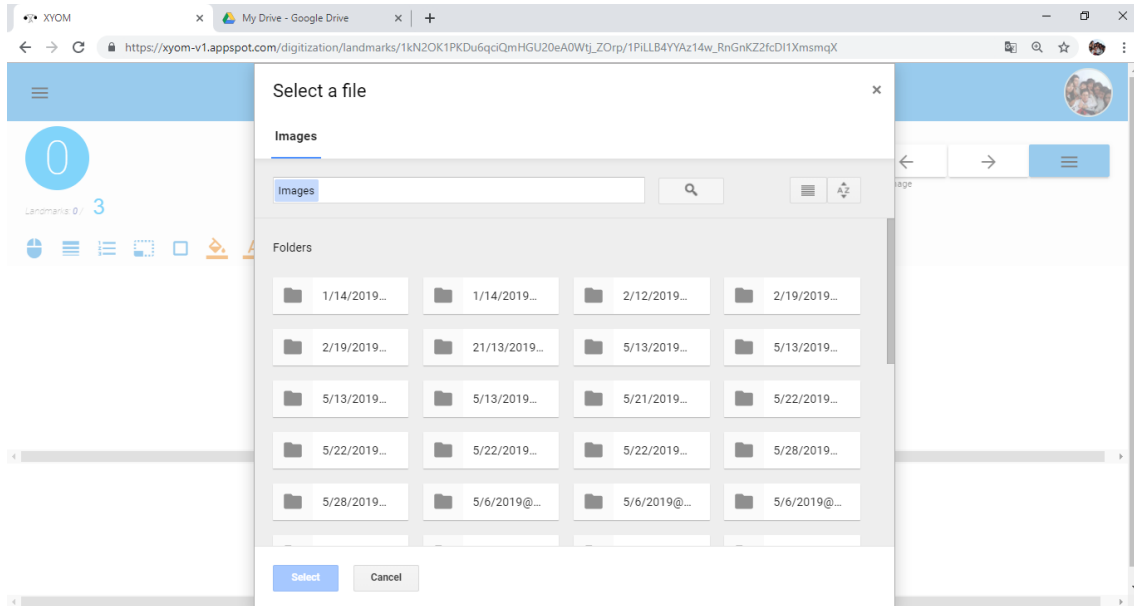


8.- Aparecerá la siguiente ventana:

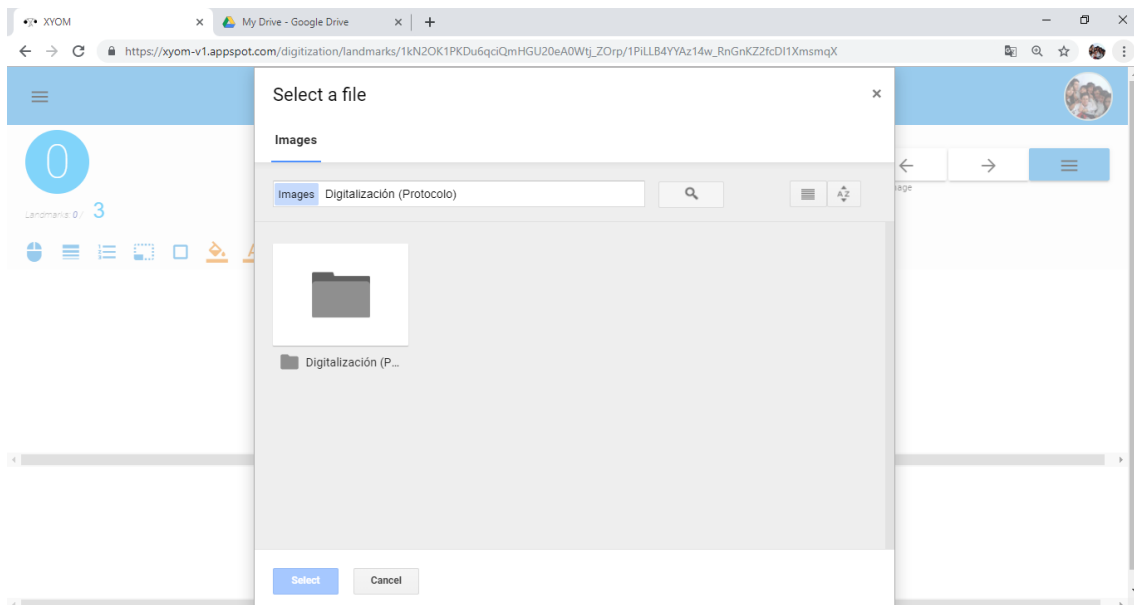


Aquí podrá escoger si desea **8.1 “Pick”** tomar los archivos a digitalizar desde sus carpetas almacenadas en Google Drive o si desea **8.2 “Upload”** subirlos desde su computadora. Como se mencionó al inicio del protocolo, es preferible escoger la primera opción para evitar tener que subir un grupo de imágenes cada vez que desee trabajar con ellas.

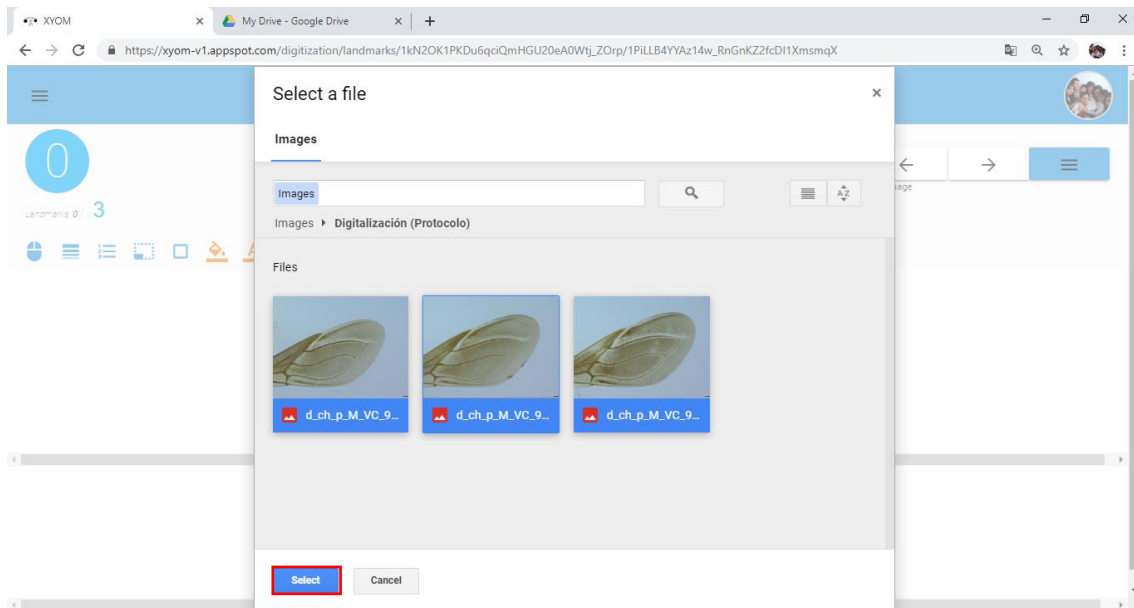
9.- Escoja las fotos para la digitalización. Haga clic en la opción “**Pick**” y se desplegará la siguiente ventana:



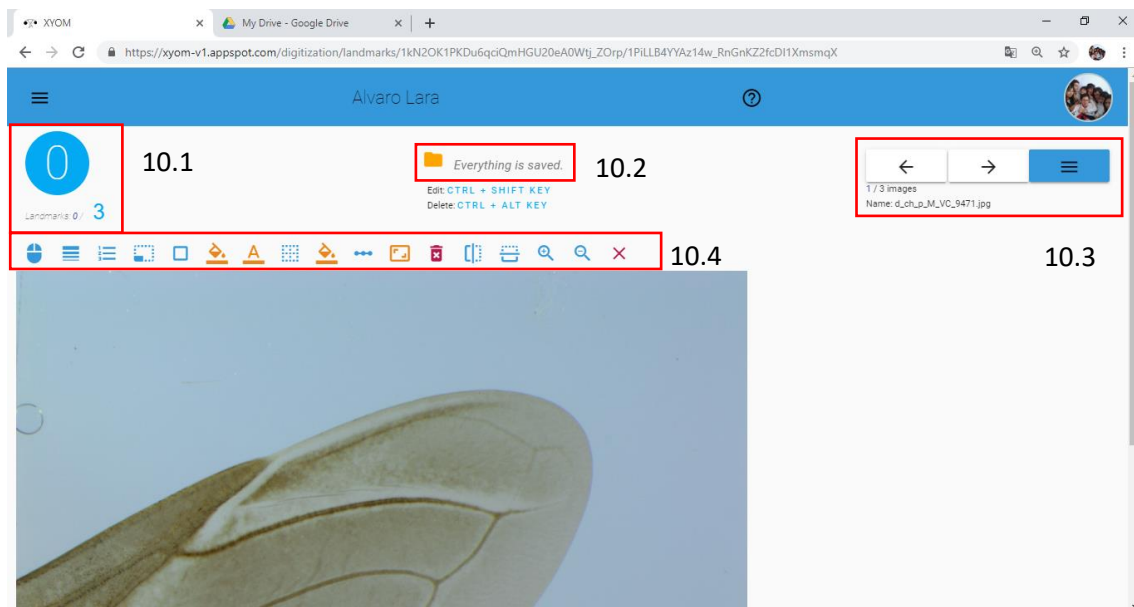
Escriba en el buscador el nombre de la carpeta donde se encuentren los archivos que desea digitalizar. Vamos a utilizar la carpeta “Digitalización (Protocolo)” como ejemplo:



Escoja las imágenes que desee digitalizar y presione en la opción “**Select**”:







10.- Una vez realizado este proceso, podrá visualizar la siguiente ventana:



La interfaz de la digitalización se divide en 4 secciones principales:

10.1 “Número de Landmarks”: Permite asignar el número máximo de landmarks para cada set de fotografías. Si se coloca en la imagen una cantidad de landmarks mayor o menor al límite especificado, el programa le alertará y no le permitirá avanzar a la siguiente.

10.2 “Acceso a la carpeta [XYOM] en Google Drive”: Al hacer clic en el icono amarillo , puede ingresar a la carpeta creada por el programa XYOM en Google Drive, donde se guardará su digitalización.

10.3 “Avance, retroceso y menú”: Las flechas   le permiten avanzar a la siguiente fotografía o retroceder a una imagen anterior. Debajo, puede visualizar el número de fotografías cargadas para su digitalización, así como el nombre de cada imagen. El botón “Menú”  le permite añadir más imágenes, guardar las coordenadas de los landmarks en un archivo en la plataforma Google Drive y descargar las coordenadas a su computadora.

10.4 “Barra de herramientas”:



El botón “**cursor**” permite escoger entre varias formas que puede tomar el cursor del ratón para adaptarse a sus necesidades.



El icono “**font weight**” permite elegir el tamaño de letra para los números que se despliegan junto a cada landmark.



La opción “**hide numbers**” permite ocultar o mostrar los números que se despliegan junto a cada landmark.



La función “**landmarks size**” permite escoger entre distintos tamaños de landmark, escoja un tamaño que se ajuste al tipo de estructura que vaya a analizar.



El icono “**landmarks shape**” despliega una lista de formas que pueden tomar sus landmarks, incluyendo formas rellenas y vacías.



El botón “**landmarks color**” muestra un cuadro que le da la opción de escoger el color del landmark mediante una tabla de matices, a través de un código de color hexadecimal (HEX), un código “Red, Green, Blue” (RGB) o un código “Hue, Saturation, Lightness” (HSL).



La opción “**font color**” muestra un cuadro que le da la opción de escoger el color de los números que se despliegan junto a los landmarks mediante una tabla de matices, a través de un código de color hexadecimal (HEX), un código “Red, Green, Blue” (RGB) o un código “Hue, Saturation, Lightness” (HSL).



La función “**template for semilandmarks**” permite generar una plantilla de semilandmarks a partir de dos landmarks.



El icono “**semilandmarks template color**” brinda la posibilidad de escoger el color de una plantilla de semilandmarks mediante una tabla de matices, a través de un código de color hexadecimal (HEX), un código “Red, Green, Blue” (RGB) o un código “Hue, Saturation, Lightness” (HSL).



El botón “**scale this image**” permite indicarle al programa cuánta distancia en la pantalla equivale a una distancia determinada en la realidad. Tiene la opción de realizar la medición en mm o cm.



La opción “**fix landmarks position on image**” le permite fijar la posición de los landmarks en la imagen, de manera que no haya errores si la imagen no se carga bien.



La función “**delete all landmarks on this image**” le da la posibilidad de eliminar todos los landmarks de su digitalización.



El icono “**flip horizontally**” permite voltear la imagen de manera horizontal; esta función es muy útil si las imágenes fueron tomadas en modo espejo desde el estereoscopio o el programa de captura.



El botón “**flip vertically**” permite voltear la imagen de manera vertical; esta función es muy útil si las imágenes fueron tomadas en modo espejo desde el estereoscopio o el programa de captura.



La opción “**zoom in**” realiza un acercamiento hacia la imagen; esto resulta útil cuando las estructuras son pequeñas o cuando se necesita mayor exactitud al momento de colocar los landmarks.



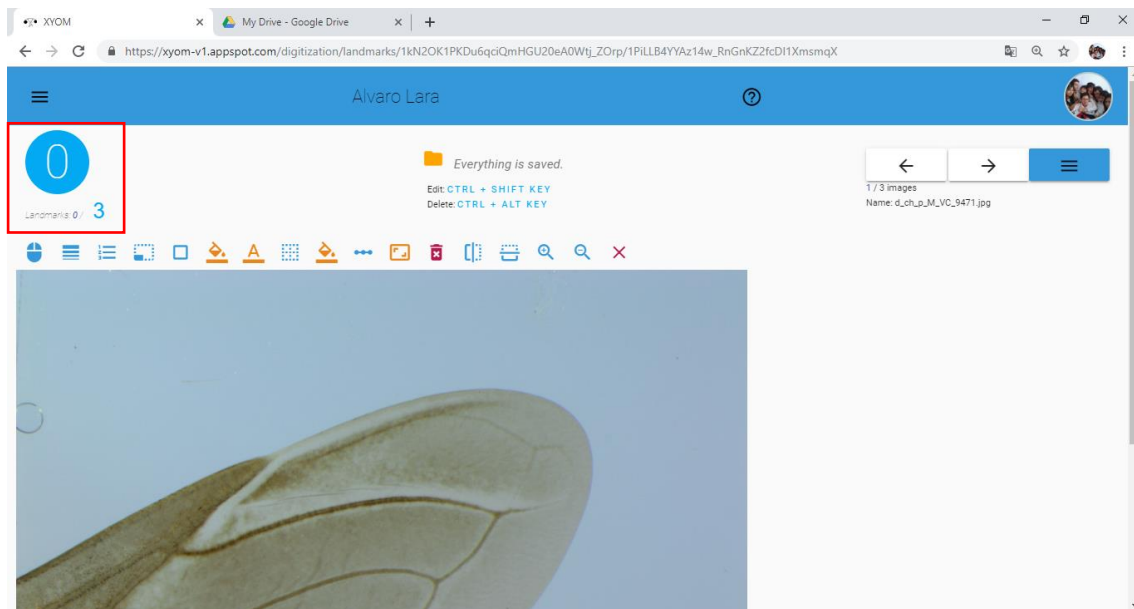
La función “**zoom out**” realiza un alejamiento desde la imagen; esto resulta útil cuando las estructuras son demasiado grandes o no se pueden visualizar correctamente en la pantalla.

¡ATENCIÓN!: Si utiliza la función de zoom de XYOM, una vez asigne las posiciones de los landmarks, no podrá acercar ni alejar la imagen. Además, la siguiente imagen que desee digitalizar tendrá el zoom por defecto y no el que utilizó en la imagen anterior. Por ello, es recomendable no usar el zoom del programa y trabajar con un zoom del navegador determinado para todo el proceso.

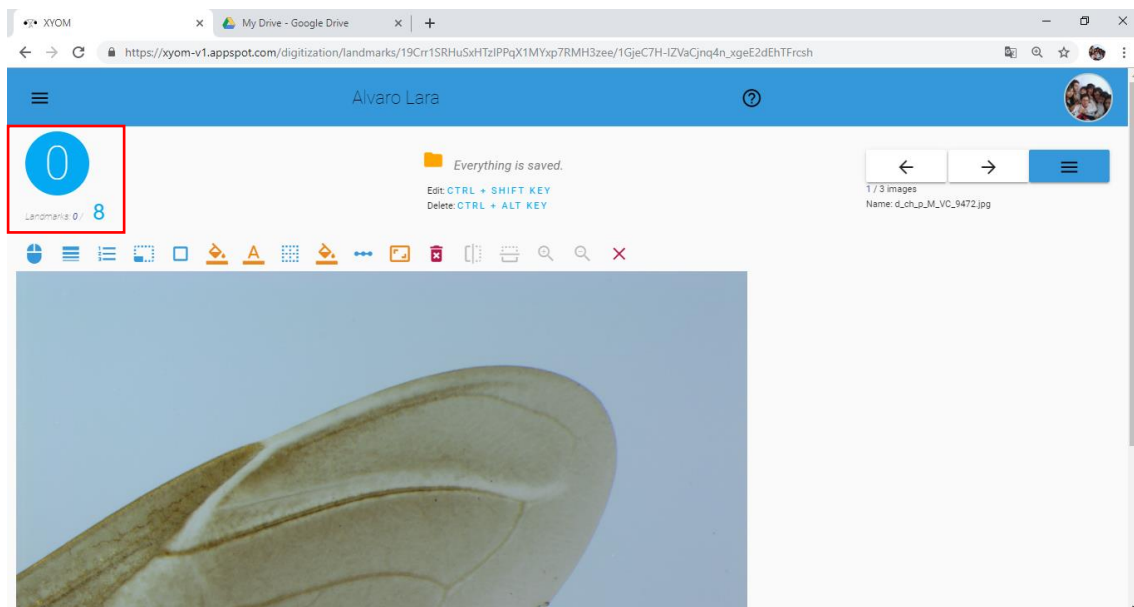
✗ El icono “**remove this image**” permite eliminar la imagen actual del set.


11.- Ahora que conocemos mejor la interfaz del programa, vamos a digitalizar un set de imágenes.

Asignaremos un número máximo de landmarks; tome en cuenta que el número por defecto es 3:



Para este ejemplo utilizaremos 8 landmarks:



12.- Ahora, vamos a escalar la imagen. Haga clic en el icono  “Scale this image” y escoja la opción “Scale”, aparecerá el siguiente cuadro:

Scale Your image

Number of units
1

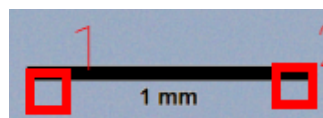
mm

Cancel **START SCALING**

Escriba el número de unidades, escoja la unidad de medida que desee utilizar y haga clic sobre “Start Scaling”. Para este ejemplo, vamos a utilizar 1 mm:



Como se puede observar, la escala de esta imagen se encuentra en la esquina inferior derecha. El icono que representa los puntos de escala es un cuadrado rojo de borde grueso con un número en la esquina superior derecha.

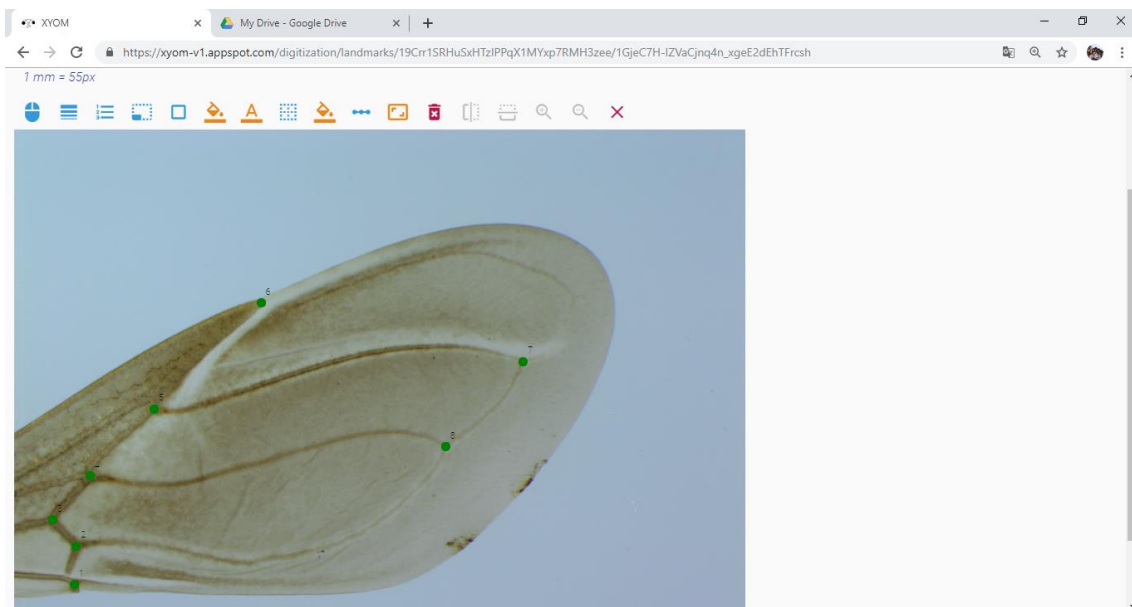


Cuando termine de indicar la distancia, esta aparecerá arriba de la barra de herramientas:

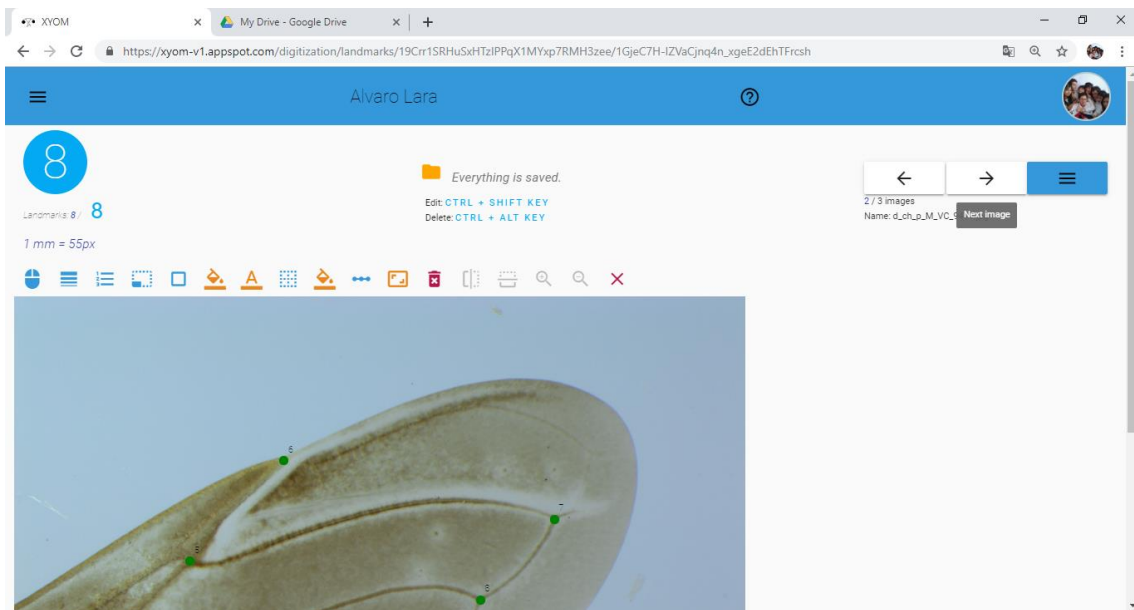
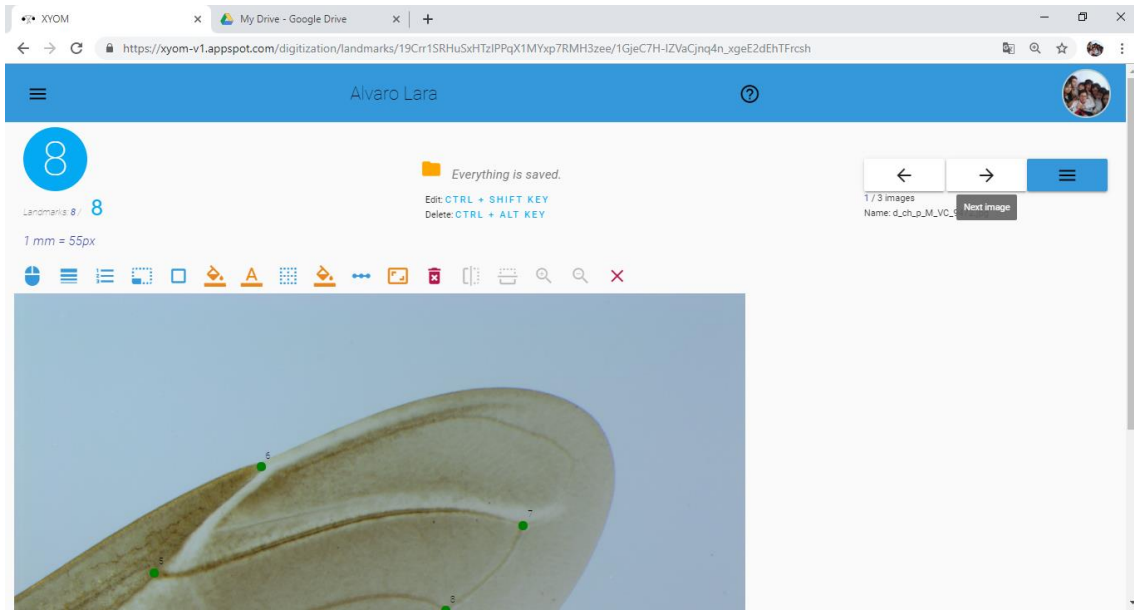


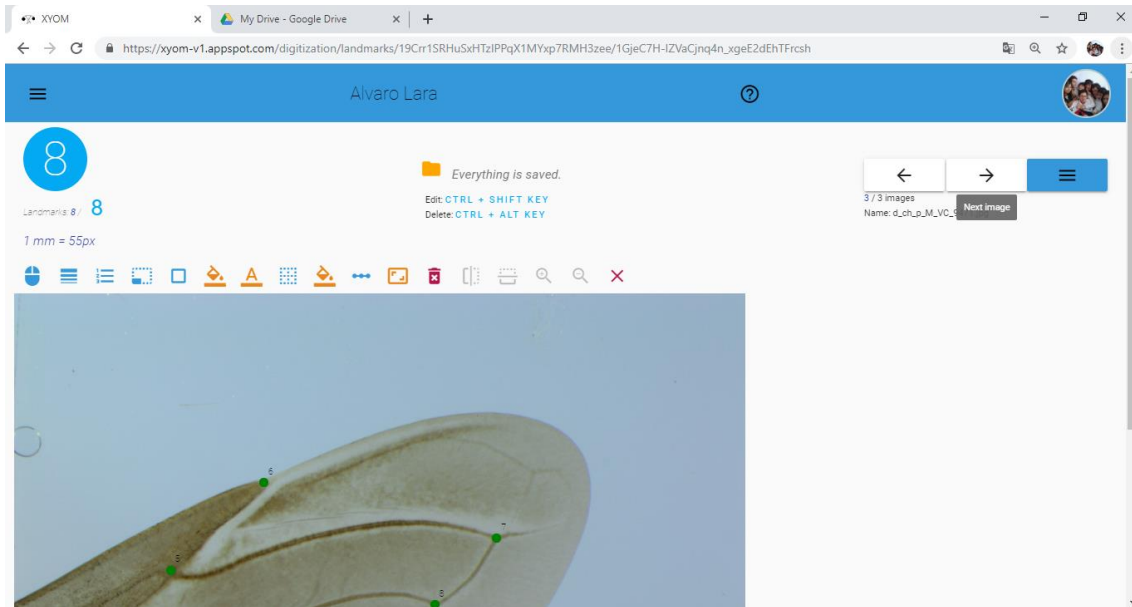
La escala le muestra cuántos píxeles equivalen a la medida de la escala en su imagen. En este ejemplo, 1 mm equivale a 55 píxeles. Considere que **la escala solo debe indicarse en la primera imagen de un set de fotografías** y que es recomendable trabajar con valores exactos o muy aproximados entre distintas digitalizaciones de un mismo proyecto.

13.- Ponga los landmarks haciendo clic derecho sobre los puntos de interés, de manera que sigan una configuración determinada. Lastimosamente, no existe una forma de eliminar landmarks individuales, por lo que, si comete un error, debe borrar todos y empezar de nuevo.




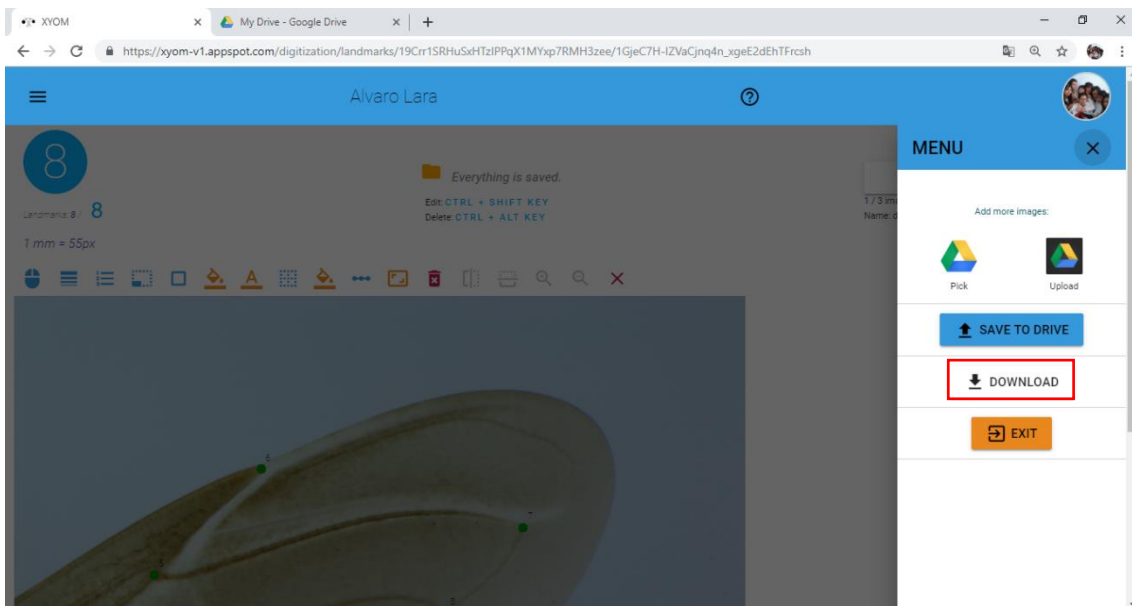
Haga clic en **“Next image”** y repita el paso 13 en todas las imágenes que componen su digitalización:





¡ATENCIÓN!: Recuerde que, al realizar una digitalización, debe acabar de vuelta en la primera imagen; caso contrario, las coordenadas de la última imagen no se guardarán y perderá esos datos.

14.- Vamos a obtener las coordenadas de la digitalización. Haga clic en el botón “**Menú**”  y observe el panel que se abre en la parte derecha de su pantalla:



Presione la opción “**Download**”, aparecerá la siguiente ventana:

Download your landmarks

Which format would you like ?

TPS
 CLIC
 CSV
 JSON

Puede escoger entre cuatro formatos para descargar sus coordenadas. Dependiendo de qué programa estadístico o análisis vaya a utilizar, escoja el más adecuado.

Como en este trabajo vamos a analizar nuestros datos mediante las herramientas morfométricas de XYOM, elegimos la opción “**CLIC**” y presionamos en “**Save**”:

Download your landmarks

Which format would you like ?

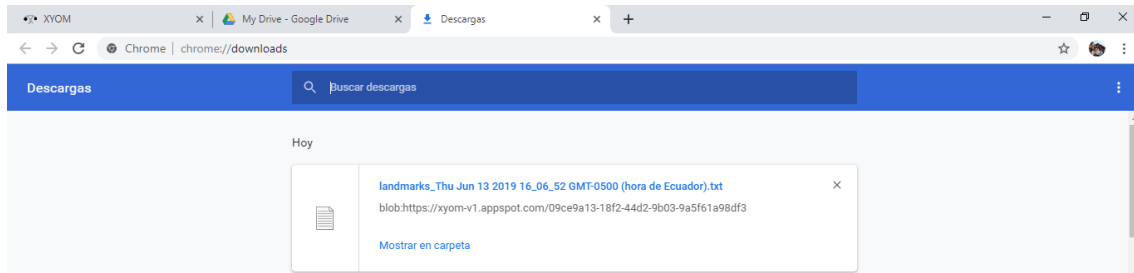
TPS
 CLIC
 CSV
 JSON

Se desplegará la siguiente ventana:

LANDMARKS - 3 individuals.

Close


Asegúrese de que el número de individuos corresponde con el set que digitalizó y haga clic en el recuadro resaltado en rojo. En la sección “**Descargas**” de su navegador podrá observar un archivo con la extensión .txt:

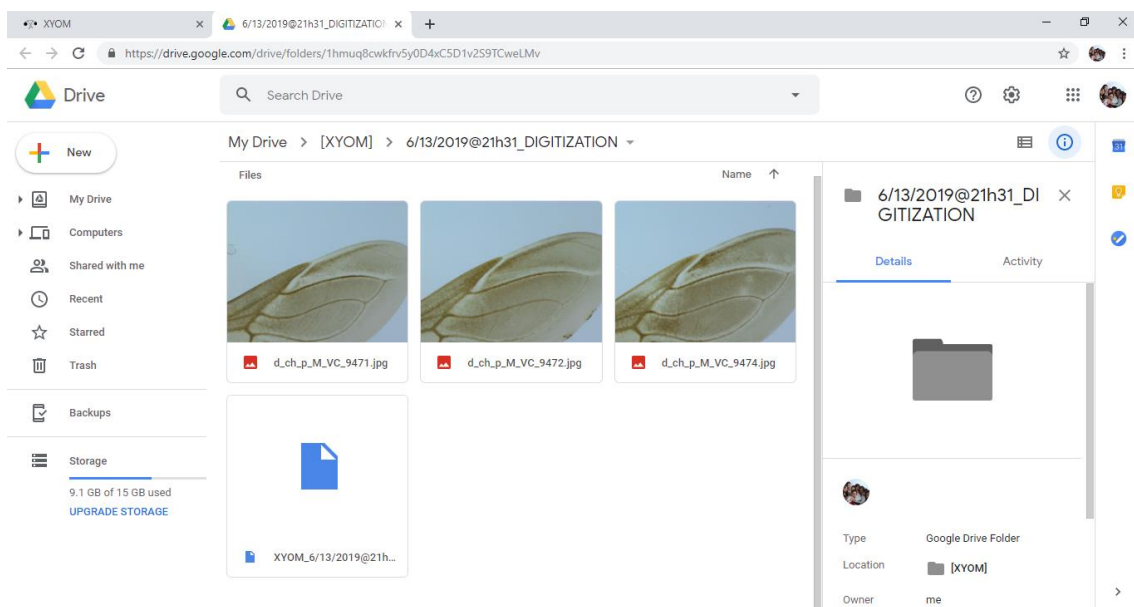


El archivo se descarga con un nombre por defecto que tiene el siguiente formato:

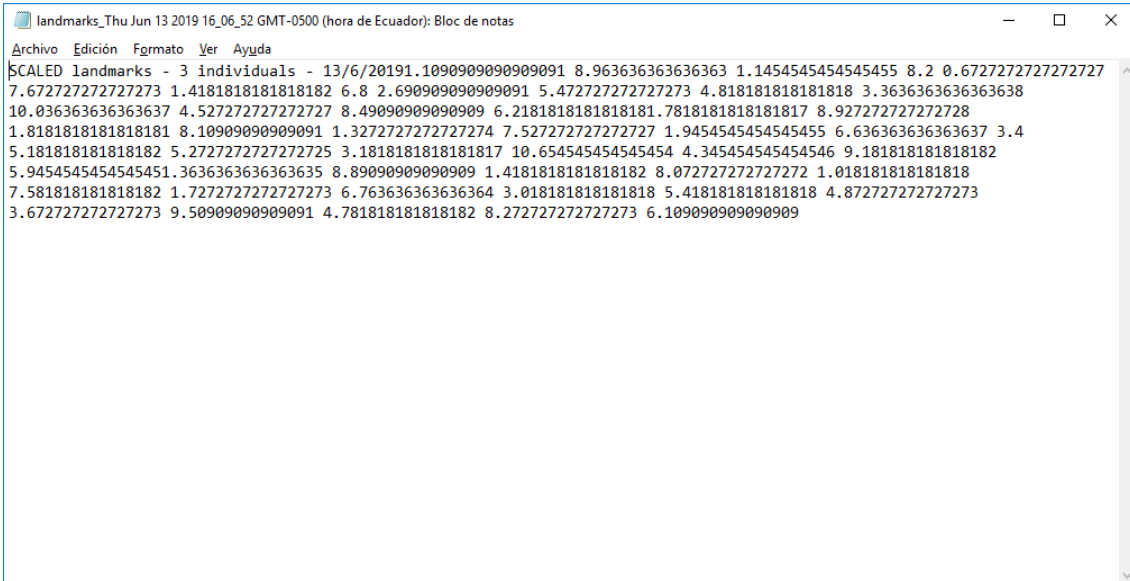
landmarks_DD (letras) MM (letras) DD (números) AAAA (números) HH (números)_
mm (números)_ss (números) Coordenadas UTC de su área (Zona).txt

NOTA 1: Pese a que el programa indica que necesita un archivo con este formato de nombre específico para realizar los análisis morfométricos posteriores, en realidad, se puede cambiar sin que afecte el proceso de lectura de datos.

15.- También puede acceder a su carpeta [XYOM] en Google Drive pulsando sobre , donde podrá observar las imágenes que digitalizó y un archivo con extensión .xyom :



16.- Finalmente, vamos a abrir el archivo que descargamos en formato .txt, puede hacerlo con el Bloc de notas o con WordPad:



The screenshot shows a Notepad window titled "landmarks_Thu Jun 13 2019 16_06_52 GMT-0500 (hora de Ecuador): Bloc de notas". The window contains a list of landmarks in a .txt file, with the following text:

```
SCALED landmarks - 3 individuals - 13/6/2019.1090909090909091 8.963636363636363 1.1454545454545455 8.2 0.6727272727272727  
7.672727272727273 1.4181818181818182 6.8 2.690909090909091 5.472727272727273 4.818181818181818 3.363636363636368  
10.036363636363637 4.527272727272727 8.49090909090909 6.2181818181818181.7818181818181817 8.927272727272728  
1.8181818181818181 8.1090909090909091 1.3272727272727274 7.527272727272727 1.9454545454545455 6.636363636363637 3.4  
5.181818181818182 5.2727272727272725 3.1818181818181817 10.654545454545454 4.345454545454546 9.181818181818182  
5.9454545454545451.3636363636363635 8.89090909090909 1.4181818181818182 8.072727272727272 1.018181818181818  
7.581818181818182 1.7272727272727273 6.763636363636364 3.018181818181818 5.418181818181818 4.872727272727273  
3.672727272727273 9.5090909090909091 4.781818181818182 8.272727272727273 6.109090909090909
```

ANEXO 11. UTILIZACIÓN DE XYOM PARA LA OBTENCIÓN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS EN MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA USANDO COMO EJEMPLO ALAS DE TRIATOMINOS

PROTOCOLO PARA EL USO DE LOS MÓDULOS “CARATERIZACIÓN” Y “CLASIFICACIÓN” EN XYOM: ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Tomando en cuenta que hemos descargado y organizado todos los archivos de texto necesarios (con las coordenadas de los puntos de interés) (formato .txt) para realizar las comparaciones pertinentes, ahora necesitamos organizar la información a fin de indicarle al programa en qué orden o estructura analizar los datos.

Durante la realización de este trabajo, nos encontramos con un pequeño bug que, hasta la fecha de fabricación de este protocolo, no ha sido reparado. El problema consiste en que puede darse el caso que ciertos archivos de texto, producto del módulo **DIGITALIZACIÓN**, no muestren una separación adecuada de las coordenadas de cada individuo. Tal hecho tiene como consecuencia la fusión de individuos dentro del archivo. Así, al momento de introducir los datos en el módulo **CARACTERIZACIÓN**, el programa indicará que existen menos individuos de lo especificado en el archivo y no se podrá proceder con el análisis.

En consecuencia, antes de empezar, es necesario asegurarse de que las coordenadas se encuentren correctamente separadas. Para ello, primero debemos saber cómo interpretar lo que vemos en el archivo de texto.

```

d_hb_H_CQ_BJ: Bloc de notas
Archivo Edición Formato Ver Ayuda
SCALED landmarks - 3 individuals - 28/5/20191.5636363636363637
6.834580570718864 1.690909090909091 6.103839251836973 1.2181818181818183
5.673991417200567 1.9636363636363636 4.957578359473223 3.4909090909090907
3.6250500721003625 5.509090909090909 2.0059565616365638 10.927272727272728
3.094904409382127 9.254545454545454 4.54205878599136351.3818181818181818
8.672727272727272 1.4545454545454546 7.781818181818182 1.0909090909090908
7.290909090909091 1.6727272727272726 6.472727272727273 3.2363636363636363 5
5.072727272727272 3.1818181818181817 10.309090909090909 4.527272727272727
8.636363636363637 6.1090909090909091.4363636363636363 8.654545454545454
1.509090909090909 7.854545454545454 1.0909090909090908 7.381818181818182
1.7818181818181817 6.545454545454546 3.1818181818181817 4.963636363636364
4.927272727272728 3 10.145454545454545 4.0181818181818185 8.636363636363637
5.709090909090909

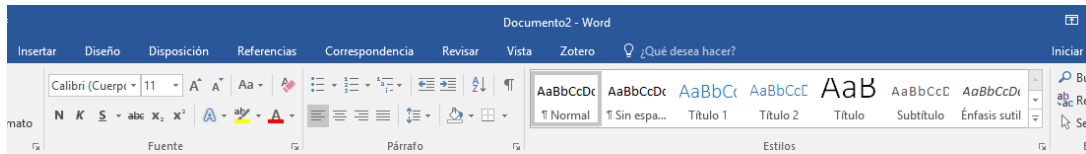
```

Todos los archivos de *landmarks* están compuestos por 4 elementos:

- 1.- El título, generalmente “**SCALED LANDMARKS**”.
- 2.- El número de individuos, en este caso: “**3 individuals**”.
- 3.- La fecha de creación del archivo, en este ejemplo: **28/5/2019** (formato: DD/M/YYYY).
- 4.- Las coordenadas X y Y de los puntos digitalizados.

Como se puede observar, no es fácil diferenciar las coordenadas de cada individuo que compone el archivo. Al menos no en Word Pad o en el Bloc de notas.

Para resolver este problema, copiemos toda la información del archivo abierto en bloc de notas en un archivo nuevo de Microsoft Office Word:



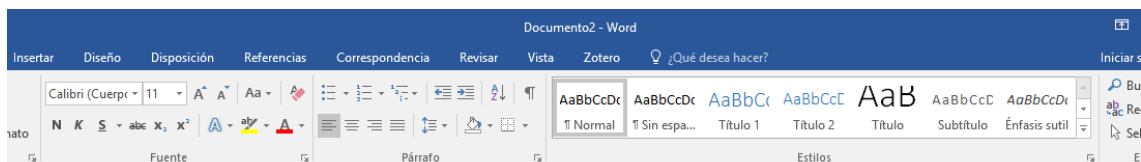
SCALED landmarks - 3 individuals - 28/5/2019

1.56363636363637 6.834580570718864 1.690909090909091 6.103839251836973
 1.2181818181818183 5.673991417200567 1.9636363636363636 4.957578359473223
 3.4909090909090907 3.6250500721003625 5.509090909090909 2.0059565616365638
 10.927272727272728 3.094904409382127 9.254545454545454 4.5420587859913635

1.3818181818181818 8.672727272727272 1.4545454545454546 7.781818181818182
 1.0909090909090908 7.290909090909091 1.6727272727272726 6.472727272727273
 3.2363636363636363 5.072727272727272 3.1818181818181817 10.309090909090909
 4.527272727272727 8.636363636363637 6.109090909090909

1.4363636363636363 8.654545454545454 1.509090909090909 7.854545454545454
 1.0909090909090908 7.381818181818182 1.7818181818181817 6.545454545454546
 3.1818181818181817 4.963636363636364 4.927272727272728 3 10.145454545454545
 4.0181818181818185 8.636363636363637 5.709090909090909

Es evidente que las coordenadas están claramente diferenciadas en 3 grupos. Ahora bien, ¿cómo saber si el número de coordenadas es correcto y no se encuentra fusionado con otro individuo? Podríamos decir que, a simple vista, un grupo fusionado mostraría una sección más grande:



SCALED landmarks - 3 individuals - 28/5/2019

1.56363636363637 6.834580570718864 1.690909090909091 6.103839251836973
 1.2181818181818183 5.673991417200567 1.9636363636363636 4.957578359473223
 3.4909090909090907 3.6250500721003625 5.509090909090909 2.0059565616365638
 10.927272727272728 3.094904409382127 9.254545454545454 4.5420587859913635

1.3818181818181818 8.672727272727272 1.4545454545454546 7.781818181818182
 1.0909090909090908 7.290909090909091 1.6727272727272726 6.472727272727273
 3.2363636363636363 5.072727272727272 3.1818181818181817 10.309090909090909
 4.527272727272727 8.636363636363637 6.109090909090909 1.4363636363636363
 8.654545454545454 1.509090909090909 7.854545454545454 1.0909090909090908
 7.381818181818182 1.7818181818181817 6.545454545454546 3.1818181818181817
 4.963636363636364 4.927272727272728 3 10.145454545454545 4.0181818181818185
 8.636363636363637 5.709090909090909

Empero, si la imagen de arriba fuese el resultado de haber pegado directamente la información del archivo .txt (archivo con bug) en Word, ¿cómo saber dónde terminan las coordenadas de un individuo y empiezan las de otro?

En este estudio se utilizaron 8 *landmarks* o puntos de referencia. Cada punto tiene una ubicación en el espacio representada por un valor para X y un valor para Y. Así, cada individuo debería tener 16 datos. Si observa el contador de palabras de Word, sabrá dónde termina un individuo y empieza otro.

SCALED landmarks - 3 individuals - 28/5/2019

```
1.56363636363637 6.834580570718864 1.690909090909091 6.103839251836973
1.21818181818183 5.673991417200567 1.96363636363636 4.957578359473223
3.49090909090907 3.6250500721003625 5.509090909090909 2.0059565616365638
10.927272727272728 3.094904409382127 9.254545454545454 4.5420587859913635
1.38181818181818 8.672727272727272 1.454545454545454 7.781818181818182
1.09090909090908 7.290909090909091 1.672727272727272 6.472727272727273
3.23636363636363 5.5.072727272727272 3.181818181818181 10.309090909090909
4.52727272727272 8.636363636363637 6.109090909090909 1.436363636363636
8.6545454545454 1.509090909090909 7.85454545454545 1.0909090909090908
7.38181818181818 1.781818181818181 6.54545454545454 3.181818181818181
4.96363636363636 4.927272727272728 3 10.14545454545454 4.018181818181818
8.63636363636363 5.709090909090909
```

Contar palabras	
Estadísticas:	
Páginas	1
Palabras	16
Caracteres (sin espacios)	263
Caracteres (con espacios)	278
Párrafos	0
Líneas	4
<input checked="" type="checkbox"/> Incluir cuadros de texto, notas al pie y notas al final	
Cerrar	

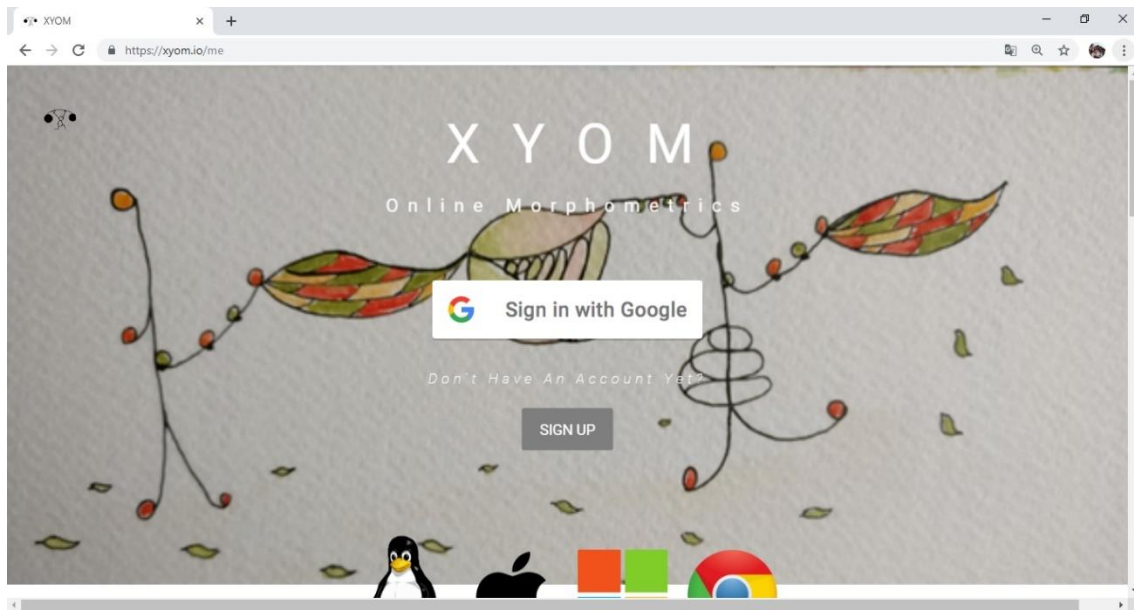
Una vez se haya asegurado de que no existen errores en la separación de coordenadas entre individuos, puede empezar a organizar sus archivos de acuerdo a las comparaciones que necesite realizar. Recuerde siempre guardar sus archivos en formato .txt desde Word dado que, si trabaja directamente con los archivos descargados mediante el módulo “DIGITALIZACIÓN”, pueden mostrar el bug antes mencionado y provocar errores.

¡ATENCIÓN!: Es esencial que, cuando construya sus archivos de texto con varios grupos, los ordene de manera sucesiva. Tenga listos sus archivos de texto para el análisis, anote en una tabla o en un papel el número de individuos por grupo.

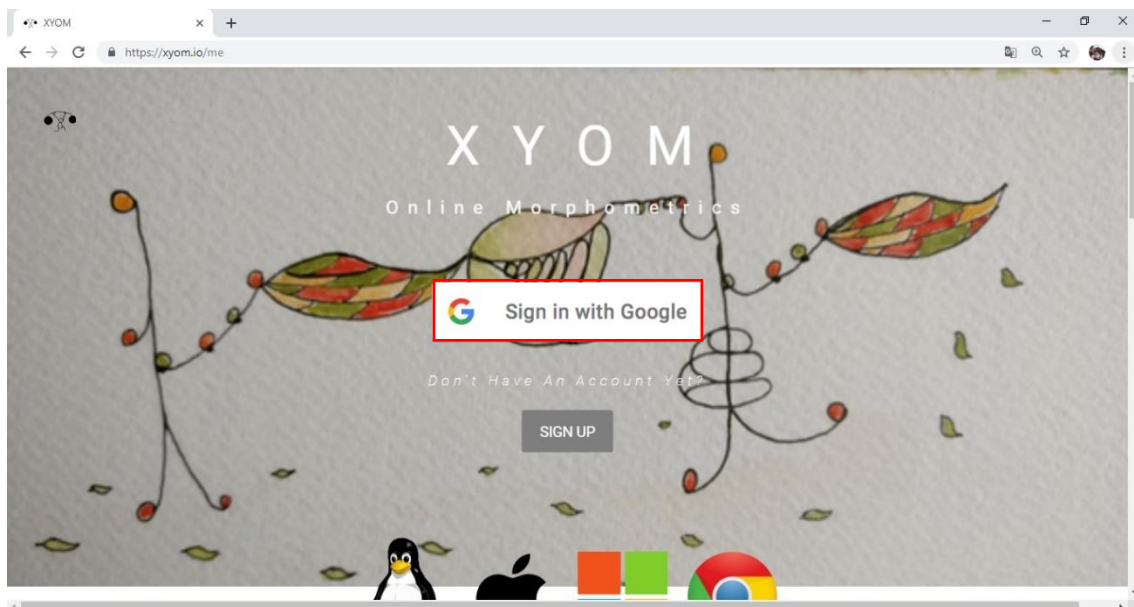
El ejemplo de este protocolo utilizará un archivo de texto donde existe un total de 277 individuos. De esta manera, 92 pertenecen a la especie *P. chinai* (primer grupo), 83 a *P. howardi* (segundo grupo) y 102 a híbridos entre ambas especies (tercer grupo).

Vamos a utilizar el módulo **CARACTERIZACIÓN** para obtener un archivo que permitirá construir un dendrograma en el módulo **CLASIFICACIÓN**. El objetivo es mostrar el flujo de trabajo general para análisis morfométrico en XYOM.

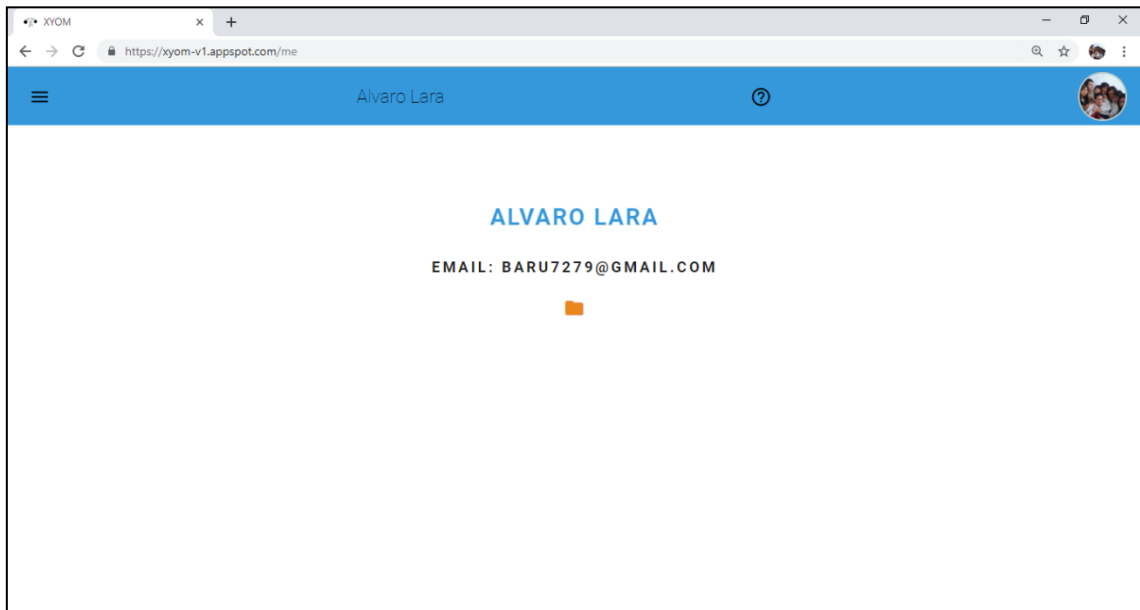
1.- Vaya a la siguiente dirección electrónica: <https://xyom.io/>. Aparecerá la siguiente pantalla:



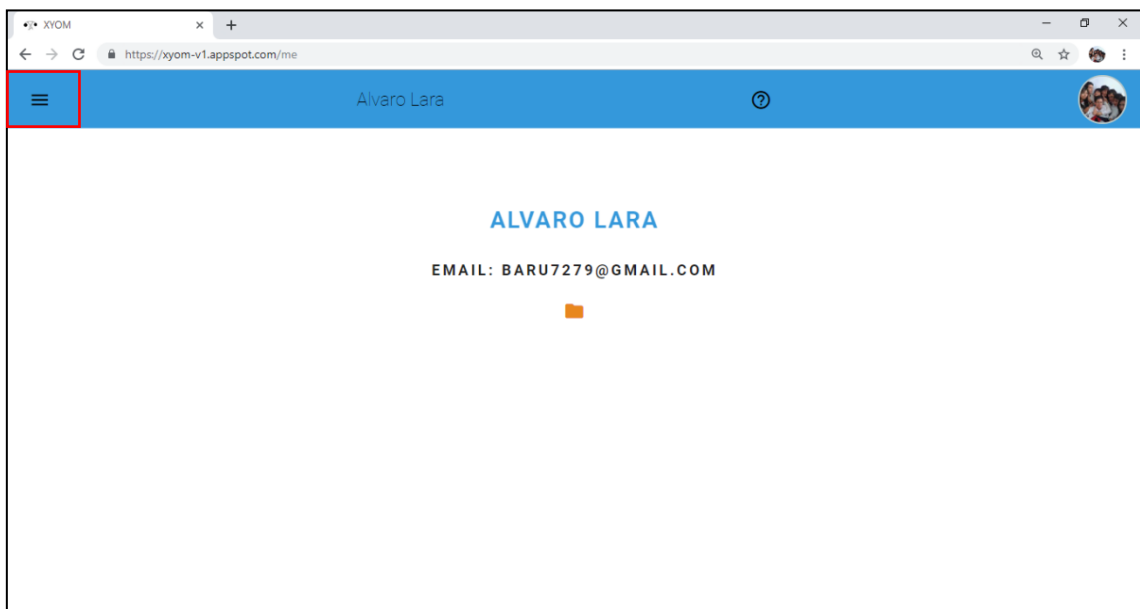
2.- Haga clic en la opción “**Sign in with Google**” e ingrese a su cuenta:



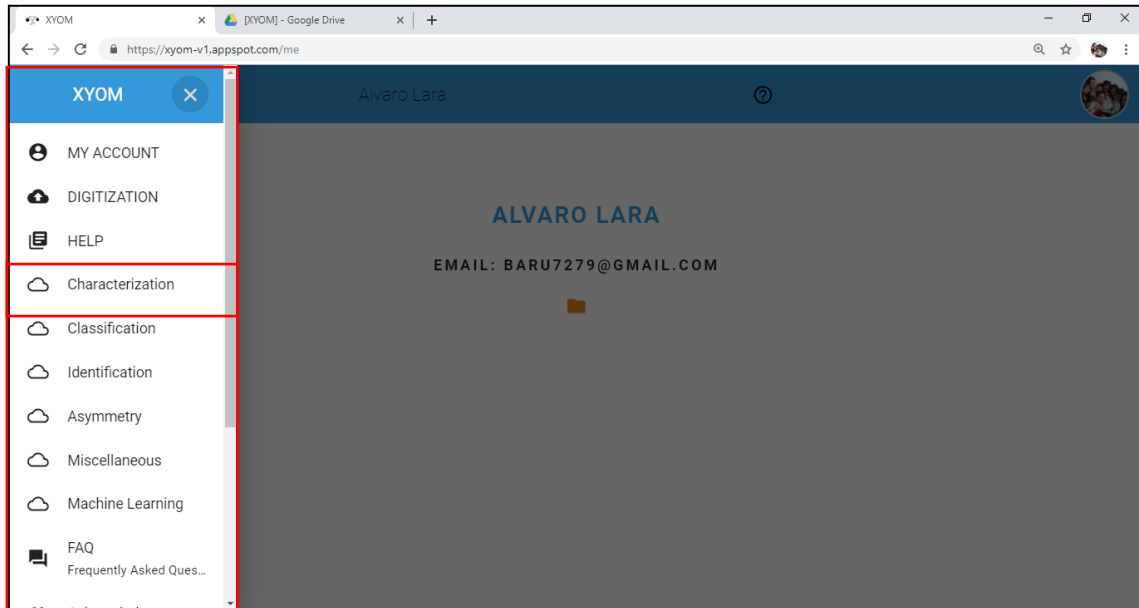
3.- Si inició correctamente la sesión, aparecerá la siguiente ventana:



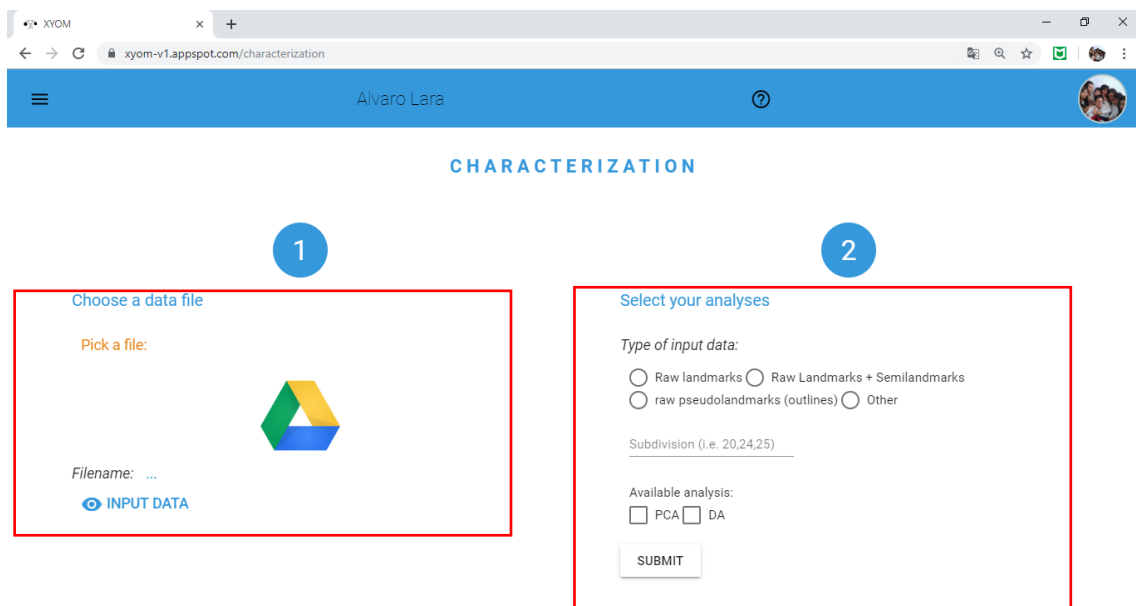
4.- Ahora, haga clic sobre el icono resaltado en rojo:



5.- Podrá ver que se despliega una lista de opciones en la parte izquierda de su pantalla. Haga clic en la opción “**CHARACTERIZATION**”:




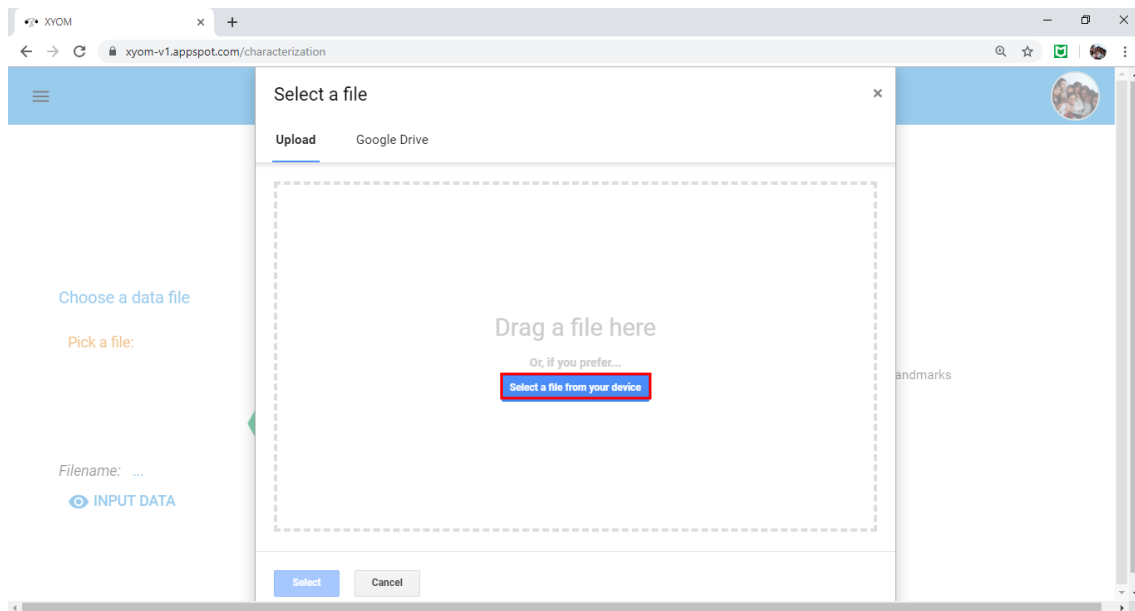
6.- Podrá visualizar la siguiente ventana:



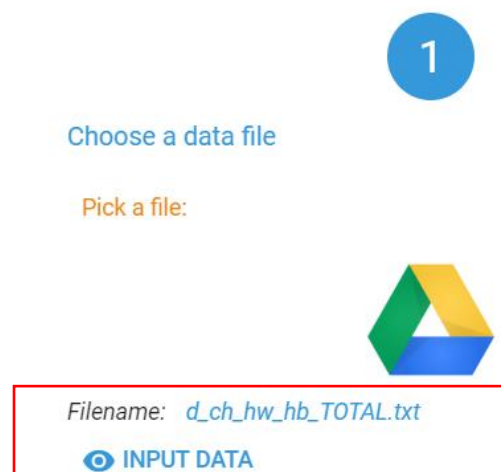
El módulo “**CHARACTERIZATION**” permite **1. “Choose a data file”** subir un archivo a la plataforma desde su computadora o escoger un archivo desde su carpeta de Google

Drive y 2. “**Select your analyses**” escoger qué tipo de información cargar, así como qué tipo de análisis hacer con esos datos.

7.- Haga clic sobre el icono de **Google Drive**  y espere a que se despliegue una ventana emergente. En este caso, vamos a subir un archivo directamente desde nuestra computadora:



Si la carga se realizó adecuadamente, podrá observar que el nombre del archivo se despliega en la sección inferior izquierda de su pantalla, en la sección “**Filename**”:



8.- En vista de que nuestro archivo está compuesto por *landmarks*, vamos a escoger “**Raw Landmarks**” en “**Type of input data**”.

En el cajón “**Subdivision**”, introducimos el número de individuos por grupo: 92 (*P. chinai*), 83 (*P. howardi*) y 102 (híbridos). La separación se realiza con comas, sin espacios.

Finalmente, en “**Available analysis**”, hacemos clic sobre los 3 análisis ofrecidos “**GPA, PCA y DA**” y presionamos en “**SUBMIT**”:

2

Select your analyses

Type of input data:

Raw landmarks
 Raw Landmarks + Semilandmarks
 raw pseudolandmarks (outlines)
 Other

Subdivision (f.i.e. 20,24,25)
 92,83,102

Available analysis:

GPA
 PCA
 DA

SUBMIT

9.- Si los cálculos se realizaron con éxito, podrá observar la siguiente ventana:

The screenshot shows the 'CHARACTERIZATION' results page in a web browser. The page is titled '9.1 CHARACTERIZATION'. It is divided into three main sections:

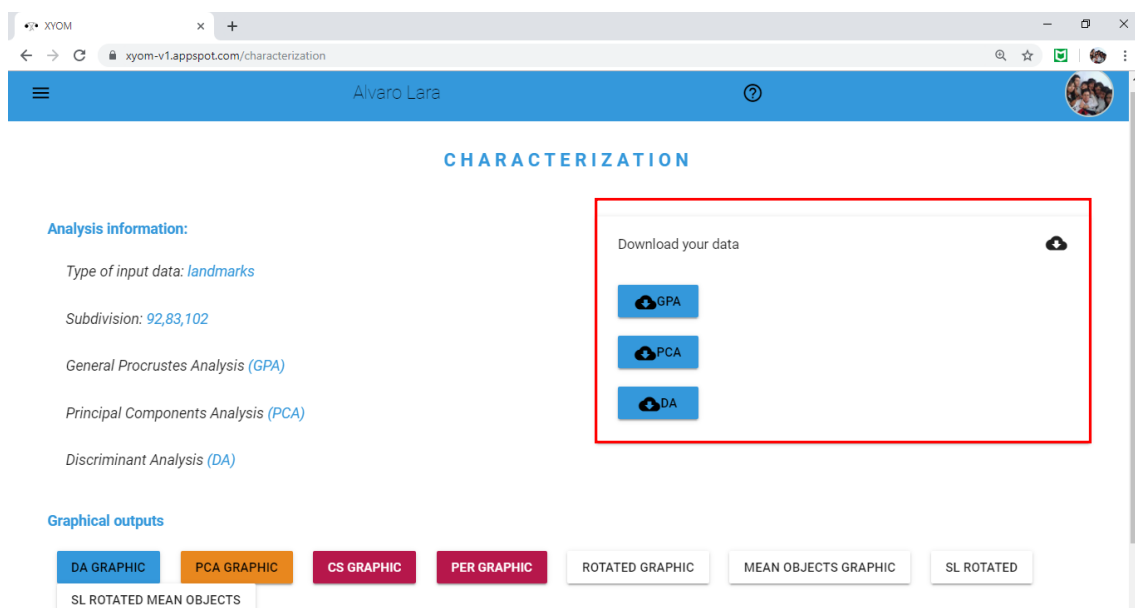
- 9.1 Analysis information:** This section contains the following details:
 - Type of input data: *landmarks*
 - Subdivision: *92,83,102*
 - General Procrustes Analysis (*GPA*)
 - Principal Components Analysis (*PCA*)
 - Discriminant Analysis (*DA*)
- 9.2 Download your data:** This section contains a button labeled 'Download your data' with a download icon.
- 9.3 Graphical outputs:** This section contains several buttons for different graphical outputs: 'DA GRAPHIC', 'PCA GRAPHIC', 'CS GRAPHIC', 'PER GRAPHIC', 'ROTATED GRAPHIC', 'MEAN OBJECTS GRAPHIC', and 'SL ROTATED'.

9.1 “Analysis information”: Muestra un resumen de la información que se introdujo y qué análisis se escogieron para trabajar.

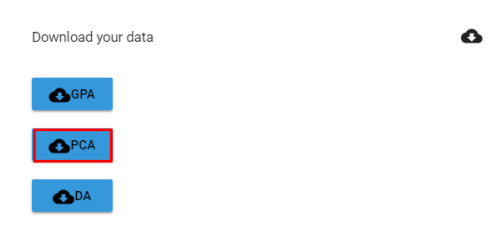
9.2 “Download your data”: Al hacer clic, permite visualizar los resultados de los estadísticos y guardarlos en la plataforma de nuestra preferencia.

9.3 “Graphical outputs”: Despliega el gráfico correspondiente a cada estadístico utilizado.

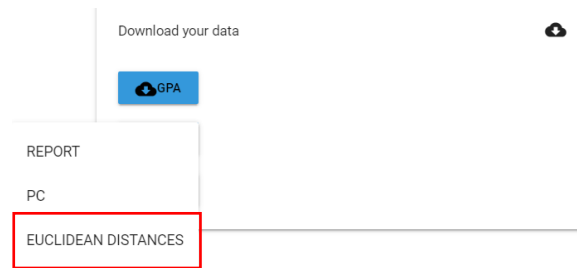
10.- El archivo que se necesita para construir el dendrograma se encuentra en **“Download your data”**. Haga clic y observe las opciones que se despliegan frente a usted:



11.- Presione en **“PCA”** y verá que se despliega una pequeña ventana:



Ahora, escoja la opción **“Euclidean Distances”**:



Una vez más, aparecerá una pequeña ventana emergente. Elija la opción de formato por defecto “**TXT**” y haga clic en “**Show**”:

See and/or download your Analysis Result

Which format would you like ?

TXT CSV JSON

Cancel

Show

En la última ventana emergente, haga clic sobre el recuadro “**Click here to download your data**”. Asegúrese de que su archivo se ha descargado correctamente y presione en “**Close**”


Principal Components Analysis (PCA) - Square matrix between principal components - subdivision: 92,83,102

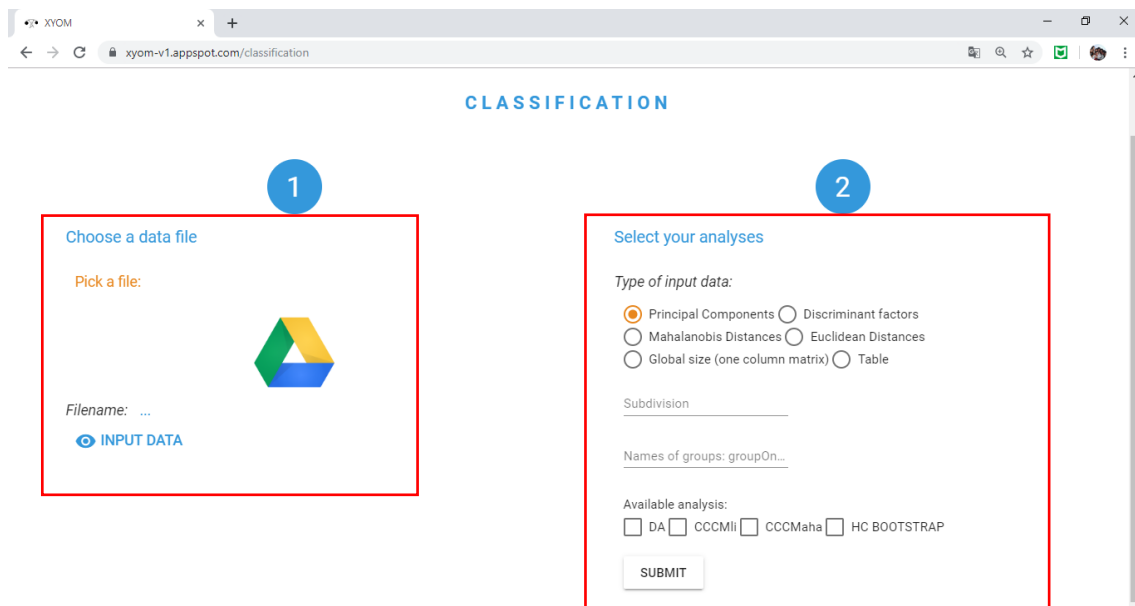
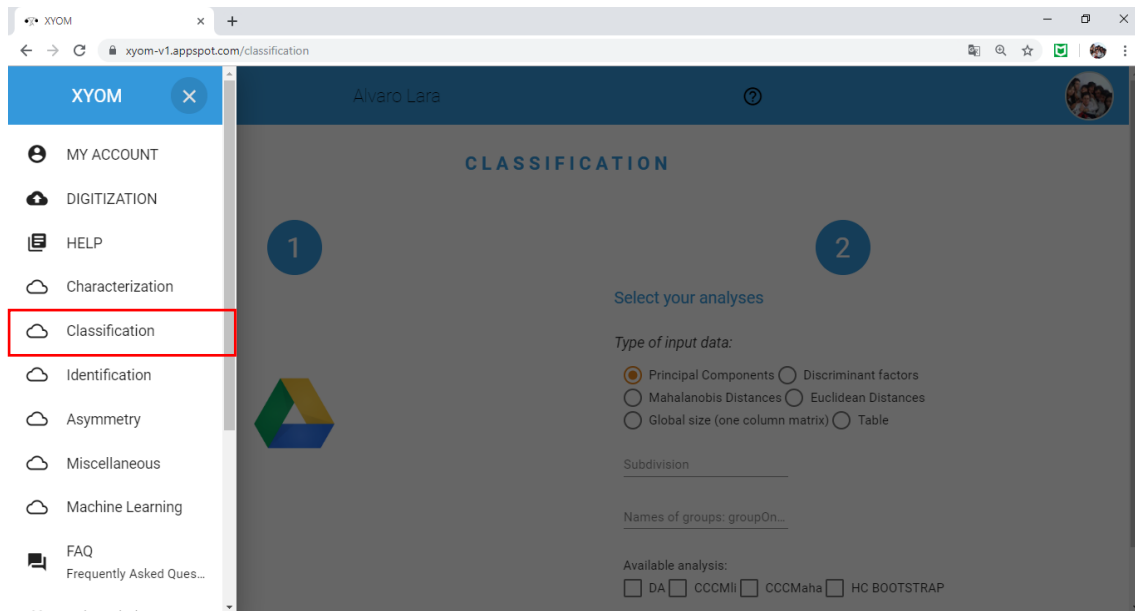
[CLICK HERE TO DOWNLOAD YOUR DATA](#)

Principal Components Analysis (PCA) - Square matrix between principal components - subdivision: 92,83,102


```
0 0.02226848704412665 0.014308334256984391
0.02226848704412665 0 0.022377885134642016
0.014308334256984391 0.022377885134642016 0
```

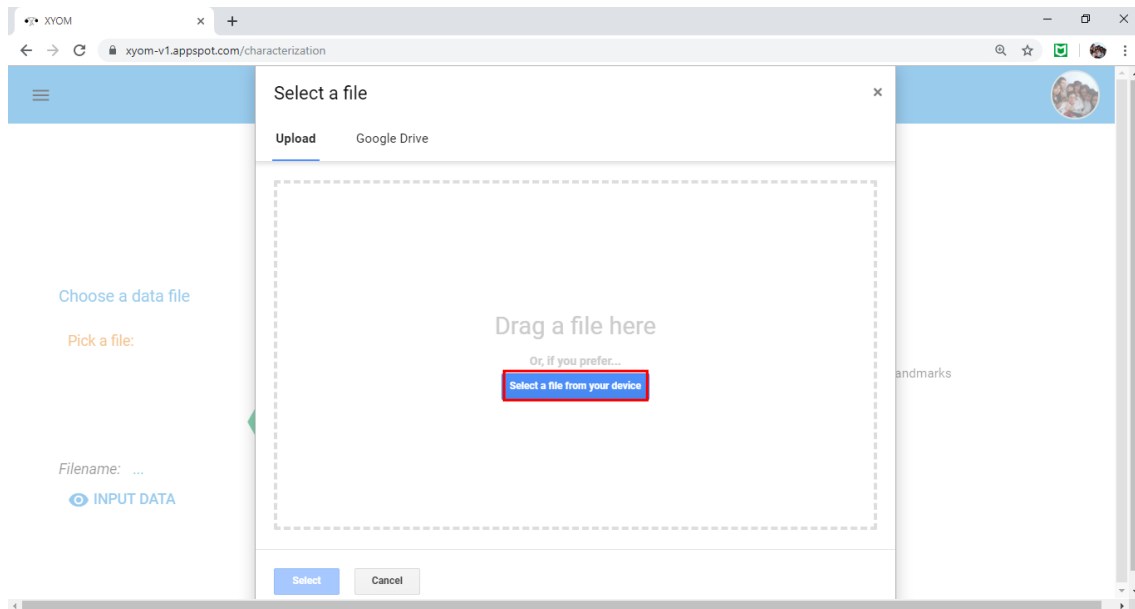
Close

12.- En este punto se puede empezar el trabajo con el siguiente módulo. Para ello, haga clic en el icono  (en la parte superior izquierda de su pantalla) y escoja la opción “**CLASSIFICATION**”:

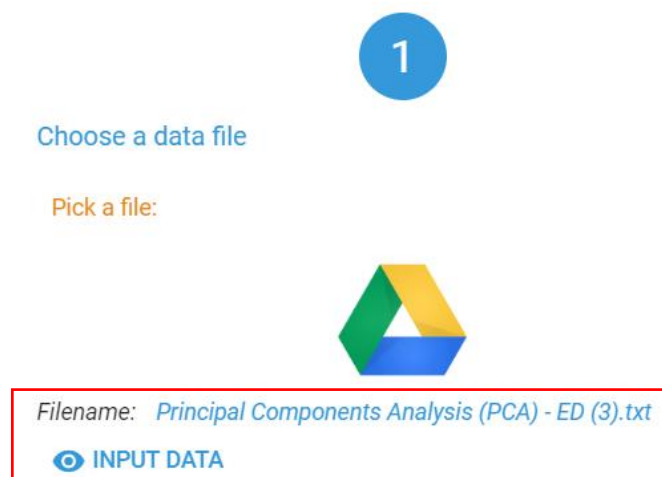


La interfaz de este módulo es muy similar a la de su hermano “CHARACTERIZATION”. Así, 1. “Choose a data file” permite subir un archivo a la plataforma desde su computadora o escoger un archivo desde su carpeta de Google Drive y 2. “Select your analyses” indicar escoger qué tipo de información se está cargando, así como qué análisis ejecutar con esos datos.

13.-. Presione sobre el icono de **Google Drive**  y espere a que se despliegue una ventana emergente. En este caso, vamos a subir el archivo directamente desde nuestra computadora:



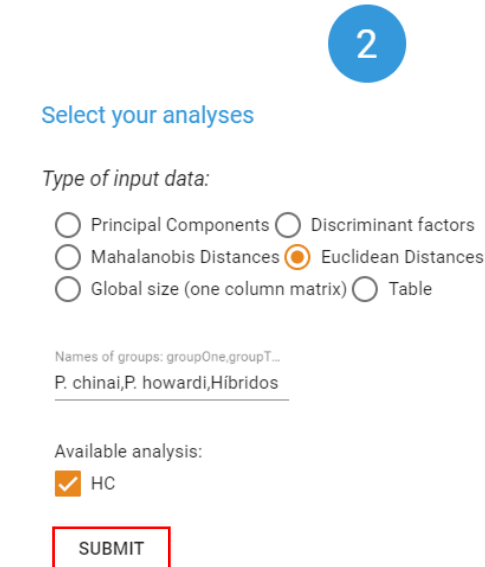
Si la carga se realizó adecuadamente, podrá observar que el nombre del archivo se despliega en la sección inferior izquierda de su pantalla, en la sección “**Filename**”:



14.- Debido a que nuestro archivo está compuesto por distancias euclidianas, vamos a escoger “**Euclidean Distances**” en “**Type of input data**”.

Después, en “**Names of Groups**” escribimos el nombre de cada grupo en el orden en el que se encuentra la subdivisión, con comas y sin espacios. En este ejemplo: **P. chinai,P. howardi,Híbridos**.

Finalmente, en “**Available analysis**”, hacemos clic sobre la única opción de análisis ofrecida “**HC**” (**Hierarchical Classification**) y presionamos en “**SUBMIT**”:



2

Select your analyses

Type of input data:

Principal Components
 Discriminant factors
 Mahalanobis Distances
 Euclidean Distances
 Global size (one column matrix)
 Table

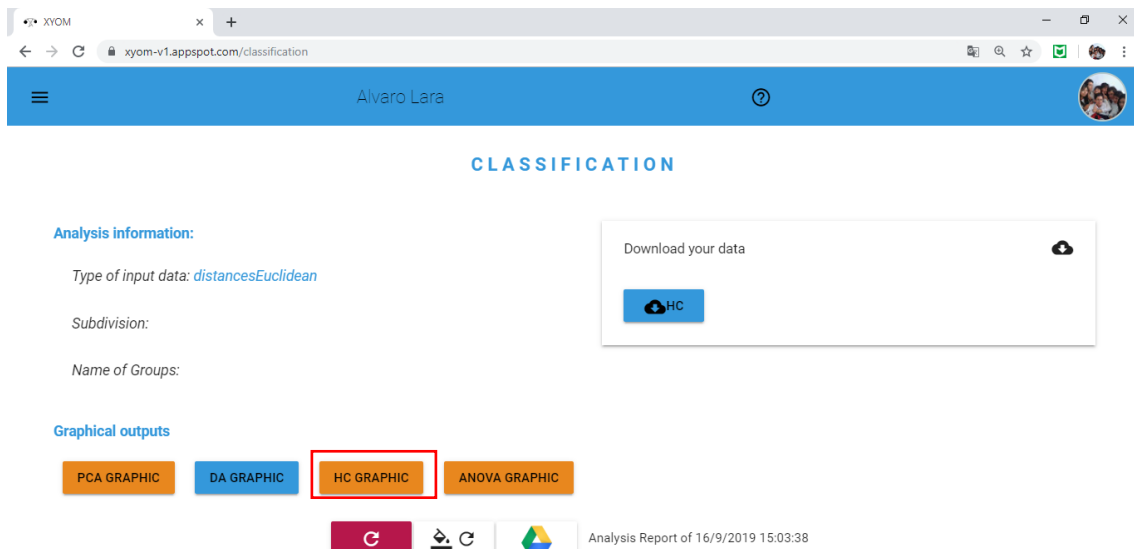
Names of groups: groupOne,groupT...
 P. chinai,P. howardi,Híbridos

Available analysis:

HC

SUBMIT

15.- Si los cálculos se realizaron con éxito, aparecerá la siguiente ventana:



XYOM x +

xyom-v1.appspot.com/classification

Alvaro Lara

CLASSIFICATION

Analysis information:

Type of input data: *distancesEuclidean*

Subdivision:

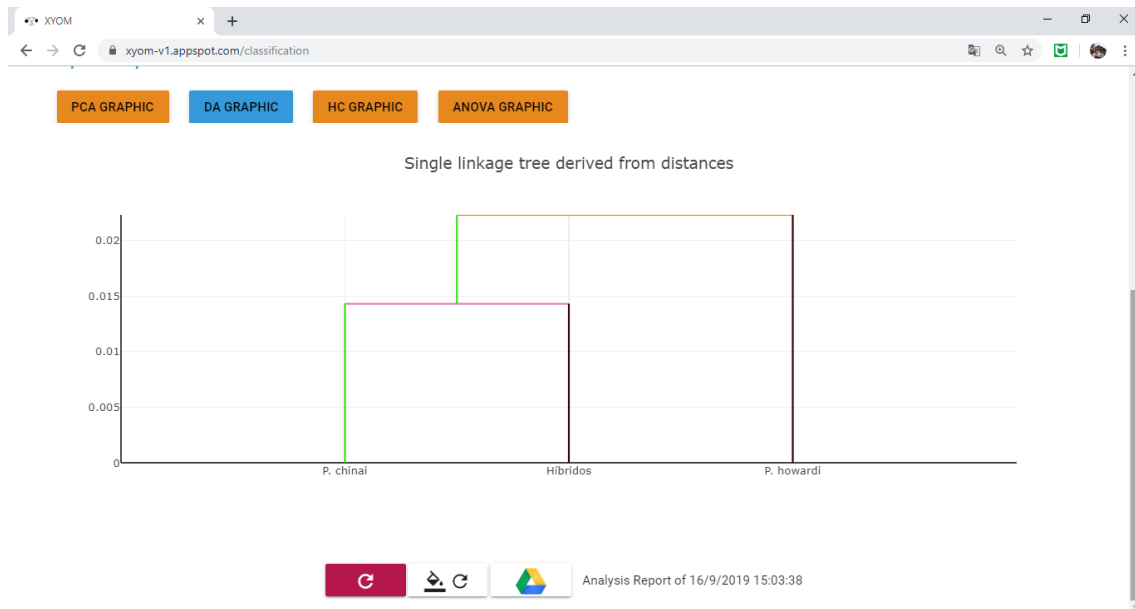
Name of Groups:


Graphical outputs

PCA GRAPHIC
 DA GRAPHIC
 HC GRAPHIC
 ANOVA GRAPHIC

Analysis Report of 16/9/2019 15:03:38

Al dar clic en la opción “**HC GRAPHIC**”, podrá ver el árbol de clasificación (dendrograma) que el programa generó a partir de los datos:



16.- Con el fin de descargar el gráfico, coloque el cursor sobre el dendrograma. Aparecerá una barra de interfaz en la parte superior derecha de su pantalla. Haga clic sobre el icono  “**Download plot as png**”:

