

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Identificación morfométrica y caracterización de los huevos
de cuatro especies de triatomíneos (*Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*,
***Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*) en Ecuador**

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada
en Ciencias Biológicas

MARÍA SOLEDAD SANTILLÁN GUAYASAMÍN

Quito, 2016

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata María Soledad Santillán Guayasamín ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Anita Gabriela Villacís

Directora de la Disertación

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer y dedicar este trabajo a mi familia, quienes me han acompañado incondicionalmente y me han enseñado que todo en esta vida es posible con paciencia, perseverancia y muchísimo esfuerzo. A mi madre, Pilar, por no dejarme caer en ningún momento, por enseñarme a que renunciar no es una opción y por aprender junto a mí las maravillas de la vida. A mi padre, Pepe, por enseñarme a dar lo mejor de mí cada día e impulsarme a luchar por lo que quiero y creo. A mi abuela, Isabel, quien cada día me inculca la paciencia. A mi hermano, Alejandro, por su cariño y ayuda en los momentos difíciles. A mi Dulce, por su compañía, su alegría y su amor incondicional.

Mi más sincero agradecimiento al Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL), y a todas las personas que forman parte del mismo, especialmente a mi directora de tesis, la Dra. Anita Villacís, por confiar en mi trabajo y creer en mis ideas. A mis compañeros de laboratorio Juan José Bustillos, Dino Sánchez, Anabel Padilla, Ignacio Pacheco, Francés Castillo y al MSc. César Yumiseva, por su ayuda durante el desarrollo de este trabajo. Un agradecimiento profundo a Santiago Cadena, por todo el apoyo y las ideas brindadas a este trabajo.

Agradezco al Dr. Jean-Pierre Dujardin, quien me ayudó a sacar esta idea adelante, por todo el apoyo y conocimiento que me ha inculcado desde que nos conocimos. Al Ing. Julio Sánchez-Otero, por todo el apoyo técnico en la parte de la toma de datos y análisis estadísticos. Al personal de la Plataforma de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación de la ciudad de Guayaquil, por permitirme trabajar en sus

instalaciones, especialmente a la Dra. Linda Díaz y Dr. Yasuji Amano por su enseñanza y orientación científica.

A mis lectores, MSc. Álvaro Barragán y Dr. Andrés Romero, por sus consejos, recomendaciones e interés en este estudio.

A los voluntarios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y de la Universidad de Ohio por colaborar cada año en la recolección de triatominos, y sobre todo al personal de campo del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM).

A María José Navarrete, quien fue mi compañera incondicional de clases, estudios y trabajos, gracias por haber sido mi cómplice durante estos cinco años. A Ana Belén Avilés, quien me recuerda la pureza de las personas, gracias por todas las risas. A Elaine Torres y Gabriela López, gracias por sus consejos, por no dejarme renunciar y por siempre hacerme reír.

Finalmente, agradezco a todas los investigadores con los que tuve la oportunidad de trabajar, MSc. Catalina Quintan, Lcdo. Álvaro Pérez, Dr. Omar Torres, Dr. Santiago Ron, Dra. Ana Mafla, Dra. Violeta Rafael, Lcda. Luna Figero, Dr. Keil Clifford y Florencio Mesa, y a mis profesores Dr. Rommel Montúfar, Dra. Martha Grijalva, Mtr. Ma. Fernanda Pilaquinga, Dr. Tjitte de Vries y Dr. Óscar Pérez, por compartir sus conocimientos conmigo, por ser un ejemplo de vida y calidad humana y por ayudarme a formarme como investigadora. Y a todas las personas que conocí durante estos cinco años, quienes siempre me dejaron una enseñanza.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS		IV
TABLA DE CONTENIDO		VI
LISTA DE FIGURAS		XI
LISTA DE TABLAS		XIV
LISTA DE ANEXOS		XVI
1 RESUMEN		1
2 ABSTRACT		3
3 INTRODUCCIÓN		5
3.1 La Enfermedad de Chagas		5
3.1.1 Epidemiología.....		5
3.1.2 El parásito <i>Trypanosoma cruzi</i>		6
3.1.3 Rutas de transmisión.....		7
3.1.4 Síntomas y tratamiento		8
3.2 Triatominos, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas		8
3.2.1 Ecología		8
3.2.2 Taxonomía y sistemática		10
3.2.3 Triatominos en el Ecuador.....		11
3.2.3.1 <i>Panstrongylus chinai</i> y <i>Panstrongylus howardi</i>		11
3.2.3.2 <i>Triatoma carrioni</i>		12
3.2.3.3 <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>		13
3.3 Morfometría Tradicional y Geométrica		13

3.4	Biología del desarrollo de los triatominos	15
3.4.1	Comportamiento reproductivo	15
3.4.2	El estadio huevo	16
3.4.2.1	Desarrollo embrionario	16
3.4.2.2	Formación y estructura del corion.....	18
3.4.2.3	Sistema respiratorio.....	20
3.4.2.4	Análisis morfométricos	21
3.5	Importancia de investigar los huevos de los insectos transmisores de la Enfermedad de Chagas	22
3.6	Objetivos	24
3.6.1	Objetivo General.....	24
3.6.2	Objetivos Específicos	25
3.6.2.1	Estudios Interespecíficos.....	25
3.6.2.2	Estudios Intraespecíficos.....	25
4	MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1	Área de estudio	26
4.1.1	Provincia de Loja.....	26
4.1.2	Provincia de Manabí.....	27
4.2	Recolección de triatominos	27
4.3	Obtención de individuos	29
4.4	Características de los huevos	30
4.4.1	Caracterización exocorial: Microscopía Electrónica de Barrido.....	30

4.5	Análisis Morfométricos	31
4.5.1	Influencia del tiempo de desarrollo, posición y viabilidad en la forma del huevo	33
4.5.2	Morfometría Tradicional	33
4.5.2.1	Análisis multivariado	34
4.5.3	Morfometría Geométrica	34
4.5.3.1	El contorno del huevo: Pseudolandmarks	35
4.5.3.2	El opérculo: Landmarks/Semilandmarks	36
4.6	Análisis estadísticos	38
4.6.1	Morfometría Tradicional	38
4.6.1.1	Análisis univariantes	38
4.6.1.2	Análisis multivariados.....	39
4.6.2	Morfometría Geométrica	40
4.6.2.1	Análisis de la conformación del contorno del huevo	40
4.6.2.2	Análisis de la conformación del opérculo	40
4.6.2.3	Análisis del tamaño	41
4.6.2.4	Efecto alométrico	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Estudios Interespecíficos (entre especies)	42
5.1.1	Descripción de especies	42
5.1.1.1	El huevo de <i>Panstrongylus chinai</i>	42
5.1.1.2	El huevo de <i>Panstrongylus howardi</i>	43

5.1.1.3	El huevo de <i>Triatoma carrioni</i>	44
5.1.1.4	El huevo de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	45
5.1.2	Descripción comparativa de los huevos	46
5.1.3	Influencia del tiempo de desarrollo, posición y viabilidad en la forma de los huevos	47
5.1.4	Morfometría Tradicional del huevo	48
5.1.4.1	Análisis Univariante	48
5.1.4.2	Análisis Multivariado	49
5.1.5	Morfometría Geométrica del contorno y del opérculo del huevo	50
5.1.5.1	Comparación del tamaño del huevo (sqrA) y opérculo (CS).....	50
5.1.5.2	Comparación de la conformación del huevo y del opérculo	50
5.2	Estudios Intraespecífico	53
5.2.1	<i>Panstrongylus chinai</i>	53
5.2.1.1	Comparación del tamaño del huevo entre hábitats.....	53
5.2.1.2	Comparación de la conformación del huevo entre hábitats	53
5.2.2	<i>Triatoma carrioni</i>	54
5.2.2.1	Comparación del tamaño del huevo entre hábitats.....	54
5.2.2.2	Comparación de la conformación del huevo entre hábitats	55
5.2.3	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	56
5.2.3.1	Comparación geográfica y entre hábitats del tamaño del huevo.....	56
5.2.3.2	Comparación geográfica y entre hábitats de la conformación del huevo	58

6	DISCUSIÓN	61
6.1	Estudios Interespecíficos	61
6.1.1	Descripción comparativa	61
6.1.2	Influencia del tiempo de desarrollo, posición y viabilidad en la forma de los huevos.....	68
6.1.3	Variación interespecífica del tamaño de los huevos.....	69
6.1.4	Variación interespecífica de la conformación de los huevos	71
6.2	Estudios Intraespecíficos	75
6.2.1	Tribu Triatomini (<i>Panstrongylus</i> y <i>Triatoma</i>): Comparación entre hábitats	76
6.2.1.1	Comparación del tamaño.....	76
6.2.1.2	Comparación de la conformación	76
6.2.2	Tribu Rhodniini (<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>): Comparación geográfica y entre hábitats	77
6.2.2.1	Comparación del tamaño.....	77
6.2.2.2	Comparación de la conformación	79
6.3	La identificación de los huevos de triatominos y el control vectorial	81
7	LITERATURA CITADA	84
8	FIGURAS	99
9	TABLAS	145
10	ANEXOS	161

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la provincia de Loja (Sur-Andina).	100
Figura 2. Mapa de la provincia de Manabí (Centro-Costa).	101
Figura 3. Recolección de triatominos en ambientes domiciliar, peridomiciliar y silvestre.	102
Figura 4. Obtención de huevos.	103
Figura 5. Análisis Exocorial: Microscopía Electrónica de Barrido.	104
Figura 6. Plataforma para la toma de fotografías de morfometría.	105
Figura 7. Desarrollo del embrión de <i>Triatoma carrioni</i> observado a través del corion. .	106
Figura 8. Huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> : análisis de posición y de estado de viabilidad.	107
Figura 9. Vista ventral/lateral del huevo de <i>Panstrongylus chinai</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	108
Figura 10. Esquema de variables de morfometría tradicional estudiadas.	109
Figura 11. Digitalización de pseudolandmarks en el contorno exterior del huevo.	110
Figura 12. Digitalización de landmarks/semilandmarks en los opérculos.	111
Figura 13. Diagrama de análisis morfométricos realizados.	112
Figura 14. Micrografía del huevo de <i>Panstrongylus chinai</i>	113
Figura 15. Micrografía del huevo de <i>Panstrongylus howardi</i>	115
Figura 16. Micrografía del huevo de <i>Triatoma carrioni</i>	117
Figura 17. Micrografías del huevo de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	119
Figura 18. Diferencia de la forma del contorno de los huevos según el tiempo de desarrollo (estadio inicial y estadio final).	121
Figura 19. Análisis de la diferencia de tamaño y forma de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> según el estado de viabilidad (viables y no-viables).	122

Figura 20. Variación interespecífica del tamaño de los huevos.	123
Figura 21. Variación interespecífica de los huevos mediante análisis de morfometría tradicional “size-in” y “size-out”.....	125
Figura 22. Diferencia de la conformación del huevo y del opérculo a nivel interespecífico.	126
Figura 23. Variación interespecífica de la conformación del huevo y del opérculo.	127
Figura 24. Árbol Neighbor-joining de la conformación del huevo obtenido mediante análisis tradicionales y análisis geométricos.	128
Figura 25. Variación intraespecífica del tamaño de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> a nivel de hábitat (domiciliar y peridomiciliar).....	129
Figura 26. Diferencia de la conformación a nivel intraespecífico de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i>	130
Figura 27. Variación intraespecífica de la forma de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> a nivel de hábitat (domiciliar y peridomiciliar).....	131
Figura 28. Variación intraespecífica del tamaño de los huevos de <i>Triatoma carrioni</i> a nivel de hábitat (domiciliar y peridomiciliar).....	132
Figura 29. Diferencia de la conformación a nivel intraespecífico de los huevos de <i>Triatoma carrioni</i>	133
Figura 30. Variación intraespecífico de la forma de los huevos de <i>Triatoma carrioni</i> a nivel de hábitat (domiciliar y peridomiciliar).....	134
Figura 31. Variación intraespecífica del tamaño de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> a nivel de provincia (Loja y Manabí).	135
Figura 32. Variación intraespecífica del tamaño de las variables tradicionales (LM, DM, DO y DC) de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> a nivel de hábitats (domiciliar, peridomiciliar y silvestre).....	137

Figura 33. Variación intraespecífica del tamaño de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> a nivel de hábitats (domiciliar, peridomiciliar y silvestre)	139
Figura 34. Diferencia intraespecífica de la forma de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> a nivel de provincia (Loja y Manabí).	140
Figura 35. Variación intraespecífica de la forma de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> a nivel de provincia (Manabí y Loja).	141
Figura 36. Diferencia intraespecífica de la forma de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> (Loja) a nivel de hábitat.....	142
Figura 37. Diferencia intraespecífica de la forma de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> (Manabí) a nivel de hábitat.....	143
Figura 38. Variación intraespecífica de la forma de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> a nivel de hábitat (domiciliar, peridomiciliar y silvestre).....	144

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localización Geográfica de las poblaciones analizadas de <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>Panstrongylus howardi</i> , <i>Triatoma carrioni</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	146
Tabla 2. Clasificación de la muestra de huevos para los análisis morfométricos interespecíficos (entre especies) e intraespecíficos (entre hábitats).	147
Tabla 3. Resumen de las comparaciones realizadas para cada objetivo.	148
Tabla 4. Media (\bar{x}) y Desviación estándar (SD) del tiempo de desarrollo/eclosión (T_e) de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>Panstrongylus howardi</i> , <i>Triatoma carrioni</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	149
Tabla 5. Media (\bar{x}), Desviación estándar (SD) y varianza (σ^2) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, $sqrA$, CS) de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>Panstrongylus howardi</i> , <i>Triatoma carrioni</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	150
Tabla 6. Resumen de las diferencias estadísticas de las variables de tamaño (LM, DM, DO, GS, $sqrA$, CS) de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>Panstrongylus howardi</i> , <i>Triatoma carrioni</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	151
Tabla 7. Distancia de Mahalanobis obtenidas del análisis multivariado de LM, DM y DO de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>Panstrongylus howardi</i> , <i>Triatoma carrioni</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	152
Tabla 8. Distancias de Mahalanobis calculadas para las variables de forma del contorno y del opérculo de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>Panstrongylus howardi</i> , <i>Triatoma carrioni</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	153
Tabla 9. Media (\bar{x}) y Desviación estándar (SD) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, $sqrA$, CS) de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> cuyos parentales fueron colectados en los hábitats intradomiciliar y peridomiciliar.	154

Tabla 10. Media (x) y Desviación estándar (SD) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, sqrA y CS) de los huevos de <i>Triatoma carrioni</i> cuyos parentales fueron colectados en los hábitats intradomiciliar y peridomiciliar.	155
Tabla 11. Media (x) y Desviación estándar (SD) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, DC, sqrA) de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> cuyos parentales fueron colectados en los tres diferentes hábitats (intradomiciliar, peridomiciliar y silvestre) de las provincias de Loja y Manabí (Continuación...)	156
Tabla 12. Resumen de las diferencias estadísticas de las variables de tamaño (LM, DM, DO, DC, sqrA, CS) comparadas entre provincias (L: Loja, M: Manabí) y hábitats en que fueron colectados los parentales de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	159
Tabla 13. Distancia de Mahalanobis de la conformación del huevo y del opérculo de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> cuyos parentales fueron colectados en los hábitats intradoméstico, peridoméstico y silvestre de las provincias Loja y Manabí.	160

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Distribución mundial de la Enfermedad de Chagas, se señala los países donde la enfermedad ha sido reportada.....	162
Anexo 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> en el vector (triatomino) y el huésped mamífero (ser humano).	163
Anexo 3. Estadios de desarrollo de los triatominos.	164
Anexo 4. Diferencias del aparato bucal de distintos hemípteros según el tipo de alimentación al que están adaptados.	165
Anexo 5. Comparación de las cabezas de los géneros <i>Rhodnius</i> , <i>Triatoma</i> y <i>Panstrongylus</i>	166
Anexo 6. Especies de triatominos reportados en el Ecuador.	167
Anexo 7. Morfología del adulto de las especies estudiadas (<i>Panstrongylus chinai</i> , <i>P. howardi</i> , <i>T. carrioni</i> , <i>R. ecuadoriensis</i>).....	168
Anexo 8. Ovarios Telotróficos de <i>Rhodnius prolixus</i>	169
Anexo 9. Desarrollo embrionario de <i>Rhodnius prolixus</i>	170
Anexo 10. Estructura de las envolturas extraembrionarias del huevo de <i>Rhodnius prolixus</i>	171
Anexo 11. Huevos de triatominos	172
Anexo 12. Ejemplo teórico de la normalización de los coeficientes de Fourier, análisis elíptico de Fourier (EFA)	173
Anexo 13. Media global de las variables de morfometría tradicional (LM, DM y DO), usada para determinar el coeficiente de variación (CV) en la comparación interespecífica.	174
Anexo 14. ANOVA de un factor para establecer las diferencias entre las variables de morfometría tradicional (LM, DM, DO) analizadas de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>Panstrongylus howardi</i> , <i>Triatoma carrioni</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	175

Anexo 15. Diferenciación de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> , <i>Panstrongylus howardi</i> , <i>Triatoma carrioni</i> y <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> en rangos homogéneos según la significación de las variables tradicionales (LM, DM y DO).	176
Anexo 16. Prueba de t de Student para muestras independientes para establecer las diferencias de las variables tradicionales (LM, DM, DO) entre los hábitats intradomiciliar y peridomiciliar donde fueron colectados los parentales de los huevos de <i>Panstrongylus chinai</i> y <i>Triatoma carrioni</i>	177
Anexo 17. Prueba de t de Student para muestras independientes para establecer las diferencias de las variables tradicionales (LM, DM, DO, DC) entre las provincias Loja y Manabí donde fueron colectados los parentales de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	178
Anexo 18. ANOVA de un factor para establecer las diferencias entre las variables de morfometría tradicional (LM, DM, DO) analizadas de los huevos de <i>Rhodnius ecuadoriensis</i> cuyos parentales fueron colectados en los hábitats intradomiciliar y peridomiciliar y silvestre.	179

1 RESUMEN

El conocimiento acerca de la subfamilia Triatominae se centra típicamente en la sistemática y ecología de los adultos y las ninfas, siendo limitada la información del estadio huevo. Por este motivo, esta investigación propone estudiar los huevos de cuatro especies ecuatorianas epidemiológicamente importantes de las tribus Triatomini y Rhodniini (*Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*). El primer objetivo de este estudio fue describir las características etológicas, ecológicas y morfológicas relacionadas con los huevos. El segundo objetivo fue analizar los huevos por morfometría tradicional y geométrica. Esta última seguida por dos distintos enfoques morfométricos para analizar el huevo: (i) morfometría (outline) para capturar el contorno del huevo completo y (ii) morfometría basada en semilandmarks para capturar la forma del opérculo. La forma y el tamaño fueron comparadas entre las especies y entre los hábitats donde cada especie fue encontrada (domicilio, peridomicilio y silvestre). Los resultados mostraron que las principales diferencias entre tribus fueron: la estrategia de la oviposición (huevos libres o adheridos), el tiempo de desarrollo, el cambio de color durante el desarrollo, la morfología macroscópica (presencia de cuello) y exocorial (tipo de células). Adicionalmente las tribus, especies y poblaciones intraespecíficas fueron distinguidas por el tamaño y la forma del contorno del huevo o del opérculo. Estos resultados sugieren que la geometría de los huevos contiene información útil para identificar las especies; incluso, entre especies cercanas como *P. chinai* y *P. howardi*. Entre hábitats, la variación de la forma fue generalmente significativa para las tres especies. El tamaño puede diferir en diferentes maneras de acuerdo a las comparaciones. Las diferencias métricas en *R. ecuadoriensis* entre hábitats casi podría alcanzar las diferencias entre provincias. Nuestro estudio sugirió perspectivas en varias características poblacionales, como (i) rango taxonómico (ii) aislamiento geográfico o por

hábitat (ausencia de flujo génico), (iii) variación en el tamaño del cuerpo de la hembra, (iv) diferentes requerimientos del hábitat y (v) selección del fenotipo más apto. En conclusión, la morfometría geométrica es una herramienta rápida y de bajo costo, que proporciona información de interés biológico y de relevancia taxonómica.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, triatominos, huevo, opérculo, morfometría geométrica.

2 ABSTRACT

The knowledge about Triatominae subfamily is typically focused in the systematic and ecology of adults and nymphs. The information about the egg stages is very limited. For this reason, this research proposed the study of the eggs of four epidemiologically important Ecuadorian species from the Triatomoni and Rhodniini tribes (*Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *Triatoma carrioni* and *Rhodnius ecuadoriensis*). The first aim of this study was to describe ethological, ecological and morphological characteristics related with the eggs. The second aim was to analyze the eggs by traditional and modern morphometrics. The latter followed two different methods: (i) the outline-based approach to capture the whole contour of the egg, and (ii) the semilandmark-based one to capture the operculum shape. Shape and size were compared between species and between habitats where each species was found (domicile, peridomicile and sylvatic). The results showed that the main differences between tribes were the: oviposition strategy (free or fastened eggs), development time, color change during development, macroscopic (presence of neck) and exochorial (kind of cells) morphologies. In addition tribe, species and intraspecific populations were distinguished by the size and shape of the contour or the operculum. These results suggest that the geometry of the eggs contains useful information to identify species, even between two very close species such as *P. chinai* and *P. howardi*. Between habitats, the variation of shape was generally significant for the three species. Size could differ in different ways according to the comparisons. Metric differences in *R. ecuadoriensis* between habitats almost could reach the amount of the differences observed between provinces. Our study suggested insights in various population features, like (i) taxonomic rank, (ii) geographical or habitat isolation (lack of gene flow), (iii) variation in body size of female, (iv) different habitat requirements and, (v) selection of the most adaptive phenotype. In conclusion, the geometric

morphometric is a fast and low cost tool, providing interesting biological and relevant taxonomic information.

Key words: Chagas disease, Triatominae, egg, operculum, geometric morphometry.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 La Enfermedad de Chagas

3.1.1 Epidemiología

La ECh o tripanosomiasis americana es la cuarta enfermedad parasitaria más importante en América Latina (Schofield, 1994; Lee *et al.*, 2013). La ECh es considerada parte de las trece enfermedades desatendidas del mundo (Hotez *et al.*, 2007). En el pasado, la ECh afectaba solo a las personas que viven y han vivido en zonas donde existe el vector de transmisión (países endémicos) (Rassi *et al.*, 2010). En la actualidad, esta enfermedad se ha extendido a países no-endémicos por la migración (Dias *et al.*, 2002).

La distribución endémica de la ECh va desde el sur de Argentina al sur de Estados Unidos (Rassi *et al.*, 2010) (Anexo 1). La ECh está asociada a zonas rurales con condiciones de pobreza (Guhl, 2007; Rassi *et al.*, 2010). Se estima que aproximadamente 10 millones de personas están infectadas y más de 25 millones están en riesgo de infección en los países endémicos (OMS, 2010).

En el Ecuador, la prevalencia es de 1.38%, estimándose que de 165 000 a 170 000 personas son seropositivas a la infección por *T. cruzi* (Guhl, 2007). Cada año alrededor de 4 400 personas adquieren esta infección y 1 300 mueren (Guhl, 2007). Estudios realizados en zonas de riesgo revelan que la prevalencia de *T. cruzi* seropositivo es de 5.7% en Manabí, 1.0% en Guayas, 3.6% en Loja, 1.4% en Sucumbíos, 3.4% en Orellana y 2.3% en Napo (Grijalva *et al.*, 2003; Black *et al.*, 2007).

3.1.2 El parásito *Trypanosoma cruzi*

La ECh es causada por la transmisión del protozooario hemoflagelado *T. cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (de Lana & Marquéz, 2010). El parásito es altamente heterogéneo y presenta seis grandes linajes genéticos (de TcI a TcVI) (Devera *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2004). En Ecuador, estudios de Ocaña-Mayorga *et al.* (2010) y Costales *et al.* (2015) demuestran solo la presencia de TcI en el Sur y Centro del Ecuador. Sin embargo, el perfil de isoenzimas de muestras seropositivas de las tres regiones del país demostró la presencia del genotipo zymodeme III, que no pertenece ni a TcI, ni a TcII (Garzón *et al.*, 2002).

El parásito infecta naturalmente a más de 180 especies de mamíferos (Coura, 2013). El ser humano se considera un huésped reciente en la historia evolutiva de *T. cruzi* (Briones *et al.*, 1999). El primer contacto entre estos dos organismos se estima que ocurrió a finales del Pleistoceno, hace aproximadamente 15 mil años (Briones *et al.*, 1999; Aufderheide *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2004). Por consiguiente, la ECh era enzoótica silvestre; pero cuando el ser humano inició la invasión de zonas silvestre se transformó en antropozoonosis (Coura 2007).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, pasa por tres etapas distintas morfológica y fisiológicamente (de Lana & Marquéz, 2010). Este parásito requiere del insecto triatomino como vector y de algún mamífero como huéspedes definitivos (Rassi *et al.*, 2010). Cuando el triatomino se alimenta de un mamífero portador de *T. cruzi*, se infecta con tripomastigotes sanguíneos no-replicativo que circulan en la sangre del huésped (Rassi *et al.*, 2010; de Lana & Marquéz, 2010). Estos en el intestino medio del vector se diferencia en epimastigotes y

se multiplican sucesivamente (de Lana & Marquéz, 2010). En el intestino posterior del insecto (recto), el parásito se diferencia en tripomastigote metacíclico (de Lana & Marquéz, 2010). Los tripomastigotes son eliminados en las heces y orina del vector sobre la piel o mucosa del huésped (de Lana & Marquéz, 2010). Estos invaden las células del huésped definitivo y se transforman en amastigote (de Lana & Marquéz, 2010). En esta etapa, el parásito se replica en el citoplasma de las células y se alojan en los tejidos musculares y/o del corazón (Rassi *et al*, 2010). Finalmente, los amastigotes se diferencian en tripomastigotes y son liberados para (i) invadir otra célula y repetir el proceso de replicación o (ii) entrar en el sistema circulatorio (Anexo 2) (Rassi *et al*, 2010; de Lana & Marquéz, 2010).

3.1.3 Rutas de transmisión

Las formas de transmisión de *T. cruzi* se dan por: (i) contacto con las heces contaminadas de triatomíneos, (ii) ingesta de alimentos contaminados, (iii) transmisión congénita, (iv) transfusiones de sangre, (v) trasplantes de órganos, (vi) accidentes de laboratorio y/o por (vii) el manejo inadecuado de los cadáveres de animales infectados (Jurberg & Galvão, 2006; Rassi *et al.*, 2010; Coura, 2013).

En países endémicos, la forma vectorial (i) es el principal modo de transmisión (Moncayo, 2003). Cuando el huésped frota (rasca) el área por donde ingresó la probóscide. Esta acción estimula el ingreso del parásito (heces) al torrente sanguíneo del huésped (OMS, 2002; de Lana & Marquéz, 2010).

3.1.4 Síntomas y tratamiento

Esta enfermedad tiene tres fases: la fase aguda, la fase crónica (aparece después de 10-20 años de la exposición) y la fase indeterminada (Rassi *et al.*, 2010). La fase aguda se caracteriza por ser asintomática y en pocos casos (<5-10%) generar síntomas similares a una enfermedad febril, inflamación en el sitio de la inoculación (chagoma) o edema palpebral unilateral (síndrome de Romaña) (OMS, 2002; Rassi *et al.*, 2010). En la fase crónica, el 40% de los individuos infectados desarrollan alteraciones cardíacas (cardiopatías) y el 10-15% alteraciones digestivas (visceromegalias, especialmente megaesófago y megacolon) o neurológicas (OMS, 2002; Rassi *et al.*, 2010). En la fase indeterminada los pacientes no presentan manifestaciones de la enfermedad (OMS, 2002; Rassi *et al.*, 2010).

Actualmente, no existe una vacuna o una cura efectiva contra la ECh. Los medicamentos antiparasitarios benznidazol (Bayer®) y nifurtimox (Roche®) pueden ser altamente eficaces en la fase aguda, en niños menores de 12 años (curan al 80% de los pacientes) y en algunos casos de fase crónica (Rassi *et al.*, 2010; Viotti *et al.*, 2014). Estos fármacos presentan efectos secundarios (Viotti *et al.*, 2014).

3.2 Triatomos, insectos vectores de la Enfermedad de Chagas

3.2.1 Ecología

Los triatomos presentan la estrategia demográfica K. Esta estrategia integra a organismos grandes, que producen poca descendencia, ciclos de desarrollo largos, escasa capacidad de dispersión activa y comportamiento alimenticio tímido (Schofield, 1994; Jurberg & Galvão,

2006; Noireau & Dujardin, 2010). Estos insectos son hematófagos obligatorios; pero se ha observado canibalismo y/o conservación de hábitos ancestrales de depredación (Lent & Wygodzinsky, 1979; OMS, 2002; Jurberg & Galvão, 2006).

Estos insectos se pueden encontrar en cualquier hábitat donde exista refugio climático y acceso a una fuente de sangre (Jurberg & Galvão, 2006; Galvão & Justí, 2015). Los hábitats en que se desarrollan pueden ser: silvestre, peridoméstico y doméstico (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão & Justí, 2015). Estos ambientes están interconectados por movimientos del vector o de los huéspedes (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão & Justí, 2015).

Durante el ciclo de vida, los triatominos pasan por la etapa de huevo y cinco etapas ninfales (NI-NV) (Schofield, 1994; Villacís *et al.*, 2008; Noireau & Dujardin, 2010) (Anexo 3). Las ninfas y adultos pueden infectarse con el parásito *T. cruzi* (Schofield, 1994). La probabilidad de infección incrementa con el número de veces que estos se alimenta (Rassi *et al.*, 2010; Noireau & Dujardin, 2010). La metamorfosis de estos insectos es hemimetábola (Schofield, 1994). El estadio adulto se caracteriza por la presencia de ocelos y el desarrollo completo de las alas externas y la genitalia (Jurberg & Galvão, 2006; Noireau & Dujardin, 2010).

Los triatominos son de hábitos nocturnos, tienden alimentarse de su víctima mientras ella duerme (Jurberg & Galvão, 2006). Sus actividades se centran en la búsqueda de alimento en la noche y de refugio en la madrugada (Jurberg & Galvão, 2006). Estudios de ciclo circadiano demuestran que, su pico de actividad se adapta a la de su huésped (Constantinou, 1984; OMS, 2002; Schilman *et al.*, 2009). Los estímulos que ayudan al triatomino a encontrar su presa son el calor, el dióxido de carbono y el ácido láctico (Schofield, 1994;

Jurberg & Galvão, 2006). Estas señales son detectadas por termo y quimiorreceptores localizados en las antenas y partes genitales (Schofield, 1994; Jurberg & Galvão, 2006).

La alimentación puede durar 10-30 minutos (Jurberg & Galvão, 2006). Durante este proceso, el cuerpo se torna globoso, debido al estiramiento de las membranas intersegmentarias y conectivas (Jurberg & Galvão, 2006). La saliva de los triatominos presenta anestésicos (picadura no duele), anticoagulantes y sustancias que promueven la vaso dilatación e inhiben la hemostasis (Schofield, 1994). Existen reportes de insectos que pueden pasar largos periodos de ayuno, hasta 200 días (Lent & Wygodzinsky, 1979; OMS, 2002).

La defecación puede ocurrir durante la alimentación, posterior a ella o lejos del sitio de succión (Jurberg & Galvão, 2006). Este es un factor que permite evaluar la efectividad de estos insectos como vectores de la ECh (Jurberg & Galvão, 2006; Villacís *et al.*, 2008). Un triatomo se considera un vector eficiente de la ECh si (i) tiene la capacidad de domiciliarse y formar grandes colonias, (ii) está infectado con *T. cruzi* y (iii) defeca durante la alimentación y/o mientras está en contacto con el huésped (Forattini *et al.*, 1977; Lent & Wygodzinsky, 1979; Molina *et al.*, 2000).

3.2.2 Taxonomía y sistemática

Los triatominos, chinches, chinche caballo, chinchorros, vinchucas, kissing bugs o barbeiro están dentro del orden Hemiptera, suborden Heteroptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae (Schofield & Galvão, 2009). Los miembros de la subfamilia Triatominae presentan un aparato bucal con dos pares de estiletes: (i) el estilete mandibular, que perfora la piel del huésped del ancho de la probóscide o labrium, y (ii) el estilete maxilar, que busca

y lacera las venas, para que la probóscide delgada, recta y tres segmentada succione la sangre del huésped (Noireau & Dujardin, 2010) (Anexo 4).

Triatominae se compone de 140 especies distribuidas en 5 tribus y 15 géneros (Schofield & Galvão, 2009). La adaptación a distintos hábitats ha permitido la gran diversidad de esta familia (Molina *et al.*, 2000). Todas las especies de la subfamilia son capaces de transmitir *T. cruzi*, pero pocas se consideran de importancia epidemiológica (OMS, 2002; Schofield & Galvão, 2009). Los géneros más relevantes y diversos son *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius* (Schofield & Galvão, 2009) (Anexo 5).

3.2.3 Triatominos en el Ecuador

En el Ecuador se han registrado 16 especies de triatominos, de las que 13 especies son consideradas actuales o potenciales vectores de ECh (Abad-Franch *et al.*, 2001; Villacís *et al.*, 2010) (Anexo 6). Se reportan triatominos en 18 de las 24 provincias. Las provincias de Loja y Manabí presentan alta tasa de prevalencia de la enfermedad y alto grado de infestación, por lo que son las más estudiadas (Aguilar *et al.*, 1999; Grijalva *et al.*, 2003; Grijalva, *et al.*, 2005; Black *et al.*, 2007).

3.2.3.1 *Panstrongylus chinai* y *Panstrongylus howardi*

Panstrongylus chinai es una especie reportada en Venezuela, Ecuador (Loja, El Oro) y Perú (Abad-Franch *et al.*, 2001; Cuba Cuba *et al.*, 2002; Patterson *et al.*, 2009). En Loja es considerada vector secundario y se encuentra en hábitat domiciliar y peridomiciliar, asociado a nidos de gallinas (Abad-Franch *et al.*, 2001; Grijalva *et al.*, 2015). El ciclo de vida de esta

especie se completa a los 371.40 ± 22.34 días, a $24 \pm 6^\circ\text{C}$ de temperatura y $70 \pm 10\%$ de humedad relativa (RH) (Mosquera *et al.*, 2016) (Anexo 7).

Panstrongylus howardi es una especie endémica de la provincia de Manabí. En esta localidad se considera un vector secundario de extrema importancia, debido a que es sinantrópica (acumulaciones de madera, roca y ladrillos) (Aguilar *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2001; Grijalva *et al.*, 2011; Costales *et al.*, 2015; Villacís *et al.*, 2015). El hábitat silvestre de esta especie es poco conocido (Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Villacís *et al.*, 2015). Existen pocos estudios sobre *P. howardi*, especie que ha sido considerada una forma melánica de *P. chinai* (Patterson *et al.*, 2009; Villacís *et al.*, in prep.) (Anexo 7).

3.2.3.2 *Triatoma carrioni*

Triatoma carrioni se encuentra distribuida en el sur del Ecuador (provincia de Loja) y al norte de Perú (Abad-Franch *et al.*, 2001; Grijalva *et al.*, 2015). Se la reporta en zonas secas y húmedas con un rango altitudinal de 1 000-2 650 m, siendo la única especie que se encuentra hasta los 2 425 m.s.n.m (Lent & Wygodzinsky, 1979; Abad-Franch *et al.*, 2001; Grijalva *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2015). Esta especie es considerada sinantrópica; se desconoce su el hábitat silvestre (Abad-Franch *et al.*, 2001; Grijalva *et al.*, 2005). En condiciones de laboratorio, a $24 \pm 6^\circ\text{C}$ de temperatura y 70% de RH, el ciclo de vida de los machos tarda 307.9 ± 81.3 días y el de las hembras, 445.8 ± 981.8 (Padilla, 2016) (Anexo 7).

3.2.3.3 *Rhodnius ecuadoriensis*

Rhodnius ecuadoriensis ha sido reportada al norte de Perú y en varias provincias de Ecuador (Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Guayas, Los Ríos, El Oro y Loja); estos presentan asociación con las palmas *Phytelephas* en la región central costera ecuatoriana (Aguilar *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2001; Guhl, 2007; Coura, 2013). En el hábitat silvestre ecuatoriano, *R. ecuadoriensis* está asociada a ardillas (*Sciurus stramineus*), aves (*Campylorhynchus fasciatus*), marsupiales, ratones y ratas; mientras que en el doméstico a gallinas y cuyes (Grijalva & Villacís, 2009; Grijalva *et al.*, 2011). El desarrollo de huevo a adulto de esta especie, al replicar las condiciones de Manabí ($27\pm 5^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ RH) y Loja ($24\pm 6^{\circ}\text{C}$, $70\pm 5\%$ RH), es de 189.9 ± 20 días y 181.3 ± 6.4 días, respectivamente (Villacís *et al.*, 2008) (Anexo 7).

3.3 Morfometría Tradicional y Geométrica

La morfometría es la descripción cuantitativa, análisis e interpretación de la forma (conformación) y de la variación de la misma como resultado del crecimiento, tratamientos experimentales o evolución (Rohlf, 1990a; Rohlf & Marcus, 1993). Esta técnica describe y compara la forma de un organismo o de una estructura particular de este (Rohlf & Marcus, 1993; Dujardin *et al.*, 2007). Se divide en dos tipos: (i) la morfometría tradicional (MT), que se basa en la medición de distancias lineares entre puntos (longitud, anchura, altura, ángulos y proporciones entre medidas) y (ii) la morfometría geométrica (MG), fundamentada en la captura de la geometría del objeto de estudio mediante puntos de referencia o landmarks (Rohlf & Marcus, 1993; Adams *et al.*, 2004; Reyment, 2010).

La MG se desarrolla en respuesta a varias limitaciones de la MT (Zelditch *et al.*, 2004). Esta técnica moderna cambia la descripción de la forma en términos de sus dimensiones, a la relación espacial entre los puntos anatómicos de referencia (Zelditch *et al.*, 2004; Dujardin, 2008; Toro *et al.*, 2010). Los puntos de referencia están formados por coordenadas cartesianas (Zelditch *et al.*, 2004). Estos se clasifican en cinco tipos: (i) tipo I o clásicos, se encuentran en intersecciones de estructuras o tejidos y son cercanos a estructuras particulares, (ii) tipo II, se encuentran en los máximos o mínimos de curvaturas, (iii) tipo III, son puntos extremos, cuya posición se relacionan con otros landmarks, (iv) pseudolandmarks, se localizan en estructuras que carecen de landmarks clásicos, describen contornos y/o límites curvos y (v) semilandmarks, combinan datos de contornos con los de puntos clásicos, describen la curva entre dos landmarks homólogos (Bookstein, 1990a; Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004; Dujardin *et al.*, 2014; Toro *et al.*, 2010).

La MG permite analizar por separado las variables de forma y tamaño, debido a que remueve el efecto de la variación de tamaño entre los organismos de estudio (Zelditch *et al.*, 2004; Dujardin & Slice, 2007). La MG determina la variación de tamaño con un solo coeficiente (CS, \sqrt{A}) (Zelditch *et al.*, 2004). Esta técnica también permite cuantificar la relación entre estos dos componentes (efecto alométrico) (Zelditch *et al.*, 2004; Dujardin & Slice, 2007).

En la entomología médica, la morfometría tiene como objetivos ayudar al reconocimiento de especies e incrementar el conocimiento sobre la plasticidad fenotípica y la estructura poblacional de los vectores (Dujardin & Slice, 2007; Dujardin *et al.*, 2007). Esto se relaciona con el mejoramiento de estrategias de control (Dujardin & Slice, 2007; Dujardin *et al.*, 2007; Dujardin, 2008). En los triatominos, se han realizado varios estudios enfocados en la cabeza y alas de estos insectos. En estos estudios se ha analizado adaptaciones a nuevos hábitats,

efectos del control químico, análisis del origen de la re-infestación después de control vectorial, análisis de estructura poblacional, identificación de especies y otros (Dujardin *et al.*, 2007; Dujardin & Slice, 2007; Dujardin *et al.*, 2009; Gaspé *et al.*, 2012).

3.4 Biología del desarrollo de los triatominos

3.4.1 Comportamiento reproductivo

Los triatominos, y los hemípteros en general, presentan ovarios telotróficos. Este tipo de ovario se caracteriza porque el oocito está conectado a las células nutricias y a las foliculares hasta el final del periodo de crecimiento (Huebner & Anderson, 1972a; King & Akai, 1984; Atella *et al.*, 2005). Cada hembra posee dos ovarios suspendidos en el hemocele. Cada ovario tiene dos hemi-ovarios, cada uno formado por siete ovariolas (Huebner & Anderson, 1972a, 1972b, 1972c; Atella *et al.*, 2005). La parte apical de la ovariola es la cámara trófica o germarium, donde se encuentran las células nutricias. Estas células se conectan al vitelarium por el cordón trófico. El vitelarium está compuesto de tejido prefolicular, tejido folicular y oocitos en desarrollo (Huebner & Anderson, 1972a, 1972c; King & Akai, 1984) (Anexo 8).

La cópula dura de 15 a 30 minutos (Jurberg & Galvão, 2006). Este proceso estimula la oviposición, acelera la maduración de los oocitos o ambos (Hinton, 1981). En *T. infestans*, la cópula estimula la producción ovárica (Catalá, 1989). En *R. prolixus*, las secreciones (matrones) de la glándula accesoria de los machos genera la contracción del oviducto (Hinton, 1981).

Durante la fertilización, el macho deposita espermatozoides en la vagina femenina. Cuando los espermatozoides se rompen, se liberan espermatozoides que migran a la espermateca, donde son guardados permanentemente o hasta fertilizar un huevo (Jurberg & Galvão, 2006; Noireau & Dujardin, 2010).

La oviposición ocurre de 10-30 días después de la cópula (Jurberg & Galvão, 2006). Este proceso se repite varias veces, a pesar de que la hembra sea fecundada solo una vez (Jurberg & Galvão, 2006). Existen reportes de hembra virgen que colocan huevos, los cuales son infértiles (Lent & Wygodzinsky, 1979; Jurberg & Galvão, 2006). El número de huevos varía según la especie y depende de factores ambientales (humedad y temperatura) y de la disponibilidad de alimento que presente la hembra (Lent & Wygodzinsky, 1979; Jurberg & Galvão, 2006).

3.4.2 El estadio huevo

3.4.2.1 Desarrollo embrionario

La embriología en triatominos se ha centrado en la descripción general de la morfología del embrión mediante observaciones a través del corion y cortes histológicos (de Villar *et al.*, 1980; Srickman, 1983; Kelly & Huebner, 1989; Visciarelli *et al.*, 2001; Ibáñez *et al.*, 2009). Se conoce muy poco sobre la dinámica de expresión génica detrás de este proceso.

Los huevos son fertilizados por un espermatozoide que pasa a través del micrópilo; estructura localizada en la región opercular (cap) del huevo (Kelly & Huebner, 1989). Los huevos de los exopterigota son grandes, debido a la cantidad de yema que presentan es

suficiente para el desarrollo de las ninfas (adultos pequeños e incompletos) (Hinton, 1981).

En *R. prolixus* el clivaje inicial ocurre en el centro del huevo, donde los núcleos (energidas) formados migran al periplasma (superficie) del huevo formando el blastodermo sincitial (Mellanby, 1935; Kelly & Huebner, 1989; Ibáñez *et al.*, 2009; Berni *et al.*, 2014) (Anexo 9A). Posteriormente, se forman las membranas plasmáticas alrededor de cada núcleo (blastodermo celular) y se distinguen dos poblaciones diferentes de células somáticas (Kelly & Huebner, 1989; Berni *et al.*, 2014). Estas formarán el rudimento embrionario (primordio), células destinadas a invaginarse durante la gastrulación, y la membrana extraembriónica o cerosa, células que rodean al rudimento embrionario y yema (Kelly & Huebner, 1989; Berni *et al.*, 2014) (Anexo 9B-C).

Durante la gastrulación, se forma la banda germinal que se extiende en dirección céfalo-caudal desde el polo posterior del huevo (Kelly & Huebner, 1989; Ibáñez *et al.*, 2009) (Anexo 9D-F). En este momento, el embrión tiene los ejes anteroposterior y dorso-ventral invertidos con respecto al huevo (Kelly & Huebner, 1989; Ibáñez *et al.*, 2009; Berni *et al.*, 2014) (Anexo 9G-I). La segmentación empieza en la región anterior del embrión (parte posterior del huevo), simultáneamente el embrión inicia la fase de crecimiento (Anexo 9J-U) (Mellanby, 1935; Berni *et al.*, 2014). Durante esta fase, el embrión gira 180° y sus ejes antero-posterior y dorso-ventral se orientan en el mismo sentido que los del huevo, proceso conocido como katasitropia (Kelly & Huebner, 1989; Ibáñez *et al.*, 2009; Berni *et al.*, 2014) (Anexo 9W-X). Posterior a esto, el embrión empieza a cerrarse dorsalmente, la yema se internaliza e inicia la organogénesis (Kelly & Huebner, 1989; Ibáñez *et al.*, 2009).

Durante el nacimiento, el embrión inicialmente consume el fluido amniótico; esto genera el incremento de su masa corporal y la difusión del aire a través del corion (Wigglesworth, 1972). Esto ayuda al embrión a empujar y deshacerse el opérculo. A través del orificio estrecho que deja el opérculo, el nuevo individuo (ninfa) eclosiona mediante contracciones peristálticas musculares (Wigglesworth, 1972). Cuando el nuevo individuo está casi completamente afuera, pierde la cutícula que queda unida al corion (Wigglesworth, 1972; Lent & Wygodzinsky, 1979; Jurberg & Galvão, 2006)

3.4.2.2 Formación y estructura del corion

Durante la ovogénesis, las células foliculares que rodean al oocito estimulan su crecimiento, intervienen en la vitelogénesis (acumulación de yema) y producen la capa secundaria que se convierte en el corion (Huebner & Anderson, 1972a, 1972c; King & Akai, 1984). La diferenciación del epitelio es en mosaico; por lo que las células de la parte apical (cap) y lateral del huevo son morfológicamente distintas (Huebner & Anderson, 1972a). Durante la vitelogénesis, las células foliculares en la parte lateral presentan grandes espacios extracelulares y las apicales son largas y están estrechamente yuxtapuestas (Huebner & Anderson, 1972a). Al finalizar la formación del corion, el huevo es liberado en el oviducto, donde es retenido hasta ser fertilizado (Beament, 1946; Atella *et al.*, 2005).

Las envolturas extraembrionarias protegen al oocito y al embrión durante el desarrollo y permiten el intercambio gaseoso, acceso del espermatozoide y la eclosión (Tuft, 1950; Hinton, 1981; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2011). Esto es un reto, debido a la alta relación área:volumen y a las limitaciones de movimiento que estos presentan (Schilman *et al.*, 2009).

Estas envolturas, conocidas también como cáscaras del huevo, pueden ser flexibles o rígidas según la adaptación del individuo (Wigglesworth, 1972).

El huevo está compuesto por dos envolturas, el corion y la membrana vitelina. El corion es secretado por las células foliculares en el ovario de la madre. Estas células dejan la forma de su contorno esculpidas en la superficie del mismo (Wigglesworth, 1972; Hinton, 1981; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2011). La membrana vitelina se origina de la pared celular del óvulo y ayuda al oocito a secretar la capa cerosa primaria (Wigglesworth, 1972; Hinton, 1981; Gurgel-Gonçalves *et al.*, 2011).

El corion está formado por el endocorion y exocorion. El endocorion es la capa gruesa y compleja compuesta de escleroproteína (Wigglesworth, 1972). Esta se forma sobre la membrana vitelina (Wigglesworth, 1972). Esta capa se estructura desde el exterior al interior del huevo en endocorion resistente, capa ámbar, capa externa de polifenoles, capa de proteínas resistentes y capa interna de polifenoles (Beament, 1946). El exocorion otorga la apariencia externa al huevo, lo asegura a la superficie o le sirve para unirse a otros huevos (Wigglesworth, 1972). Esta capa está formada por el exocorion resistente y el exocorion suave (Beament, 1946) (Anexo 10).

Después de la fertilización, la membrana epembriónica (epembryonic) o cera secundaria se inserta en la capa cerosa primaria (Wigglesworth, 1972; Hinton, 1981). Esto significa que, las capas coriónicas aumentan de grosor durante el desarrollo, especialmente en el polo anterior (Tuft, 1950; Wigglesworth, 1972; Hinton, 1981). El objetivo de esto es evitar la desecación, reparar el hueco hecho por el espermatozoide (micrópilo) y proveer rigidez mecánica al huevo (Tuft, 1950; Wigglesworth, 1972; Hinton, 1981). Los micrópilos se

localizan en la gotera espermática (da Rosa *et al.* 2000).

Según Barata (1981, 1998) y Rivas *et al.* (2013), la caracterización exocorial del huevo es importante a nivel taxonómico. Este ha demostrado ser un carácter especie-específico en algunos organismos, como entre las especies del género *Rhodnius* (*R. colombiensis*, *R. milesi* y *R. stali*) (dos Santos *et al.*, 2009), del género *Triatoma* (*T. breyeri*, *T. costalimai*, *T. matogrossensis*, *T. sherlocki*, *T. tibiamaculata* y *T. williami*) (Obara *et al.*, 2007a), del género *Anopheles* (complejo *A. vestitipennis*, complejo *A. gambiae* y poblaciones *A. aquasalis*) (Linley *et al.*, 1993; Lounibos *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1999), e inclusive, entre 20 especies de la familia Cerambycidae (Hernández, 1991). Esta descripción incluye la identificación y, en algunos casos, cuantificación de regiones especializadas: micrópilo y aerópilos (Barata, 1981, 1998; Aldana *et al.*, 2011).

3.4.2.3 Sistema respiratorio

El corion no es completamente impermeable, ya que durante el desarrollo los huevos necesitan intercambiar oxígeno y dióxido de carbono (Wigglesworth, 1972). La mayoría de los huevos terrestres tiene una capa de gas en el corion o red intracoriónica (Hinton, 1981). Esta red se conecta con la atmósfera mediante aerópilos (Hinton, 1981). Estos son estructuras para la respiración, que varían en cantidad según el organismos y sus adaptaciones (Hinton, 1981).

La estructura de esta red es variable (Hinton, 1981). En *Rhodnius*, la capa de aire se mantiene entre columnas verticales en el interior del corion (Hinton, 1981). Las columnas están organizadas en hexágonos irregulares (Hinton, 1981). El interior de los hexágonos no

presenta columnas, por lo que este sistema no es continuo (Hinton, 1981). En *Triatoma*, el centro interno de cada hexágono presenta un tubo folicular (pits) (Hinton, 1981). Los tubos foliculares se conectan con una cavidad de aire, siendo desconocida la conexión entre estos y los aerópilos (Hinton, 1981). En estas especies los aerópilos se encuentran en el borde de los hexágonos desde la mitad del grosor del corion (Hinton, 1981).

3.4.2.4 Análisis morfométricos

Los huevos de los triatominos son ovalados o elípticos, ligeramente asimétricos y presentan un opérculo convexo liso u ornamentado en el extremo anterior (Readio, 1926; Ábalos & Wygodzinsky, 1951; Lent & Wygodzinsky, 1979; Schofield, 1994). Estos presentan una gran variedad de tamaños, formas y adaptaciones, siendo posible determinar características que permiten reconocer a que familia y género pertenecen y, en algunos casos, hasta especie (Readio, 1926; Evangelista-Martínez *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2013) (Anexo 11A).

La identificación de los huevos de las distintas especies de triatominos se ha basado en descripciones morfológicas, como la caracterización exocorial (Barata, 1998; Aldana *et al.*, 2011). Mediante estos estudios, se considera al opérculo, borde corial y borde opercular como estructuras relevantes del huevo (Barata, 1998; Rivas *et al.*, 2013). Mientras que, las características de reconocimiento entre especies son la presencia/ausencia del cuello, collar y hendidura lateral (Barata, 1998; Rivas *et al.*, 2013) (Anexo 11B).

Estudios de MT han demostrado que algunas variables (diámetro del cuello, diámetro máximo, longitud máxima y proporciones entre estas) permiten reconocer los huevos de ciertas especies y poblaciones (Rodríguez *et al.*, 1999; da Rosa *et al.*, 2000; Obara *et al.*,

2007a; dos Santos *et al.*, 2009). Por ejemplo, las diferencias entre cuatro especies del género *Meccus* (*M. pallidipennis*, *M. picturatus*, *M. phyllosomus* y *M. longipennis*) (Obara *et al.*, 2007b), entre seis especies del género *Triatoma* (*T. barberi*, *T. dimidiata*, *T. lecticularia*, *T. mexicana*, *T. rubida*, *T. protracta protracta* y *T. protracta nahuatlae*) (Rivas *et al.*, 2013), entre tres especies del género *Rhodnius* (*R. colombiensis*, *R. milesi* y *R. stali*) (dos Santos *et al.*, 2009), entre tres poblaciones de *P. megistus* (da Rosa *et al.*, 2003), entre cuatro poblaciones de *T. brasiliensis* (Costa *et al.*, 1997).

Existe solo un estudio que aplica la MG en huevos, el cual demuestra que la geometría del borde corial y del collar del huevo permite reconocer especies de *Rhodnius* (*R. prolixus*, *R. robustus*, *R. nasutus*, *R. neivai* y *R. neglectus*) (Páez-Colasante and Aldana 2008). Por ello, es indispensable profundizar el uso de esta herramienta para identificar los huevos de las distintas especies.

3.5 Importancia de investigar los huevos de los insectos transmisores de la Enfermedad de Chagas

Los estudios realizados en triatominos se centran en identificar a los principales vectores de la ECh, con el fin de dirigir adecuadamente las medidas de control (Alonso Calle *et al.*, 2008). Sin embargo, pocas investigaciones analizan los huevos de estas especies (González *et al.*, 2009). El reconocimiento de los huevos presentes en un domicilio, indica: (i) el potencial ecológico de una especie para invadir las viviendas y posteriormente domiciliarse (adaptación), (ii) la posible re-invasión de una especie después del control de su presencia mediante insecticidas y/o (iii) el posible reemplazo de una especie por otra (especie

secundaria), debido a que esta es menos susceptible al control químico (Freitas, 1963; Dias, 1965; Forattini *et al.*, 1970).

El punto de control más efectivo para disminuir la incidencia de la ECh es el control químico de los vectores mediante insecticidas piretroides (Schofield & Dujardin, 1997; Grijalva *et al.*, 2011). Se ha demostrado que el uso de insecticidas residuales elimina a estos vectores temporalmente (Schofield, 2001; Grijalva *et al.*, 2011). Esto se debe a que se generan altas tasas de re-infestación por parte de poblaciones silvestres y a que los huevos puestos en lugares de difícil acceso como grietas y hendiduras no son afectados por estos químicos (Schofield, 2001; Jurberg & Galvão, 2006; Guhl *et al.*, 2009; Grijalva *et al.*, 2011).

Estudios sobre la acción ovicida de algunos químicos, indican que estos causan la interrupción de la actividad nerviosa al inhibir la colinesterasa (Picollo *et al.*, 1976; de Villar *et al.*, 1980). En consecuencia, la mortalidad ocurre si se han formado los neuroblastos, aumenta cuando el sistema nervioso está completo y disminuye antes de la eclosión (Picollo *et al.*, 1976; de Villar *et al.*, 1980). La disminución de efecto ovicida antes de la eclosión se relaciona con el cierre dorsal del embrión durante el desarrollo (de Villar *et al.*, 1980).

Por ende, los huevos son resistentes en etapas tempranas, ya que carecen del tejido blanco del insecticida, y en la parte final de su desarrollo, debido a mecanismos degradativos poco conocidos (Picollo *et al.*, 1976; de Villar *et al.*, 1980). En los huevos de algunas poblaciones de *T. infestans*, se ha observado que la resistencia a la deltametrina (detoxificación) está relacionada con la acción de la citocromo P450 monooxigenasa (Tolozá *et al.*, 2008).

Un método alternativo para el control es el uso de parasitoides (Picollo *et al.*, 1976). Microhimenópteros de los géneros *Telenomus*, *Coellocyrtus* y *Aprostocetus* han demostrado que pueden parasitar los huevos de los géneros *Psammolestes*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma* en la naturaleza o en ambientes artificiales (laboratorio) (Felicangeli *et al.*, 1978; Gorla & Schofield, 1985; Rabinovich *et al.*, 2000; dos Santos *et al.*, 2014). El requerimiento de proximidad espacial entre los organismos (distribución), las necesidades ambientales de los parasitoides y la especificidad del hospedero perjudica la efectividad de este método de control (Picollo *et al.*, 1976; Gorla & Schofield, 1985).

La presencia de huevos en los domicilios señala el grado de importancia de la especie como vector, debido a que esta tiene la capacidad de adaptarse al domicilio (Forattini *et al.*, 1977). Los adultos puede generar resistencia a los insecticidas por la exposición de los huevos a estos y por el efecto ovicida no eficaz de los mismos (Picollo *et al.*, 1976; de Villar *et al.*, 1980). Por consiguiente, la identificación de las características especie-específicas es indispensable para el mejoramiento del control de estos vectores (Forattini *et al.*, 1977).

3.6 Objetivos

3.6.1 Objetivo General

Identificar las características de reconocimiento de los huevos de las especies *Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis* recolectadas en las provincias de Loja y Manabí, utilizando como herramientas de investigación: análisis de microscopía óptica y electrónica de barrido, morfometría geométrica y morfometría tradicional del huevo.

3.6.2 Objetivos Específicos

3.6.2.1 Estudios Interespecíficos

- Describir los huevos de *P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis* mediante análisis de microscopía óptica y electrónica de barrido.
- Determinar si existen diferencias interespecíficas en los huevos de *P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis* utilizando la técnica de morfometría geométrica y morfometría tradicional del huevo.

3.6.2.2 Estudios Intraespecíficos

- Determinar si existen diferencias fenotípicas intraespecíficas entre los hábitats domiciliar, peridomiciliar y silvestre de *P. chinai*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis* utilizando la técnica de morfometría geométrica y morfometría tradicional del huevo.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio

Los individuos parentales de los huevos usados en este estudio fueron colectados en las provincias de Loja y Manabí. En Loja, se colectó en trece comunidades: Ashimingo, Bella María, Chaquizca, Coamine, El Huayco, Gerinoma, Guara, Quisanga, Piedra Grande, Tacoranga, Vega del Carmen, Yambaguana y Yunga (Figura 1). En Manabí, se colectó en cuatro comunidades: Bejuco, Cruz Alta, El Zapallo y Naranjo Adentro (Figura 2). En total, en este estudio se trabajó con huevos de 17 comunidades del Ecuador (Tabla 1).

4.1.1 Provincia de Loja

Loja es una provincia Andina localizada al Sur del Ecuador, que tiene clima templado seco, relieve irregular que no sobrepasa los 3 700 m.s.n.m y vegetación principalmente arbustiva (Grijalva *et al.*, 2012; INAMHI, 2014). Las viviendas de las comunidades analizadas se caracterizan por tener paredes de adobe, piso de tierra y techo de tejas (Nieto-Sanchez *et al.*, 2015) (Figura 3A). Existen algunas viviendas mejoradas que presentan el piso y las paredes enlucidos con cemento (Nieto-Sanchez *et al.*, 2015).

En Loja, se ha reportado triatominos en los tres hábitats (Nieto-Sanchez *et al.*, 2015). El grado de colonización está relacionado con la arquitectura de las casas, las cuales están llenas de grietas, carecen de luz natural y presentan acumulaciones de materiales dentro y cerca de la vivienda (Nieto-Sanchez *et al.*, 2015). La especie más representativa en esta provincia es *R. ecuadoriensis* (98%); existen pequeñas poblaciones de *T. carrioni*, *P. rufotuberculatus* y

P. chinai (Grijalva *et al.*, 2003, 2005; Grijalva & Villacís, 2009; Nieto-Sanchez *et al.*, 2015).

4.1.2 Provincia de Manabí

La provincia de Manabí se encuentra en la región costera al noroccidente del país (INAMHI, 2014). La topografía de esta localidad es plana con colinas de baja altura y su clima es subtropical seco y húmedo (INAMHI, 2014). Las casas en esta zona del país presentan paredes de caña guadúa (*Guadua angustifolia*), techo de hojas de palma (*Phytelephas aequatorialis*) o láminas de zinc (en menor cantidad) y piso de madera (Black *et al.*, 2007) (Figura 3B).

En Manabí, no existen reportes de triatominos en domicilio (Grijalva *et al.*, 2011). Esto se asocia con el ingreso esporádico y falta de escondites que otorgan las paredes de caña (Grijalva *et al.*, 2011). El principal vector, al igual que en Loja, es *R. ecuadoriensis* (77%), seguido de *P. howardi* (22%) y con la presencia de pequeñas poblaciones de *P. rufotuberculatus* (0.6%) (Black *et al.*, 2009; Grijalva *et al.*, 2011; Costales *et al.*, 2015; Villacís *et al.*, 2015).

4.2 Recolección de triatominos

La recolección de los individuos parentales de este estudio se realizó en diversos años, bajo normas estrictas de bioseguridad (Grijalva *et al.*, 2005). Las búsquedas se realizaron en los tres ambientes, con la colaboración del personal del Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM), del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Crónicas

(CIEIC), actualmente Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL), y estudiantes de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y de la Universidad de Ohio.

La búsqueda en el ambiente domiciliario y peridomiciliario se efectuó durante 1 hora/hombre, principalmente en los dormitorios (cama, ropa acumulada) y nidos de gallinas o de otros animales (Grijalva *et al.*, 2005) (Figuras 3C-D). En caso de encontrar triatominos, la vivienda fue considerada infestada y se procedió a la recolección de insectos, exuvias o huevos en frascos de plástico etiquetados con el código de vivienda, fecha, lugar de la casa y especie (Grijalva *et al.*, 2005). En el hábitat silvestre, la búsqueda se realizó en nidos de mamíferos y aves, madrigueras, huecos en troncos y árboles, entre raíces o cortezas de plantas y bajo acumulaciones de troncos o rocas (Grijalva & Villacís, 2009) (Figura 3E). Los sitios de revisión son elegidos al azar. Además, en la provincia de Manabí, se buscó en palmeras, *Phytelephas aequatorialis*, conocidas como palmas de tagua o cade (Sánchez, 2015).

Con los individuos colectados se formaron colonias en el insectario del CISeAL. Los triatominos de Loja fueron colocados en una incubadora con fotoperiodos de 12 horas, temperatura de $24\pm 6^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa (RH) del $70\pm 5\%$ (Villacís *et al.*, 2008). Las condiciones de la incubadora de los individuos de Manabí fueron fotoperiodos de 12 horas, temperatura de $27\pm 5^{\circ}\text{C}$ y $75\pm 5\%$ RH (Villacís *et al.*, 2008). Este trabajo se realizó bajo el protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Oficio-CBE-019-2014) y de la Universidad de Ohio, Estados Unidos, (15-H-034-IACUC). Los permisos de colecta para este estudio fueron: 002-07-IC-FAU-DNBAPVS/MA, 016-07-IC-FAU-DNBAPVS/MA, 006-IC-FLO-DPL-MA, 003-2011-IC-FAU-DPL-MA, 008-IC-INSEC-DPL-MA, 011-2015-IC-INF-VS-DPL-MA.

4.3 Obtención de individuos

Se separaron individuos ninfa V (NV) de *P. chinai*, *P. howardi* y *R. ecuadoriensis*, lo que aseguró la obtención de hembras vírgenes. En frascos de plástico con pedazos de papel filtro, se colocó 2 hembras y 3 machos. Estos frascos fueron cubiertos con tela tipo tul y una liga, por motivos de bioseguridad y alimentación. Se colocó los individuos de ambas provincias, en similares condiciones, fotoperiodos de 12 horas a $25\pm 6^{\circ}\text{C}$ y $70\pm 5\%$ RH. Los individuos se alimentaron por 15 minutos cada 15 días con sangre de palomas mantenidas en el Bioterio del CISEAL.

Para *P. chinai* y *R. ecuadoriensis* se formaron 4 colonias (frascos) por comunidad. Se consideró por separado los dos hábitats de Bella María donde fueron recolectados los individuos de *R. ecuadoriensis*. Se formaron cuatro colonias de *P. howardi*, debido a que fue colectado en una sola comunidad (Tabla 1). En total de estas tres especies se obtuvieron 76 colonias y 152 hembras.

Los frascos fueron revisados a diario en la mañana, para la separación de huevos encontrados en el papel, base o paredes del frasco (Figuras 4A-B). Cada huevo fue colocado en un tubo eppendorf con un código único. Este código indica la especie a la que pertenece y su día de nacimiento. En el caso de *P. howardi*, los huevos nacidos en el mismo día se mantuvieron en un solo tubo eppendorf. Se formaron grupos máximo de 15 individuos, debido a que al mantenerlos individualmente morían. Se registró el día de nacimiento y puesta de cada individuo. Los huevos de *T. carrioni* fueron obtenidos de cuatro hembras traídas del campo. Se desconoce el día exacto en que fueron colocados y su tiempo de desarrollo, excepto de siete individuos (Figura 4C).

4.4 Características de los huevos

Se describió a los huevos según lo planteado por Barata (1981, 1998). Se identificó: (i) si los huevos están pegados al sustrato, (ii) la forma, (iii) la presencia/ausencia de macroestructuras (hendidura lateral, cuello, collar, ornamentaciones del opérculo) (Anexo 11B), (iv) el cambio de coloración que sufren el embrión durante el desarrollo (manchas oculares), (v) el tiempo de eclosión, (vi) el porcentaje de nacimiento y (vii) las características exocoriales.

La identificación de macroestructuras y los cambios de coloración del embrión se observaron en el estereomicroscopio Olympus SZ61/SZ51. El tiempo de desarrollo (Te) se determinó mediante la fórmula $Te = Tn - Tp + 1$, donde Tp es el día de puesta y Tn el de nacimiento. Se calcularon la media, desviación estándar y valores máximos y mínimos de Te . El porcentaje de individuos que eclosionaron se calculó mediante la fórmula

$$\frac{N \text{ individuos nacidos}}{\text{Total de individuos}} \times 100.$$

4.4.1 Caracterización exocorial: Microscopía Electrónica de Barrido

Se seleccionaron cinco huevos eclosionados (corion y opérculo) de cada especie. Estos huevos se montaron en una plataforma de alambre de cobre mediante cinta doble faz (Figura 5A). Este material se recubrió de oro por 4 minutos en el evaporador de vacío Jeol JFC-1200 (Figura 5B). Este proceso aumenta la emisión secundaria de electrones, previene la sobrecarga eléctrica y otorga contraste a la muestra para la visualización (Amano & Díaz, 2012) (Figuras 5C). Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido JEOL® JSM 5310, ubicado en el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación

(INSPI), en la Plataforma del Microscopía Electrónica en la ciudad de Guayaquil (Figura 5D).

Las fotografías se tomaron mediante una cámara digital externa. El enfoque y regulación del brillo, contraste y de la aceleración de voltaje para cada imagen se realiza en la pantalla del microscopio (Figura 5D). La aceleración de voltaje se relaciona con el zoom, ya que a mayor zoom se requiere mayor aceleración de voltaje y se espera una mejor resolución y contraste en la imagen (Amano & Díaz, 2012). El tiempo de exposición por fotografía fue de 100 segundos. Las características de interés fueron los aerópilos y micrópilos y la arquitectura exocorial del corion y del opérculo.

4.5 Análisis Morfométricos

Se construyó una plataforma para fotografiar a los huevos, debido a cuestiones de bioseguridad y a la magnificación máxima de la cámara utilizada. La plataforma era una tuerca. En la base de la tuerca, se pegó un círculo de cartulina negra y un semicírculo de papel milimetrado, los cuales tenían 10 mm de diámetro (Figura 6A). Con un cilindro de cartulina blanca, se formaron paredes alrededor de la base de la tuerca (Figura 6B). Las paredes son necesarias debido a que los huevos pueden rodarse (Figura 6C). La plataforma fue pegada a una tarrina de 21 x 12 x 5 cm (largo:ancho:altura), por cuestiones de bioseguridad.

Los huevos fueron fotografiados mediante la cámara MiScope®-MIP (1.3 megapíxeles, 40X: 7.5 x 10 mm; 140X: 1.8 x 2.5 mm) (Figura 6D). La plataforma en que fueron fotografiados los huevos afecta la distancia focal mínima, por ende la magnificación. La

magnificación para los huevos de la tribu Triatomini (*Panstrongylus* y *Triatoma*) fue 280X y para los huevos de *R. ecuadoriensis* fue 240X.

Para homogeneizar los datos, los huevos fueron fotografiados en el mismo día de desarrollo y en la misma posición. Todos los huevos analizados fueron viables, el individuo se desarrolló y eclosionó normalmente.

Los huevos del género *Panstrongylus* fueron fotografiados el día 25 de su desarrollo en posición ventral. En esta posición se observa la cara convexa del huevo y las manchas oculares del embrión, debido a que los huevos son colocados sobre su hendidura lateral. Los huevos de *T. carrioni* se fotografiaron el día donde las manchas oculares se oscurecieron (día 20-23) en posición ventral (Figura 7). Los huevos de *R. ecuadoriensis*, en cambio, fueron fotografiados el día 10 de su desarrollo en posición lateral. En esta posición, se puede ver claramente el cuello y la hendidura queda en posición lateral

En el análisis morfométrico interespecífico (entre especies) se utilizaron 310 huevos: 78 de *P. chinai*, 75 de *P. howardi*, 76 de *T. carrioni* y 81 de *R. ecuadoriensis*. En el análisis intraespecífico (entre hábitats), se usaron 58 huevos de *P. chinai*, 41 de *T. carrioni* y 135 de *R. ecuadoriensis* (78 de Loja y 57 de Manabí). Se procuró que el número de muestra de los grupos, tanto para la comparación entre especies como para la comparación entre hábitats, sea similar (Tabla 2).

4.5.1 Influencia del tiempo de desarrollo, posición y viabilidad en la forma del huevo

Para determinar la influencia de estos tres factores se analizó la forma del contorno los huevos mediante MG. Para el análisis de la variación de la forma según el tiempo de desarrollo, los huevos fueron colocados en pedazos de papel con cinta doble faz. Esto evita cambios de posición. Se fotografió diariamente 12 huevos de *P. chinai* y 11 de *R. ecuadoriensis*. Los días fueron divididos en estadios inicial y final. El criterio de división se basó en el cambio de coloración del embrión y de las manchas oculares, según lo que se observó en los resultados (Figura 7). Para el análisis de posición, se tomó fotografías de 13 huevos de *P. chinai* en posición dorsal y ventral (Figura 8A). Los huevos estaban en el día 25 de su desarrollo. En el análisis de viabilidad, se utilizó 30 huevos viables y 30 no viables (el embrión no se desarrolló) de *P. chinai*, los que se fotografiaron en el día 25 de desarrollo (Figura 8B).

4.5.2 Morfometría Tradicional

Mediante el programa Collection of COOrdinates (COO v98) (Dujardin, 2002), se tomaron ocho landmarks tipo II en los huevos de *R. ecuadoriensis* y seis en los de *P. chinai*, *P. howardi* y *T. carrioni* (Figura 9). Esto generó una base de coordenadas, de las que se calculó todas las distancias posibles entre los puntos mediante el Software Table Space Tabulations (TETv98). A partir de estos datos, se obtuvo las variables: longitud máxima (LM), diámetro máximo (DM), diámetro del opérculo (DO) y diámetro del cuello (DC). La última solo se obtuvo de los huevos de *R. ecuadoriensis* (Figura 10). Estas variables se sometieron a análisis univariantes y multivariados.

4.5.2.1 Análisis multivariado

Las variables (distancias) fueron transformados a logaritmos y analizados en el software PAD v98 (Permutaciones, Análisis Discriminante). Este permite analizar las distancias incluyendo el tamaño (size-in) o excluyendo este (size-out) (Dujardin, 2002). El enfoque “size-in” solo se realizó para las comparaciones interespecíficas. El enfoque “size-out” extrae el componente de tamaño de los datos, por lo que solo analiza la conformación (Darroch & Mosimann, 1985; Klingenberg, 1996). Este proceso remueve el cambio isométrico, que es el cambio de tamaño que no modifica las proporciones del objeto (Dujardin, 2002; Dujardin & Slice, 2007). Mediante este enfoque, se estimó el tamaño global (GS) (variable de tamaño), que es el logaritmo del promedio geométrico de las variables utilizadas (Darroch & Mosimann, 1985; Klingenberg, 1996; Dujardin, 2002).

4.5.3 Morfometría Geométrica

Se aplicaron dos diferentes enfoques geométricos: (i) morfometría de contornos (outline) para el huevo completo (Figura 11) y (ii) morfometría basada en landmarks/semilandmarks para el opérculo (Figura 12). La toma de datos (digitalización) y análisis se realizaron en los distintos módulos del software Collecting Landmarks for Identification and Characterization v98 (CLIC) (Dujardin, 2002). Los pasos básicos para este estudio son: (i) la digitalización de datos en el módulo COO v98, (ii) la extracción de las variables forma y tamaño, lo cual utiliza técnicas distintas para cada enfoque y (iii) la discriminación de grupos mediante las variables de formas.

4.5.3.1 El contorno del huevo: Pseudolandmarks

Los pseudolandmarks se digitalizaron alrededor del contorno exterior de cada huevo. En las partes donde hay cambios bruscos en la curvatura, la densidad de puntos aumenta (Rohlf, 1990b). Estos puntos no son equidistantes y no están en igual número entre individuos (Dujardin *et al.*, 2014) (Figura 11). Estas son características permitidas por el análisis elíptico de Fourier (EFA), el cual fue utilizado para analizar los datos. Este análisis permite la extracción del tamaño separadamente de la forma (Kuhl & Giardina, 1982; Rohlf, 1990a).

El EFA describe una curva cerrada (no abierta) mediante la descomposición de esta en senos y cosenos de curvas sucesivas (funciones sinusoidales), llamadas armónicas (Kuhl & Giardina, 1982; Krieger, 2010). Las armónicas son descritas por cuatro coeficientes (Kuhl & Giardina, 1982). La primera armónica aproxima la forma a una elipse (Kuhl & Giardina, 1982; Rohlf & Archie, 1984). Esta armónica se usa para estandarizar los coeficientes de Fourier, que al no cambiar con el tamaño, la rotación y la posición del punto inicial, generan los coeficientes elípticos de Fourier normalizados (NEF) (Kuhl & Giardina, 1982; Rohlf & Archie, 1984; Krieger, 2010; Dujardin *et al.*, 2014). El escalamiento genera que la longitud del semi-eje mayor de la elipse de la primera armónica sea 1, lo que ajusta los coeficientes restantes (Lestrel, 1989). La rotación se genera hasta que el eje mayor de la elipse de la primera armónica sea paralelo al eje de la forma analizada (Lestrel, 1989) (Anexo 12).

Después de estas transformaciones, los tres primeros coeficientes son constante (1, 0 y 0) y no se utilizan en los análisis (Rohlf & Archie, 1984). El cuarto coeficiente de la primera armónica otorga la excentricidad a la elipse, se relaciona con la proporción longitud:ancho de la curva y se usa para los análisis (Lestrel, 1989). La forma puede ser recreada a partir de

las armónicas (Kuhl & Giardina, 1982; Krieger, 2010). El número de armónicas determinan el grado de fidelidad de la forma extraída por digitalización a la forma original (Kuhl & Giardina, 1982; Krieger, 2010). Respecto al tamaño, se estimó la raíz cuadrada de su superficie del huevo (\sqrt{A}).

Este procedimiento se realizó en el módulo FOG v98. Este software proporciona dos maneras de normalizar los contornos: los NEF y los coeficientes de Fourier alineados por la superposición de Procrusters (Dujardin, 2002). El primero sirve para la comparación entre grupos y el segundo para observar gráficamente la diferencia entre grupos (Dujardin, 2002). Este último requiere que la digitalización sea en sentido horario y que todos los contornos inicie en el mismo punto (Dujardin, 2002). Debido a esto, los huevos se orientaron con el opérculo en el lado izquierdo y la unión borde opercular-borde corial fue el punto de inicio de la digitalización (Figura 11).

4.5.3.2 El opérculo: Landmarks/Semilandmarks

El contorno del opérculo se analizó por separado mediante la técnica de landmarks/semilandmarks. Esta estructura no se analizó mediante el EFA debido a que el límite borde corial-borde opercular no se diferencia con claridad en todos los individuos estudiados. En los huevos de la tribu Triatomini, se digitalizaron dos landmarks y doce semilandmarks según la configuración {1 8} {2 4}. En los huevos de *R. ecuadoriensis*, se digitalizó cuatro landmarks y doce semilandmarks, {2 8} {4 4} (Figura 12). La configuración indica el número de semilandmarks que se colocó entre landmarks sucesivo. Esta configuración {1 8} significa que se digitalizaron 8 semilandmarks (SL) después del

landmark (LM) número 1, es decir entre el LM 1 y LM2. La configuración {2 4} significa 4 SL después del LM2, etc.

El programa genera líneas perpendiculares al segmento que conecta los LM, líneas llamadas templado o guía (Dujardin, datos no publicados). En la intercepción entre la curva del opérculo y líneas perpendiculares se colocaron los semilandmarks. La diferencia del huevo entre las dos tribus dificultó reconocer landmarks homólogos entre estas. Debido a ello, el opérculo de *R. ecuadoriensis* no se incluyó en los análisis interespecíficos.

Estos puntos fueron sometidos al Análisis Generalizado de Procrustes (GPA), superposición que minimiza la diferencia entre los puntos de referencia equivalentes (Zelditch *et al.*, 2004). Para ello, (i) el centroide de cada configuración de puntos se traslada al origen, (ii) se escalan las configuraciones según el tamaño centroide (CS) y (iii) se rotan las configuraciones (Rohlf & Slice, 1990; Adams *et al.*, 2004; Dujardin & Slice, 2007). El alineamiento final se restringe a los semilandmarks mediante el método de superposición dependientes del templado (template-dependent semilandmark superimposition) (Dujardin, datos no publicados). Los LM se proyectan perpendicularmente sobre el templado promedio; templado construido entre los LM de la forma consenso (Dujardin, datos no publicados).

El GPA genera coordenadas residuales, las cuales se proyectan en el plano Euclidiano (espacio tangencial lineal) (Kendall, 1977; Zelditch *et al.*, 2004). Esto permite visualizar la diferencia entre configuraciones y realizar los análisis multivariados (Adams *et al.*, 2004; Zelditch *et al.*, 2004). Este proceso se realizó en el módulo MOG v98 (Morfometría Geométrica), dando como resultado la separación de las variables de tamaño y forma (Bookstein, 1990b; Dujardin & Slice, 2007). Respecto al tamaño, se estimó el tamaño

centroide (CS), que es la raíz cuadrada de la suma de las distancias elevadas al cuadrado entre el centro de la configuración y cada landmark (Bookstein, 1990b). La forma se descomponen en el componente uniforme (cambio global) y el componente no-uniforme (deformación local) (Bookstein, 1990b; Dujardin & Slice, 2007).

4.6 Análisis estadísticos

4.6.1 Morfometría Tradicional

4.6.1.1 Análisis univariantes

Se calcularon la media (\bar{x}), la desviación estándar (SD), la varianza (σ^2) y los valores máximos y mínimos de las variables DC, DM, DO y LM, para determinar la tendencia que estas presentan. Se determinó la homogeneidad de variancias, mediante la prueba de Levene, y la normalidad de los datos, a través de la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Se comprobó que el coeficiente de variación (CV) sea menor al 10%, debido a que son datos de laboratorio.

La comparación entre especies (interespecífica) fue mediante el análisis de variancia de un factor (ANOVA-one way). Se realizó la prueba significativa Honesta de Tuckey (*post hoc*), que permite agrupar las especies en rangos homogéneos (Sánchez-Otero, 2014).

En las comparaciones intraespecíficas, los hábitats de *P. chinai* y *T. carrioni* se compararon mediante la prueba de t de Student para muestras independientes, al igual que las provincias de *R. ecuadoriensis* (variación geográfica). Los hábitats de *R. ecuadoriensis* se compararon

mediante un ANOVA-one way. Se consideró cinco grupos: intradomicilio Loja, peridomicilio Loja, silvestre Loja, peridomicilio Manabí y silvestre Manabí. Estos análisis se realizaron en el software SPSS Statistics v23.

4.6.1.2 Análisis multivariados

En ambos enfoques (“size-in” y “size-out”), las variables tradicionales (LM, DM, DO y DC) fueron analizadas mediante el análisis discriminante (DA). El DA identifica los caracteres que mejor discriminan los grupos (Zelditch *et al.*, 2004; Strauss, 2010; Sánchez-Otero, 2015). Se obtuvieron las distancias de Mahalanobis (D^2), distancias entre grupos dentro del espacio multivariante. La significación de estas distancias fue determinada por prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni (Dujardin & Slice, 2007; Strauss, 2010). Esto se realizó en el módulo PAD v98. Con las distancias de Mahalanobis obtenidas del análisis “size-out” se construyó un árbol Neighbor-joining (NJ) en el módulo COV v98. En el árbol se señalan los hábitats analizados de las cuatro especies; se consideró que los huevos *R. ecuadoriensis* pertenecen a dos provincias distintas.

Se calcularon la media (\bar{x}), la desviación estándar (SD), la varianza (σ^2) y los valores máximos y mínimos de la variable de tamaño (GS). Esta se analizó en el módulo VAR v98, donde la significación estadística se determinó mediante la prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

4.6.2 Morfometría Geométrica

4.6.2.1 Análisis de la conformación del contorno del huevo

Para el contorno de los huevos, las variables de forma NEF fueron examinadas por el análisis de componentes principales (PCA). Este describe la variación entre los individuos y permite la reducción de dimensiones de análisis (Zelditch *et al.*, 2004; Strauss, 2010). Los componentes más representativos del PCA, fueron sometidos al análisis discriminantes (DA) (Zelditch *et al.*, 2004; Strauss, 2010). Se obtuvo las distancias de Mahalanobis (D^2), cuya significación fue determinada por prueba no-paramétricas de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni (Dujardin & Slice, 2007; Strauss, 2010).

Las distancias se utilizaron para construir un árbol Neighbor-joining (NJ) igual que en los análisis “size-out”. Se realizó la clasificación revalidada. Esta se basa en extraer del análisis a un individuo (“individuo desconocido”) y estimar las distancias de Mahalanobis del resto (N-1), lo que permite predecir el grupo al que pertenece el individuo (Manly, 2004; Strauss, 2010). Este análisis evalúa el rendimiento del modelo.

4.6.2.2 Análisis de la conformación del opérculo

Las proyecciones de las coordenadas residuales fueron analizadas mediante los mismos estadísticos. En las comparaciones interespecíficas se utilizaron solo los opérculos de los huevos de la tribu Triatomini, debido a la diferencia de número de puntos de referencia entre los opérculos de ambas tribus. Estos análisis también se utilizaron para determinar la influencia del tiempo de desarrollo, posición y estado de viabilidad.

4.6.2.3 Análisis del tamaño

Se calcularon la media (\bar{x}), la desviación estándar (SD), la varianza (σ^2) y los valores máximos y mínimos de las variables *sqrA* y *CS*. La significación estadística se determinó mediante la prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni en el módulo VAR v98. Para los análisis del tiempo de desarrollo y estado de viabilidad se calcularon la media (\bar{x}), la desviación estándar (SD) y la significación de la variable *sqrA*.

4.6.2.4 Efecto alométrico

El efecto alométrico es la contribución del tamaño a la primera función discriminante (CV1) (Dujardin & Slice, 2007; Dujardin *et al.*, 2014). Esto se realizó mediante la prueba de regresión en el módulo COV v98, donde el tamaño fue la variable independiente y la forma la dependiente (Dujardin & Slice, 2007; Dujardin *et al.*, 2014). La significación de este porcentaje se determina mediante la prueba de t de Student para muestras independientes. Se detallan en la Figura 13 los estadísticos realizados para cada técnica y en la Tabla 3 las comparaciones interespecíficas e intraespecíficas.

5 RESULTADOS

5.1 Estudios Interespecíficos (entre especies)

5.1.1 Descripción de especies

5.1.1.1 El huevo de *Panstrongylus chinai*

Se examinaron 167 huevos. Estos fueron puestos individualmente en la base del frasco (Figura 4A). Los huevos son de forma ovoide, presentan hendidura lateral, que se formó a partir del día 10 de desarrollo, y carecen de cuello, collar y ornamentaciones en el opérculo (Figuras 14A-B). Durante su desarrollo, los huevos cambian de coloración. Los huevos recién puestos son de color blanco-crema y cambian paulatinamente a café-rojizo. Las manchas oculares migraron de la parte caudal del huevo a la parte anterior (zona opercular). Durante este movimiento, las manchas cambiaron de rojo a oscuras con bordes rojizos. El opérculo cambió de coloración de manera similar al resto del huevo; pero conservó el borde opercular blanco-crema (Figura 14A-B). El tiempo de desarrollo fue de 29.23 ± 1.52 días. El porcentaje de individuos que completaron exitosamente su desarrollo fue del 76% (Tabla 4). Luego de la eclosión, se observó que el corion es translucido (falta de color) y flexible.

El corion presenta borde corial estrecho y definido (Figura 14C). En el borde se encontraron numerosos aerópilos en hilera (Figura 14D). Junto al borde, hacia la parte caudal del huevo, se encontraron los micrópilos. No se observó una distintiva zona de gotera espermática (Figura 14E). Los micrópilos son grandes y se hallaron en menor cantidad que los aerópilos. El exocorion es liso, es decir no presentó granulaciones (Figura 14C). La arquitectura

exocorial estaba constituido por células hexagonales y pentagonales irregulares con límites marcados (Figura 14F). El opérculo es convexo y presenta células hexagonales; estas tienden a redondearse en la parte central hasta ser imperceptibles (Figura 14G).

5.1.1.2 El huevo de *Panstrongylus howardi*

Se examinaron 75 huevos. Estos fueron puestos individualmente en la base del frasco. Los huevos son de forma ovoide-globosa, presentan hendidura lateral, que se forma a partir del día 7 de desarrollo, y carecen de cuello, collar y ornamentaciones en el opérculo (Figura 15A-C). Durante su desarrollo, los huevos cambian de color blanco-crema a café claro. Las manchas oculares presentaron mayor cambio de coloración, de rojo a negro con bordes rojizos. El opérculo conservó la coloración blanquizca en el borde y cambió de blanco-crema a café (Figura 15A-B). El tiempo de desarrollo fue de 29 ± 1.30 días. El porcentaje de individuos que nació fue del 34% (Tabla 4). Estos huevos fueron los más sensibles. Durante la manipulación, en varios individuos se levantó el opérculo, después de lo que el individuo no completó su desarrollo y no eclosionó (individuos no-viables). Luego de la eclosión, se observó que el corion es translúcido y rígido.

El corion presenta borde corial estrecho (Figura 15D-E). En este se encontraron varios aerópilos, pero no se observó la gotera espermática ni los micrópilos en sus cercanías (Figura 15F). El exocorion es liso y se compone de células hexagonales irregulares. Estas células fueron difíciles de observar en todo el huevo, ya que sus límites eran muy tenues (poco marcados) (Figura 15G). El opérculo es convexo, presenta borde opercular sumamente estrecho (casi imperceptible) y células hexagonales con límites tenues. Las células conforme

se acercan al borde opercular tienden a presentar forma poligonal menos redondeada (Figura 15H).

5.1.1.3 El huevo de *Triatoma carrioni*

Se examinaron 76 huevos. Estos fueron encontrados individualmente en la base del frasco donde estaban las hembras obtenidas en el campo. Los huevos son alargados, tienen forma elipsoidal, presentan hendidura lateral y carecen de cuello, collar y ornamentaciones en el opérculo (Figuras 16A-B). Durante el desarrollo, estos huevos cambiaron de blanco a rojo-intenso; mientras que las manchas oculares de rojo a negro-rojizo (Figura 7). El opérculo cambió de coloración de manera más intensa que el resto del huevo; este conservó el borde opercular blanco (Figuras 16A-B). Se logró conocer el día exacto de puesta solo de 7 individuos; el tiempo de desarrollo de estos fue de 25 ± 0.79 días. El porcentaje de individuos que completaron exitosamente su desarrollo fue del 79% (Tabla 4). Luego de la eclosión, se observó que el corion es translúcido y flexible.

El corion presenta un borde corial bien definido y estrecho (Figura 16C). En el borde se encontraron numerosos aerópilos. Hacia la parte caudal del corion y cerca de los aerópilos se localizaron los micrópilos (Figura 16 D-E). Estos son imperceptibles y más pequeños que los aerópilos (Figuras 16E). El exocorion es liso y está compuesto por células hexagonales irregulares con límites claramente marcados (Figura 16F). El opérculo es convexo, tiene el borde estrecho y células de cuatro y cinco lados con límites gruesos, las que se redondean hacia el centro (Figura 16G).

5.1.1.4 El huevo de *Rhodnius ecuadoriensis*

Se examinaron 135 huevos pertenecientes a las provincias de Loja y Manabí. Los huevos son puestos grupal o individualmente, pegados a las paredes del frasco, tela tul o papel filtro (Figura 4B). Estos tienen forma elipsoidal, presentan hendidura lateral y cuello, carecen de collar (Figura 17A-B). La hendidura lateral se formó a partir del sexto día de desarrollo. La zona opercular o cap mantiene una leve inclinación con respecto a la hendidura lateral, la cual es contraria al plano del sustrato (Figuras 4B, 17A-C). Durante el desarrollo, estos huevos cambiaron de coloración. Los huevos recién puestos eran de color blanco-crema con el borde corial, opérculo y líneas longitudinales cafés. Los huevos antes de la eclosión tenían coloración café-rojiza brillante; se mantuvo la coloración inicial del borde corial. Los huevos de Manabí eran más oscuros que los huevos de Loja. El opérculo se oscureció manteniendo su borde claro (Figura 17A-B).

El tiempo de eclosión fue de 17 ± 1.46 días, sin considerar la provincia de origen de los individuos parentales. La diferencia entre provincias fue de aproximadamente un día, siendo los huevos de Manabí los que más tardaron. El desarrollo de los huevos de esta especie fue rápido; algunos individuos tardaron solo 12-15 días en desarrollarse. El porcentaje de individuos que completaron exitosamente su desarrollo fue del 85% (Tabla 4). Luego de la eclosión, se observó que el corion es flexible, brillante y colorido. La coloración de este dificultó observar el movimiento de las manchas oculares del embrión.

El corion presenta borde corial grueso con células hexagonales; en este género esta estructura se conoce como anillo corial (Figuras 17D-F). En la parte apical del borde se observó una hilera de aerópilos (Figura 17F). Bajo esta hilera se encuentra la gotera

espermática, donde se localizaron los micrópilos, que son más grandes que los aerópilos (Figuras 17F). El exocorion no es liso, está formado por células hexagonales y pentagonales con forma de embudo. Estas células presentan límites claramente marcados y en el centro de cada célula un tubo folicular (Figura 17G). El opérculo es plano, granuloso (puntos) y presenta borde opercular muy estrecho. El exocorion del opérculo tiene células hexagonales con límites tenues e imperceptibles, las que desaparecen en el centro (Figura 17H).

5.1.2 Descripción comparativa de los huevos

Los huevos de las especies de la tribu Triatomini son puestos libres en el sustrato, a diferencia de los huevos de *R. ecuadoriensis* que son pegados. La forma de los huevos varía de ovoide a elipsoidal. La presencia de cuello en los huevos de *R. ecuadoriensis* es la macroestructura que diferencia ambas tribus. A través del corión, se observó el cambio de coloración del embrión, lo que se dificultó en *R. ecuadoriensis* debido a la coloración propia del corion de esta especie.

El tiempo de eclosión varió de 29.23 ± 1.521 días a 17 ± 1.457 días, siendo *P. chinai* la que más tardó en desarrollarse y *R. ecuadoriensis* la que se desarrolló más rápido. El porcentaje de nacimientos varió de 85% a 34%, siendo los embriones de *R. ecuadoriensis* los que tuvieron mayor éxito de nacimiento y los de *P. howardi* los de menor éxito. Se observó diferencia en el porcentaje de nacimiento entre las provincias donde fueron colectados los huevos de *R. ecuadoriensis* (96% y 76%), siendo los huevos de Loja los más exitosos en nacer.

Las características exocoriales son similares entre los huevos de la tribu Triatomini, siendo los límites marcados entre las células poligonales la característica principal de diferencia. *P. chinai* y *T. carrioni* tienen líneas marcadas, mientras que *P. howardi* tienen células con límites tenues. El exocorion de *R. ecuadoriensis* fue el más peculiar. Este presentó células hexagonales con líneas marcadas y con un tubo folicular en el centro; mientras que su opérculo fue granuloso.

5.1.3 Influencia del tiempo de desarrollo, posición y viabilidad en la forma de los huevos

Para determinar la influencia del tiempo de desarrollo en la variación de forma se dividió a los días en estadios iniciales y finales. Los estadios iniciales de *P. chinai* fueron considerados desde el día de puesta hasta el día 15 de su desarrollo. En este día las manchas oculares se tornan rojo-oscuros y se encuentran en la parte anterior del huevo. Los estadios finales se consideraron desde el día 16 al día anterior al nacimiento, donde la coloración solo se hizo más intensa. En *R. ecuadoriensis*, se utilizó el mismo criterio de separación de estadios, pero los estadios iniciales fueron hasta el día 10. Este análisis demostró que la forma del huevo cambia significativamente entre los estadios iniciales y finales de desarrollo ($P < 0.05$). La forma de los estadios finales es más angosta para ambas especies (Figura 18). Respecto al tamaño, este varió significativamente entre los estadios de *R. ecuadoriensis*, se observa reducción del tamaño de los estadios iniciales (1.067 ± 0.051 mm) a los estadios finales (1.017 ± 0.053 mm) ($P < 0.01$). Esta tendencia se mantiene en *P. chinai* (de 1.417 ± 0.040 mm a 1.397 ± 0.047 mm), pero no es significativa.

La influencia de la posición se determinó en los huevos de *P. chinai*. Este análisis demostró que no existen diferencias en la forma cuando el huevo es colocado en posición ventral convexa o dorsal cóncava ($P > 0.05$). La influencia del estado de viabilidad se determinó en los huevos de *P. chinai*. Este análisis determinó que existen diferencias significativas en la forma y tamaño (sqrA) de los dos tipos de huevos ($P < 0.05$) (Figura 19A-B), siendo los huevos viables los más angostos y pequeños. Los huevos no-viables presentan mayor diversidad de tamaños ($P > 0.01$) (Figura 19B).

5.1.4 Morfometría Tradicional del huevo

5.1.4.1 Análisis Univariante

Las variables de tamaño analizadas se observan en la Figura 20 y Tabla 5. Los huevos de *P. chinai* fueron los más grandes entre las especies analizadas respecto a las variables LM (1.899 ± 0.077 mm) y DM (1.227 ± 0.049 mm). Los huevos de *P. howardi* fueron los más grandes respecto al DO (0.661 ± 0.034 mm). Dentro de la tribu Triatomini, los huevos de *P. howardi* presentaron la menor LM (1.781 ± 0.079 mm) y los de *T. carrioni* el menor DM (1.045 ± 0.045 mm). Entre las cuatro especies, los huevos de *R. ecuadoriensis* fueron los más pequeños respecto al DM (0.748 ± 0.039 mm) y DO (0.537 ± 0.034 mm) (Figura 20A-C; Tabla 5).

Las tres variables presentan diferencias significativas entre las especies ($P < 0.01$), lo que se determinó mediante el ANOVA. Se observó que el DO permite discriminar las cuatro especies, el DM los tres géneros (*Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*) y la LM solo las dos

especies del mismo género (*Panstrongylus*) (Tabla 6). La variable con mayor información discriminante fue DO.

5.1.4.2 Análisis Multivariado

En la identificación interespecífica mediante análisis multivariados de MT se realizó los análisis discriminantes “size-in” y “size-out”. Estos permitieron discriminar las cuatro especies, como se muestra en la Figura 21. En ambos, el primer eje (CV1) discrimina entre géneros y el segundo eje (CV2) entre especies del mismo género (*Panstrongylus*). Se observa que el género *Rhodnius* se aísla completamente, lo que se debe a las relaciones entre las tribus analizadas. Mientras que, el solapamiento entre las tres especies de la tribu Triatomini, se relaciona con la corta distancia que existe entre sus centroides (Tabla 7). El solapamiento es mayor en el análisis “size-out”. Por ende, la identificación de los huevos de las cuatro especies es mayor al incluir la variación de tamaño (“size-in”) (Figura 21A), que al solo analizar la forma (“size-out”) (Figura 21B).

El GS, variable de tamaño del análisis “size-out”, demostró diferencias significativas entre los huevos de los tres géneros ($P < 0.01$) (*Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius*). Se observa que los huevos de *R. ecuadoriensis* son los más pequeños y los de *Panstrongylus* los más grandes (Figura 20D). El GS presenta la misma tendencia que el DM.

5.1.5 Morfometría Geométrica del contorno y del opérculo del huevo

5.1.5.1 Comparación del tamaño del huevo (sqrA) y opérculo (CS)

Se encontraron diferencias altamente significativas en el tamaño (sqrA) del huevo de las cuatro especies ($P < 0.01$) (Tabla 6). Los huevos de *P. chinai* son los más grandes y los de *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis* los más pequeños. La mayor varianza (σ^2) se encontró en los huevos de *T. carrioni* (0.002 mm), aunque esta medida no fue significativamente diferente a las de las otras especies ($P > 0.05$) (Figura 20E; Tabla 5). En cuanto al opérculo, existen diferencias altamente significativas en el tamaño (CS) entre las especies de la tribu Triatomini ($P < 0.01$). El opérculo de *P. howardi* es el más grande y de *T. carrioni* es el más pequeño (Figura 20F; Tabla 5). La significación se determinó mediante la prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

5.1.5.2 Comparación de la conformación del huevo y del opérculo

El análisis de conformación demostró diferencias en la forma del contorno de los huevos de las cuatro especies, inclusive entre especies cercanamente relacionadas del género *Panstrongylus*. Dentro de la tribu Triatomini (huevos sin cuello), *P. howardi* presentó los huevos más amplios y *T. carrioni* los más angostos. Los huevos de *R. ecuadoriensis* se identificaron por la presencia de cuello y la forma angosta del huevo (Figura 22A).

El análisis de conformación del opérculo demuestra diferencias entre las tres especies de la tribu Triatomini. Estas diferencias se centran en la unión borde corial-borde opercular

(Figura 22B). Sorpresivamente, se observa que la forma del opérculo de *P. howardi* es más parecido al de *T. carrioni* que al de *P. chinai*.

En la identificación interespecífica mediante la conformación del contorno de los huevos, el análisis discriminante (DA) ilustró la significación de las distancias de Mahalanobis ($P < 0.01$) (Tabla 8). La función discriminante 1 (CV1) explica el 94% de la variación total y diferencia principalmente las tribus. La función discriminante 2 (CV2) representa el 5% y diferencia las especies de la tribu Triatomini. Se observa solapamiento entre las especies de la tribu Triatomini (Figura 23A), al igual que en el análisis de la Figura 21B. La significación estadística se determinó mediante la prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

Al retirar el efecto de la diferencia entre las tribus, es decir el efecto de los huevos de *R. ecuadoriensis*, se observa completa discriminación de las tres especies de la tribu Triatomini, incluyendo a las del género *Panstrongylus* (Figura 23B). Esto demuestra que en la Figura 23A, la diferencia de la conformación de los huevos entre tribus enmascara la verdadera diferencia entre la conformación de los huevos de la tribu Triatomini.

En la identificación interespecífica de la tribu Triatomini mediante la conformación del opérculo, el análisis discriminante (DA) ilustró la significación de las distancias de Mahalanobis ($P < 0.01$) (Tabla 8). El CV1 diferencia entre géneros y el CV2 entre especies del mismo género; estos explican el 60% y 40% de la variación total respectivamente (Figura 23C). Se observa gran solapamiento entre las tres especies, a diferencia de lo obtenido en el análisis del contorno. El solapamiento se relaciona con la diversidad de formas que existe dentro de cada grupo.

La Figura 24 muestra dos árboles fenéticos de la conformación del huevo de las cuatro especies, incluye los hábitats en que fueron recolectados los individuos parentales. La morfología de estos dos árboles se diferencia principalmente por el largo de las ramas y la definición de los nodos, especialmente el de *T. carrioni*. El árbol del análisis tradicional “size-out” no estructura un solo nodo para los hábitats de *T. carrioni* (Figura 24A). El árbol construido con las distancias de los contornos de los huevos (MG) presenta ramas más largas y nodos mejor definidos (Figura 24B).

La reclasificación validada de la conformación del contorno de los huevos permitió clasificar correctamente el 92% de los huevos *P. chinai*, 93% de *P. howardi*, el 97% de *T. carrioni* y el 100% de *R. ecuadoriensis*. La conformación del opérculo permitió clasificar correctamente al 62% de los huevos de *P. chinai*, 68% de *P. howardi* y 72% de *T. carrioni*, siendo el porcentaje (%) esperado al azar aproximadamente 33. La conformación de los huevos presentó mejores resultados en la reclasificación validada, es decir la conformación del contorno de los huevos permite reconocer correctamente más huevos que la conformación del opérculo.

Para determinar el efecto del tamaño en las discriminaciones obtenidas se analizó el efecto alométrico. Se observó que la variación de tamaño contribuyó en un 69% y 6% a la diferenciación (primera función discriminante) de la conformación del contorno del huevo y del opérculo, respectivamente. Estos valores son significativo ($P < 0.05$), lo que se determinó mediante la prueba de t de Student.

5.2 Estudios Intraespecífico

5.2.1 *Panstrongylus chinai*

5.2.1.1 Comparación del tamaño del huevo entre hábitats

En la Figura 25 y Tabla 9, se muestra el análisis del tamaño de los huevos según el hábitat donde fueron colectados los parentales. Se demuestra que no existen diferencias significativas en cuanto al tamaño del huevo ($P > 0.05$), tanto para los análisis de morfometría tradicional (LM, DM, DC y GS) como para los análisis de morfometría geométrica (sqrA y CS). La significación de las variables LM, DM y DC se determinó mediante la prueba de t de Student.

5.2.1.2 Comparación de la conformación del huevo entre hábitats

El análisis de conformación muestra diferencias entre el contorno de los huevos de los distintos ambientes, siendo los huevos de peridomicilio un poco más angostos (Figura 26A). El contorno de los opérculos muestra mayor diferencia en la forma. Esta diferencia se centra en el borde opercular, siendo el borde del opérculo de los huevos de peridomicilio menos convexos (planos) (Figura 26B).

El análisis discriminante “size-out” ilustró que no existen diferencias significativas entre los huevos ($P > 0.05$). Se observa solapamiento entre los dos grupos (Figura 27A). El análisis discriminante de la conformación del contorno de los huevos ilustró las diferencias significativas en la forma del huevo entre hábitats ($P < 0.05$). Se observa solapamiento entre

los grupos con tendencia a discriminarse (Figura 27B). El análisis discriminante del opérculo generó los mismos resultados que el análisis “size-out”, pero este presenta mayor solapamiento. De un total de 58 individuos, 53 individuos no fueron clasificados correctamente (Figura 27C).

La reclasificación validada de la conformación del contorno de los huevos permitió clasificar correctamente el 75% y 61% de los huevos del hábitat doméstico y peridoméstico, respectivamente. La conformación del opérculo permitió clasificar correctamente al 53% de los huevos de ambos hábitats, porcentaje (%) cercano al esperado al azar (50%). Los análisis discriminantes y la reclasificación demuestran que el contorno permite identificar de mejor forma los huevos de los dos hábitats.

La variación de tamaño contribuyó en 3% y 36% a la diferenciación de la conformación del contorno del huevo y del opérculo, respectivamente. El efecto del tamaño en las discriminaciones obtenidas es mayor y estadísticamente significativo en el opérculo ($P < 0.05$).

5.2.2 *Triatoma carrioni*

5.2.2.1 Comparación del tamaño del huevo entre hábitats

El análisis del tamaño de los huevos según el hábitat donde fueron colectados los parentales demuestra diferencias significativas en las variables del opérculo (DO y CS) ($P < 0.01$). Los opérculo de los huevos de peridomicilio son más grandes (Figura 28A-B). Las variables LM, DM, GS, sqrA y CS no muestran diferencias significativas ($P > 0.05$) (Figura 28C-F; Tabla

10). Respecto a GS y *sqrA*, el tamaño de los huevos de intradomicilio es significativamente más heterogéneos que los de peridomicilio ($P < 0.01$) (Tabla 10). La tendencia de las varianzas también se mantiene en LM, DO y CS, a pesar de ser no significativa la diferencia. Esto demuestra que los huevos de intradomicilio varían más en tamaño y presenta los opérculos más pequeños.

5.2.2.2 Comparación de la conformación del huevo entre hábitats

El análisis de conformación no muestra diferencias entre el contorno de los huevos de los distintos hábitats (Figura 29A). Se observan diferencias en la forma del opérculo, siendo el grado de curvatura del borde opercular la principal diferencia entre estos dos ambientes (domiciliar y peridomiciliar). El opérculo de los huevos del domicilio tiende a tener el borde opercular casi plano (Figura 29B).

El análisis discriminante “size-out” ilustró que existen diferencias significativas entre los huevos, aunque se observa solapamiento entre los dos grupos ($P < 0.05$) (Figura 30A). El análisis discriminante de la conformación del contorno de los huevos no ilustró diferencias significativas en la forma del huevo entre hábitats ($P > 0.05$) (Figura 30B). El análisis discriminante del opérculo generó los mismos resultados que el análisis “size-out”, pero el solapamiento fue menor (Figura 30C). En el análisis “size-out” y del opérculo, solo 12 individuos de 41 no fueron clasificados correctamente.

La reclasificación validada de la conformación del contorno de los huevos permitió clasificar correctamente el 70% y 47% de los huevos del hábitat doméstico y peridoméstico, respectivamente. La conformación del opérculo permitió clasificar correctamente el 70% y

64% de los huevos. Los valores de reclasificación del peridomicilio son mayores con la conformación del opérculo.

La variación de tamaño contribuyó en 20% a la diferenciación de la conformación del opérculo, lo que resultó ser significativo ($P < 0.05$). El contorno no presentó efecto alométrico, lo que se relaciona con la significación de la variable $sqrA$.

5.2.3 *Rhodnius ecuadoriensis*

5.2.3.1 Comparación geográfica y entre hábitats del tamaño del huevo

Se observó variación de tamaño del huevo según la provincia donde fueron colectados los parentales (variación geográfica), siendo los huevos de Manabí los más grandes (Figura 31A-F; Tabla 11). Las variables de tamaño (LM, DM, DO, DC, GS, $sqrA$, SC) demuestran diferencias altamente significativas entre provincias ($P < 0.01$) (Tabla 12). Las variables de tamaño del opérculo (CS y DO), DC y GS mostraron las mayores diferencias entre grupos (Figura 31C, D y G; Tabla 11).

La variación del tamaño según el hábitat en la provincia de Loja demostró que las variables de tamaño permiten la diferenciación de los hábitats de manera distinta (Tabla 12). La LM diferencia significativamente intradomicilio-silvestre del peridomicilio ($P < 0.05$); los huevos de peridomicilio son los más grandes (Figura 32A). El DM diferencia los hábitats domiciliar-peridomiciliar del silvestre ($P < 0.01$); los huevos de silvestre son los más pequeños (Figura 32B). El DO diferencia intradomicilio de peridomicilio-silvestre ($P < 0.05$); los huevos de silvestre son los más pequeños (Figura 32C). El GS diferencia silvestre

de intradomicilio-peridomicilio ($P < 0.01$); los huevos de silvestre son los más pequeños (Figura 33A). La *sqrA* solo diferencia silvestre de peridomicilio ($P < 0.01$); los huevos de silvestre son los más pequeños (Figura 33B). El CS diferencia los huevos de la misma forma que DO (Figura 33C). La varianza de todas las variables fue menor en los huevos de silvestre y mayor en los huevos de peridomicilio (Tabla 11).

Esto demostró que los huevos de silvestre son los más pequeños y presentan valores de tamaño más homogéneos. Los huevos de peridomicilio son los más grandes y con valores de tamaño más heterogéneos. Los huevos de intradomicilio presentan el opérculo más grande. Sin embargo, en todas las medidas los valores máximos y mínimos de los grupos se solaparon.

La variación del tamaño según el hábitat en la provincia de Manabí demostró que los huevos de ambos hábitats difieren significativamente ($P < 0.05$). Los huevos del ambiente silvestre son los más grandes (Figura 32 y 33; Tabla 11). La variable DC solo arrojó información en la diferenciación de provincia. Esto significa que esta variable no demostró diferencias significativas entre hábitats dentro de cada provincia ($P > 0.05$) (Tabla 12).

La variación del tamaño entre hábitats de ambas provincias (sin considerar la variación geográfica) demostró que los huevos del ambiente silvestre Manabí son significativamente más grandes ($P < 0.01$) (Tabla 12). Es decir, los huevos del ambiente silvestres de estas dos provincias presentan tamaños completamente opuestos, cuyos valores máximos y mínimos del tamaño del opérculo (DO y CS) no se solaparon (Figuras 32C y 33C). Los huevos del ambiente peridomiciliar solo se diferencian significativamente en el tamaño del opérculo

(DO y CS) y GS ($P < 0.01$) (Tabla 12). Los opérculos del peridomicilio Manabí son más grandes.

5.2.3.2 Comparación geográfica y entre hábitats de la conformación del huevo

El análisis de la conformación de los huevos según la provincia demostró diferencias en los huevos de las dos provincias. Las diferencias se centran en el cuello, en la zona opercular y en la inclinación del opérculo respecto a la hendidura lateral. Los huevos de Loja presentan cuello más angosto y menor inclinación del opérculo (Figura 34A). La conformación del opérculo muestra diferencias en los extremos del borde opercular (Figura 34B).

La discriminación de los huevos de estas dos zonas geográficas es significativa para la conformación del huevo y del opérculo ($P < 0.01$) (Tabla 13). Se observa mayor solapamiento en el análisis “size-out” y en el análisis del opérculo (Figura 35A-C). En el análisis del contorno del huevo solo 16 individuos no pudieron ser discriminados (Figura 35B).

La reclasificación validada de la conformación del contorno de los huevos permitió clasificar correctamente el 96% de los huevos de Loja y el 80% de los huevos de Manabí. La conformación del opérculo permitió clasificar correctamente el 83% y 78% de los huevos, respectivamente. La posibilidad de clasificar correctamente los huevos es alta en ambas estructuras, pero mayor al utilizar la conformación del contorno. La variación de tamaño contribuyó en 1% a la diferenciación de la conformación del contorno, lo que resultó ser no significativo ($P > 0.05$). El opérculo no presentó efecto alométrico.

El análisis de la conformación de los huevos en la provincia de Loja demostró diferencias entre los tres hábitats ($P < 0.01$). Estas diferencias se centran en el cuello, en la inclinación del opérculo respecto a la hendidura lateral y en el grado de concavidad de la hendidura lateral. Los huevos del intradomicilio presentan cuello amplio, opérculo inclinado y hendidura lateral poco convexa. Los huevos del peridomicilio tienen cuello más estrecho, opérculo no inclinado y hendidura lateral plana. Los huevos del hábitat silvestre son similares a los de intradomicilio pero con hendidura más cóncava (Figura 36A). La conformación del opérculo presentó diferencias no muy marcadas en los extremos del borde opercular (Figura 36B).

Los huevos de Manabí se caracterizan por tener opérculo inclinado y la hendidura lateral plana, similar a los huevos del peridomicilio Loja. Las diferencias en la conformación entre hábitats son significativas y se centran en el cuello y en el grado de grosor del huevo ($P < 0.01$). Los huevos del hábitat silvestre son angostos y tienen cuello estrecho (Figura 37A). Las diferencias de la conformación del opérculo son tenues y se basan en los extremos del borde opercular (Figura 37B).

El análisis discriminante ilustró diferencias altamente significativas en la conformación del huevo ($P < 0.01$) (Tabla 13). En los análisis “size-out”, del contorno y del opérculo, el CV1 discrimina las provincias. En análisis discriminante “size-out”, el CV2 discrimina los hábitats intradomiciliar Loja y peridomiciliar Manabí de los hábitats silvestres Loja-Manabí y peridomiciliar Loja (Figura 38A). En el análisis discriminante de la conformación del contorno, el CV2 discrimina los hábitats intradomiciliar Loja, peridomiciliar Loja y silvestre Manabí de los hábitats silvestre Loja y peridomiciliar Manabí (Figura 38B). En el análisis

de la conformación del opérculo, el CV2 discrimina los hábitats intradomiciliar de Loja y peridomiciliar de Manabí de los ambientes peridomiciliar de Loja y silvestre de Loja-Manabí (Figura 38C).

Se observa solapamiento en los tres análisis discriminantes, siendo el análisis de la conformación del opérculo el que mejor discrimina a los huevos de los cinco hábitats. Se observa que las distancias de Mahalanobis de la conformación del huevo son aproximadamente el doble que las distancias del análisis “size-out” y mayores a las del análisis de la conformación del opérculo (Tabla 13). Esto se relaciona con el mayor solapamiento en estos análisis y con el largo de las ramas del árbol de la Figura 24A.

La reclasificación validada permitió clasificar correctamente el 63% de los huevos de intradomicilio Loja, 70% de peridomicilio Loja, 83% silvestre Loja, 56% peridomicilio Manabí y 81% silvestre Manabí. Los valores de reclasificación del opérculo son menores (entre 23 y 61%). Esto demuestra que el contorno de los huevos presenta más información para reconocer a los huevos de cada hábitat.

La variación de tamaño contribuyó en un 9% y 39% a la diferenciación de la conformación del contorno del huevo y del opérculo, respectivamente. Estos resultados son significativa para el opérculo ($P < 0.01$). Esto indica que la discriminación del opérculo presenta mayor influencia del tamaño.

6 DISCUSIÓN

La tripanosomiasis Americana es la enfermedad parasitaria más importante de Latinoamérica (OMS, 2002). La reducción significativa en los índices de infestación por triatomíneos en el ambiente doméstico genera una rápida reducción de la frecuencia de casos agudos de la ECh (Dias *et al.*, 2002). El primer paso para planificar una estrategia eficaz de control y prevención de la ECh es el reconocimiento de las especies sinantrópicas y silvestres (Guhl *et al.*, 2009; Coura, 2013). La identificación y sistemática de los triatomíneos se ha basado fundamentalmente en observaciones morfológicas de los adultos y ninfas (Schofield & Galvão, 2009). Sin embargo, en ambientes domiciliarios es frecuente encontrar huevos o las cáscaras de los huevos (corion) de varias especies (Grijalva *et al.*, 2005; Black *et al.*, 2009; Evangelista-Martínez *et al.*, 2010). Por lo que, identificar las características que permitan reconocer los huevos de cuatro especies de importancia epidemiológica para el Ecuador (*P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis*) es el objetivo principal de este estudio.

6.1 Estudios Interespecíficos

6.1.1 Descripción comparativa

La familia Reduviidae está compuesta por insectos adaptados a desarrollarse en una gran variedad de hábitats, siendo una generalidad del grupo la posibilidad de encontrar los huevos en el mismo lugar que el individuo adulto (Readio, 1926). Los huevos son colocados en lugares que les ofrezcan protección contra los depredadores o contra la desecación (Readio, 1926). En triatomíneos, el sitio de oviposición depende de la especie, de sus adaptaciones y

principalmente del hospedero al que estén asociados (Lent & Wygodzinsky, 1979; Hinton, 1981; OMS, 2002).

Durante este trabajo se observó que las especies de *Panstrongylus* y *Triatoma* colocan sus huevos libremente en la base del frasco. Esto revela sus adaptaciones a hábitats terrestres o subterrestres, raramente arbóreos, asociados a mamíferos (Lent & Wygodzinsky, 1979; Patterson *et al.*, 2009; Galvão & Justi, 2015). En la naturaleza (hábitat silvestre), se ha reportado *P. howardi* asociado a mamíferos, como en nidos de ratas (Suarez-Davalos *et al.*, 2010). Mientras que, el hábitat silvestre de *P. chinai* y *T. carrioni* es desconocido (Abad-Franch *et al.*, 2001).

Rhodnius ecuadoriensis pone sus huevos en grupos adheridos al sustrato, adaptación del género a colonizar nidos de aves (Lent & Wygodzinsky, 1979; Abad-Franch *et al.*, 2002). Esta adaptación ayuda a las especies del género *Rhodnius* a pegar sus huevos para que no se caigan al suelo, debido a que sus hospederos tienden a ser arbóreos (Lent & Wygodzinsky, 1979; Galvão & Justi, 2015). Además, la adaptación ayuda al transporte pasivo de los huevos, ya que son pegados a las plumas de las aves (Lent & Wygodzinsky, 1979; Abad-Franch *et al.*, 2009). *R. ecuadoriensis* se reporta asociación con la palma *P. aequatorialis* (palma de tagua o cade) y, en lugares donde no existe esta planta, asociación a nidos de aves y ardillas (Abad-Franch *et al.*, 2001; Grijalva & Villacís, 2009; Grijalva *et al.*, 2011).

La adhesión de los huevos al sustrato se debe a que las hembras tienen glándulas accesorias, las cuales produce una secreción que pega a los huevos y estimulan las contracciones de los oviductos (Hinton, 1981; Lounibos *et al.*, 1999). El mecanismo de adhesión está en la mayoría de especies de la tribu Rhodniini y se considera como una ventaja evolutiva

(Schofield, 1994). Estas especies colocan los huevos en grupos, lo que facilita parasitar más de un individuo (Feliciangeli *et al*, 1978; Polanco *et al*, 2005). Pero, al adherirlos entre ellos se provee protección debido a que los huevos del centro no puede ser parasitado (Feliciangeli *et al*, 1978; Polanco *et al*, 2005).

Como se pudo observar, los huevos son operculados, no presentan extensiones coriales y varían en forma, características de los huevos de la subfamilia Triatominae (Readio, 1926; Schofield, 1994). La única característica macroscópica que permitió discriminar levemente las cuatro especies de estudio fue la presencia de cuello en los huevos de *R. ecuadoriensis*, característica conservada en las especies de esa tribu (Lent & Wygodzinsky, 1979).

Los huevos cambian de color durante el desarrollo, de blanco a rojo/café. Esto se relaciona con el embrión y en pocos casos con el color propio del corion, como se observó en *R. ecuadoriensis* (Hinton, 1981). El color propio del corion se debe a la capa ámbar del endocorion; esta tiene aceite que le hace impermeable a sustancias ácidas y alcalinas, pero permeable a sustancias aceitosas, iones y agua (Beament, 1946, 1947).

La coloración del corion y del embrión es una técnica de protección de los huevos contra los depredadores o parásitos, ya que les permite camuflarse con el ambiente que les rodea o emitir señales de advertencia debido a su coloración rojiza (Hinton, 1981). El cambio de coloración de los huevos ha sido usado para el reconocimiento de especies (Pinto, 1924; Obara *et al.*, 2007a), pero es su subjetiva debido a que puede cambiar entre poblaciones (*R. ecuadoriensis*) y ser muy parecida entre especies cercanas (*P. chinai* y *P. howardi*).

El tiempo de desarrollo (Te) del huevo varió según la especie y se relaciona con el tamaño del individuo. Las especies con huevos más grandes necesitan mayor cantidad de días para completar su desarrollo, pero presentaron menor porcentaje de nacimiento. Los huevos de *R. ecuadoriensis* fueron los más pequeños, los que menos tardan en eclosionar (17 ± 1.457 días) y los más exitosos (85%). Los huevos de *P. howardi* fueron grande, tardaron más tiempo en eclosionar (29 ± 1.296 días) y fueron los menos exitosos (34%). Por consiguiente, el tiempo de desarrollo se relaciona de manera positiva y negativa con la tasa de supervivencia del individuo (Rabinovich *et al.*, 2006). Cuanto mayor es el tiempo mayor es la posibilidad de muerte, depredación o parasitismo; pero, mayor será el tamaño del nuevo individuo y su oportunidad de supervivencia y/o capacidad reproductiva (Rabinovich *et al.*, 2006).

La eclosión está controlada por el reloj circadiano endógeno, se produce en la madrugada o final de la noche y es extremadamente afectada por la humedad relativa del ambiente (Constantinou, 1984; Schilman *et al.*, 2009). Por ello, los cambio de las condiciones ambientales dentro y fuera de la incubadora son la posible causa de la susceptibilidad de los huevos de *P. howardi* a la manipulación. Otra posible razón de la susceptibilidad es la temperatura de desarrollo, la cual quizá no fue la óptima para esta especie.

Las características exocoriales de las especies de la tribu Triatomini fueron sumamente similares. La diferencia entre la arquitectura exocorial de estas especies se centró en las células poligonales del opérculo y del huevo, principalmente en las líneas límites y número de lados que las componen. Los huevos del género *Panstrongylus* se caracterizan por tener células hexagonales con líneas límites evidentes (*P. chinai*) a tenues (*P. howardi*) en el corion y células claras en el opérculo (ambas especies) (Lent & Wygodzinsky, 1979; Barata,

1998). La rugosidad de las células puede cambiar entre poblaciones, como se observó en *T. protracta* (Ryckman, 1962). Debido a ello, esta característica no se puede utilizar para aseverar que *P. chinai* y *P. howardi* son especies distintas.

En el género *Triatoma* es difícil el reconocimiento de especies mediante características exocoriales, debido a la diversidad de especies y a la ausencia de un patrón homogéneo del exocorion (Evangelista-Martínez *et al.*, 2010; Justi *et al.*, 2014). Los huevos del género se clasifican en: (i) huevos de forma elipsoide, simétricos, sin cuello ni collar, que presentan células hexagonales con perforaciones y el borde corial continuo al plano de la cáscara y del opérculo, y (ii) huevos que carecen de estructura coriónica definida, sin células hexagonales ni collar, pero con anillo corial ancho, liso o rugoso y en plano distinto al de la cáscara y el opérculo (Evangelista-Martínez *et al.*, 2010).

Triatoma carrioni por su exocorion podría ser asociado al primer grupo (i), debido a que presenta células hexagonales con líneas límites bien definidas. Pero, el corion de esta especie no presenta granulaciones/perforaciones, es liso. El opérculo de esta especie es sumamente característico, presenta células de cinco y cuatro lados.

Rhodnius ecuadoriensis presentó el huevo más característico de las especies de estudio. Los huevos tienen un borde corial grueso (anillo corial), separado por la presencia de una constricción conocida como cuello. Celdas con líneas límites gruesas, que definen claramente células hexagonales o pentagonales cóncavas/infundibuliformes que presentan un pozo folicular en el centro. Las macroestructuras (cuello y anillo corial) y la arquitectura exocorial (células) son características de varias especies del género *Rhodnius* (Lent & Wygodzinsky, 1979; Barata, 1981). Por ejemplo, las especies que conforman el complejo

pallescens (*R. ecuadoriensis*, *R. colombiensis* y *R. pallescens*) se diferencian por las líneas límites evidentes en *R. ecuadoriensis* y carentes en las otras dos especies, las cuales se distinguen debido a que el huevo de *R. pallescens* presenta collar (Lent & Wygodzinsky, 1979; Barata, 1981, 1998; dos Santos *et al.*, 2009).

Estudios en *R. prolixus* han demostrado que la superficie del corion (tipo de células) cambian entre zonas del huevo, siendo la zona media rica en hexágonos y las zonas caudal y anterior en polígonos no-hexagonales (Chaves & Añez, 2003; Páez-Colasante & Aldana, 2008), lo cual se observa ligeramente en las cuatro especies. Sin embargo, se recomienda ampliar el estudio.

Los aerópilos y micrópilos son importantes, porque a través de ellos se difunden los gases al interior del huevo (Hinton, 1981; Gautam *et al.*, 2015). Esto sugiere que a mayor número de poros mayor será la susceptibilidad del huevo al control mediante insecticidas (Gautam *et al.*, 2015). En las cuatro especies, estas estructuras fueron ubicadas en la parte anterior del huevo (zona opercular). Esto corrobora que la respiración del embrión ocurre mayormente en esta área (Picollo *et al.*, 1976). La ubicación de estos poros se relaciona con el grado de penetración del insecticida, el que es seis veces mayor que en la base (Picollo *et al.*, 1976).

Estudios previos en triatominos han demostrado la presencia de alrededor de 200 aerópilos, número aproximadamente constante durante el desarrollo (Tuft, 1950; Beament, 1947). Los micrópilos se encuentran en menor número (aproximadamente 13 por huevo), siendo la edad de la hembra el factor que influencia en el número de estructuras (Tuft, 1950). Sin embargo, la identificación se dificulta, ya que para reconocer un micrópilo verdadero se debe ubicar el orificio interno de este, lo cual no se logró en ninguna especie.

La caracterización exocorial ha sido utilizada para describir a los huevos de los triatomíneos, pero el costo de este estudio limita el número de muestra. Por lo que, para identificar especies se combina esta técnica con análisis de morfometría tradicional. Según Hernández (1991) y González *et al.* (2009), la cuantificación y medición del diámetro de los aerópilos y micrópilos, el análisis de distribución de las perforaciones y la medición de las células que forman el exocorion son factores importantes para la diferenciación de especies e incluso de poblaciones. Estos procesos requieren una gran inversión de tiempo y esfuerzo. Debido a ello, se podría analizar estas características mediante la técnica de “wavelets” o análisis de textura. Esta técnica divide los datos en diferentes componentes de frecuencia, los cuales son superpuestos mediante la técnica similar a la de Fourier (Graps, 1995; Weyn *et al.*, 1998).

Por consiguiente, la estrategia de la oviposición (huevos libres o adheridos), la forma del huevo, la morfología macroscópica (presencia de cuello), el cambio de color durante el desarrollo, el tiempo de desarrollo, el porcentaje de nacimiento y las características exocorial (tipo de células) mostraron diferencias principales entre tribus (Triatomini y Rhodniini). Esto significa que las características etológicas, ecológicas y morfológicas relacionadas a los huevos no permiten reconocer especies fácilmente, siendo indispensable analizar si las técnicas de MT y MG tienen un mayor alcance en este requerimiento.

6.1.2 Influencia del tiempo de desarrollo, posición y viabilidad en la forma de los huevos

El tamaño y la forma de los huevos se diferencian según el tiempo de desarrollo, siendo los huevos de estadios finales de *P. chinai* y *R. ecuadoriensis* más pequeños (sqrA) y angostos (conformación). Estudios en *R. prolixus* demostraron que el diámetro máximo de los huevos incrementa durante el desarrollo (Chaves *et al.*, 2003), lo que contradice a lo obtenido en este estudio. Sin embargo, estudios posteriores en *R. prolixus* han demostrado que durante la embriogénesis se movilizan las reservas de lípidos y disminuye la cantidad de triglicérido, debido al consumo del mismo por parte del embrión (Atella *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2011). Esto podría explicar el fenómeno observado en este estudio. Quizá, el incremento del diámetro registrado se debe a la dificultad de la toma de datos, debido a que el huevo debe estar en la misma posición al inicio y al final del experimento.

La forma del huevo no varió según la posición, pero varió significativamente según el estado de viabilidad. Los individuos viables son más pequeños (sqrA) y angostos, debido al consumo de yema por parte del embrión (Atella *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2011). Los datos de tamaño coinciden con lo observado en *T. circummaculata* y *T. rubrovaria* (da Rosa *et al.*, 2000). La varianza de los huevos no-viables nos indica que los individuos extremadamente grande o extremadamente pequeños no son aptos para desarrollarse (fenotipo menos apto), lo que puede deberse a la falta de nutrientes para el embrión o a la falta de espacio para el desarrollo, respectivamente. Aunque, existe la posibilidad de que estos huevos no hayan sido fertilizados. Cual sea la causa, la mayor vulnerabilidad de los tamaños extremos coincide con el trabajo famoso de Bumpus (Bumpus, 1899) sobre pájaros, observando que en situación de estrés la mortalidad más importante se encontraba entre los más grandes y los

más pequeños, sugiriendo la realidad del concepto de fenotipo “óptimo”, intermediario entre extremos.

Durante los análisis de MT y MG se recomienda considerar el estadio de desarrollo y el estado de viabilidad de los individuos analizados, ya que se demuestra que estos factores aportan heterogeneidad a los datos. Esta heterogeneidad podría generar ruido en la diferenciación entre las especies y poblaciones. En este estudio se utilizó sólo individuos viables en la etapa final del desarrollo y en posición ventral.

6.1.3 Variación interespecífica del tamaño de los huevos

El tamaño ha demostrado ser una característica importante en la descripción de los huevos de las distintas especies. Barata (1998) registró la variación significativa de la longitud máxima de 35 especies de triatomíneos pertenecientes a nueve de los quince géneros. Rivas *et al.* (2013) demostraron la capacidad de las variables tradicionales (LM, DM y DO) para discriminar seis especies del género *Triatoma*. Debido a esto, se evaluó el alcance del tamaño para discriminar los huevos de las cuatro especies estudiadas.

En el presente estudio, el tamaño se analizó mediante seis variables, cuatro obtenidas mediante MT (LM, DM, DO y GS) y dos mediante MG (sqrA y CS). La sqrA y el DO son las únicas variables que presentaron distintos valores en las cuatro especies. El CS del opérculo demostró diferencias en las tres especies de la tribu Triatomini. La captura de la forma del opérculo de los huevos de *R. ecuadoriensis* requirió más puntos que el opérculo de las otras especies, por lo que en el análisis del CS no se incluyó esta especie.

La principal causa de las diferencias de tamaño está relacionada con la fisiología del organismos y heterogeneidad debida al ambiente (Dujardin *et al.*, 2007; Dujardin & Slice, 2007). Estudios en huevos de *A. aegypti* han demostrado que el tamaño del huevo se relaciona con la humedad, cuando la humedad óptima sube o baja los huevos disminuyen su tamaño (Kliewer, 1961). El tamaño también puede ser afectado por la nutrición o el nivel de salud de los adultos (Steinwascher, 1984; Catalá, 1989; Zheng *et al.*, 2015). Sin embargo, la humedad y las condiciones de los adultos son factores que posiblemente no afectan este estudio, debido a que las colonias de las diferentes especies fueron colocadas en iguales condiciones de humedad y temperatura y alimentadas en la misma frecuencia y cantidad de tiempo.

Por ende, la posible variación de tamaño entre los huevos se relaciona con el tamaño de la hembra, es decir hembras grandes ponen huevos grandes (Steinwascher, 1984). Por ejemplo, los huevos de *R. ecuadoriensis* son los más pequeños al igual que la hembra de esta especie. La variación de tamaño probablemente es parte de las diferencias evolutivas que cada especie presenta, es decir la variación del tamaño depende de las adaptaciones de las especies a sus respectivos nichos (Klingenberg & Spence, 1997; Molina *et al.*, 2000; Dujardin & Slice, 2007; Soto-Vivas *et al.*, 2011).

En este estudio se observó que en Loja existen tres niveles de tamaño de huevo: pequeños (*R. ecuadoriensis*), medianos (*T. carrioni*) y grandes (*P. chinai*). Esto significa que posiblemente las tres especies han adaptado el tamaño de sus huevos de manera distinta, lo que refleja la historia evolutiva que estas especies han sufrido para subsistir en condiciones ambientales similares. En Manabí, se observaron sólo dos niveles de huevos: pequeños (*R. ecuadoriensis*) y grandes (*P. howardi*).

No obstante, el tamaño no es una característica para determinar diferencias interespecíficas, a pesar de que sea propio de cada especie. Debido a que, se observa solapamiento de los valores mínimos y máximos en las seis variables de tamaño y a la variación intraespecífica de cada especie.

6.1.4 Variación interespecífica de la conformación de los huevos

Los estudios de huevos definen la forma de manera subjetiva mediante las palabras: elipsoidal, esferoidal o cilíndrica (Barata, 1998; dos Santos *et al.*, 2009). Otros estudios definen la forma mediante la relación entre el largo y el ancho (índice longitud/anchura) del huevo, donde valores mayores a 1 indican huevos alargados y valores menores a 1 huevos esféricos (Hernández, 1991). En este estudio se compara la forma de los huevos obtenida por dos diferentes técnicas de morfometría: tradicional (MT) y geométrica (MG).

Mediante MT se obtuvieron dos análisis: tamaño incluido (“size-in”) y tamaño excluido (“size-out”). El análisis “size-in” es el comúnmente utilizado para discriminar especies mediante esta técnica de morfometría. Un ejemplo de ello es la discriminación de seis especies del género *Triatoma* mediante las variables LM, DM y DO (Rivas *et al.*, 2013). El análisis “size-out” utiliza las mismas variables del primer análisis, pero primero extrae tentativamente la influencia del tamaño. Esto significa que el verdadero análisis de forma es el “size-out. Por ende, la mayor discriminación observada en el análisis “size-in” se debe a que este incluye el tamaño, característica evolutiva propia de cada especie pero inestable frente a varios ambientes.

Mediante MG se analizó la conformación del contorno del huevo (huevo entero) y del opérculo. Se decidió analizar el opérculo debido a la significación del DO en los análisis tradicionales de tamaño. Ambos análisis (contorno completo y opérculo) permitieron discriminar significativamente las especies de la tribu Triatomini, pero la conformación del opérculo demostró menores diferencias entre especies (alto solapamiento). Al realizar el análisis de conformación del huevo completo excluyendo la presencia de los huevos de *R. ecuadoriensis* se observa que el solapamiento es nulo incluso entre las especies del género *Panstrongylus*.

Las especies del género *Panstrongylus* podrían ser reconocidas como variaciones cromáticas de la misma especie según nuevos estudios de fenotipo antenal, morfometría geométrica de cabeza y alas, citogenética y modelamiento de nicho ecológico (Villacís *et al.* in prep.). En contradicción, el análisis discriminante y las puntuaciones de reclasificación relativamente altas de la conformación del contorno (92% para *P. chinai* y 93% para *P. howardi*) pueden sugerir que son dos especies distintas. Por ello, sugieren complementar el estudio de *P. chinai* y *P. howardi* mediante cruces experimentales.

Las puntuaciones de la reclasificación de la conformación del opérculo no fueron tan altas como las del contorno. Se observan diferencias principalmente en la zona de la barra de sellado (unión borde corial-borde opercular), lo que significa que la forma del opérculo es más estable entre las especies que la forma del huevo. Sin embargo, las diferencias de forma en la zona de la barra de sellado pueden relacionarse con errores de digitalización, debido a problemas con la coplanaridad (Zelditch *et al.*, 2004; Toro *et al.*, 2010). Por ende, la conformación del contorno da más información para la diferenciación interespecífica que la conformación del opérculo.

Los árboles (Neighbor-Joining) derivados de ambas técnicas morfométricas producen una topología similar a la de los árboles filogenéticos de la subfamilia Triatominae (Schofield & Galvão, 2009; Hwang & Weirauch, 2012). Los dendrogramas fenéticos de este estudio separan claramente las dos tribus, agrupando correctamente las tres especies entre dos géneros: *Panstrongylus* y *Triatoma*. Estos análisis son semejantes a los obtenidos mediante de la conformación del ala y cabeza (Dujardin *et al.*, 2015).

El efecto del tamaño (efecto alométrico) en las discriminaciones obtenidas es significativo en la conformación tanto de los huevos como del opérculo. Esto se relaciona con la importancia del tamaño como característica evolutiva propia de cada especie. Debido a ello, en estudios interespecíficos no se recomienda quitar la contribución del tamaño (Dujardin *et al.*, 2010).

Al comparar las dos técnicas de morfometría se observa que la MG permite discriminar las especies sin problemas de solapamiento y con altas puntuaciones de reclasificación, generando un dendrograma fenético donde las ramas son más largas y los nodos de cada especie están completamente definidos. Además, la MG permite principalmente visualizar las diferencias de los grupos analizados y recrear la forma de las estructuras analizadas (Zelditch *et al.*, 2004; Dujardin, 2008; Toro *et al.*, 2010).

El problema con la MT en los huevos se centra en la toma de datos, debido a que al no poder establecer landmarks homólogos de buena calidad se genera errores de medición.

Por todas estas razones, se recomienda utilizar la MG para futuros análisis de forma, a pesar de que esta requiere más tiempo para la digitalización y análisis matemáticos más complejos.

También, se recomienda utilizar la conformación del huevo entero (contorno) para la diferenciación interespecífica de los huevos. Pero, se debe considerar que el EFA requiere un tamaño de muestra grande para poder tener mayor número de armónicas. Las armónicas recrean la forma, donde el grado de fidelidad con la forma original depende de su número (Lestrel, 1989).

Este es el primer estudio que demostró geoméricamente que la forma de los huevos (contorno) varía entre especies de triatominos. La forma, a diferencia del tamaño, es menos sensible al ambiente (Dujardin *et al.*, 2007; Dujardin & Slice, 2007). Se ha demostrado que evidencia un fuerte determinismo genético, considerándose un carácter poligénico (Klingenberg & Leamy, 2001; Dujardin, 2008; Perrard *et al.*, 2014). En los huevos de *Heteropeza pygmaea* (Diptera: Cecidomyiidae) y *Periplaneta americana* (Orthoptera: Blatoiidae) se demostró que la forma del huevo está influenciada por la tensión generada por los microtúbulos y desmosomas del epitelio folicular (Tucker & Meats, 1976). Cuando los ovocitos de *H. biliar* maduran fuera del epitelio se observó que tornan su forma alargada a esférica (Went, 1978). El epitelio folicular rodea al oocito, secreta el corion y su ausencia permite que los embriones sólo pueden desarrollar hasta la fase blastodermo (Tucker & Meats, 1976; Went, 1978). Estos resultados indican que el epitelio folicular es responsable de la forma del huevo (Went, 1978).

Estas estructuras parecen no ser el único determinante de la forma del huevo. En los huevos de amniotas se demostró que el tamaño y forma del oviducto influyen al huevo, el cual debe asegurar su paso por este conducto para ser ovipositado sin dificultad (Deeming & Ruta, 2014). En insectos se han observado grandes diferencias fenotípicas en la forma y tamaño del oviducto (Hodin, 2009). Pero los estudios realizados sobre la plasticidad de los

oviductos se centran en analizar el tamaño de los huevos, mas no la forma (Hodin, 2009). Se considera la variación de tamaño y la flexibilidad del corion estrategias para que la oviposición ocurra.

Por este motivo, se recomienda también analizar la genitalia femenina de las especies de *Panstrongylus* y aumentar la diversidad de la muestra de *P. howardi*. Los individuos parentales de esta especie fueron colectados el mismo día en la misma comunidad, lo que podría tener un impacto en la representatividad de la forma del huevo.

Debido al carácter poligenético de la forma y a su alcance en la discriminación de los huevos de las cuatro especies, se reconoce que la forma es una característica adecuada para determinar diferencias interespecíficas de los huevos, contrario de lo observado con el tamaño.

6.2 Estudios Intraespecíficos

La diversidad de la subfamilia Triatominae se relaciona con la capacidad de las especies de adaptarse a ambientes naturales y artificiales para poder sobrevivir y aprovechar los recursos y nichos existentes (Molina *et al.*, 2000).

6.2.1 Tribu Triatomini (*Panstrongylus* y *Triatoma*): Comparación entre hábitats

6.2.1.1 Comparación del tamaño

El tamaño (LM, DM, DO, GS, sqrA y CS) de huevos de *P. chinai* no varió entre hábitats (domicilio y peridomicilio). Los huevos de *T. carrioni* del hábitat domiciliar y peridomiciliar sólo se diferencian por el tamaño del opérculo (DO y CS). El tamaño está relacionado a las adaptaciones que los huevos de cada hábitat presentan. La ausencia de diferencias puede indicar la activa movilidad de los individuos adultos entre ambos hábitats (Vargas *et al.*, 2006).

Se observa que la varianza de las diferentes variables de tamaño de los huevos de *T. carrioni* presenta una tendencia, es mayor en los huevos de intradomicilio. Esto nos indica que existe mayor variabilidad de tamaño en este hábitat, es decir no existe una fuerte selección sobre el tamaño de los huevos dentro de las casas. Esto sugiere que el ambiente doméstico es más favorable incluso para los huevos, porque proveen refugio y alta disponibilidad de sangre a los adultos.

6.2.1.2 Comparación de la conformación

En los huevos de *P. chinai* la forma del contorno entre ambientes no presenta diferencias muy visibles, pero su significación indica que los huevos domiciliarios y peridomiciliarios son diferentes. En los huevos de *T. carrioni* solo se observan diferencias en la forma del

opérculo. Los resultados de la forma del análisis “size-out” en ambas especies coinciden con los de la forma del opérculo.

Las diferencias no muy marcadas entre hábitats en ambas especies (*P. chinai* y *T. carrioni*), y las puntuaciones de reclasificación bajas y cercanas al valor esperado al azar, pueden indicar flujo genético entre hábitats. La diferencia de los opérculos en *T. carrioni* se centra en el borde opercular, lo cual puede ser un efecto de la digitalización de los puntos en esta zona difícil.

6.2.2 Tribu Rhodniini (*Rhodnius ecuadoriensis*): Comparación geográfica y entre hábitats

6.2.2.1 Comparación del tamaño

El tamaño de los huevos de *R. ecuadoriensis* varió geográficamente, siendo los huevos de Manabí los más grandes. Esta diferencia se relaciona con el largo del cuerpo de la hembra, el que es mayor en los individuos de Manabí (Villacís *et al.*, 2010). Según la regla de Bergman, se espera que los huevos (así como los adultos) de Manabí sean más pequeños, ya que esta provincia se encuentra a menor altitud y presenta clima más cálido (Hinton, 1981). Esta contradicción también ha sido observada en alas de *R. ecuadoriensis* (Villacís *et al.*, 2010).

El tamaño de estos huevos también varió según el hábitat. Esto puede relacionarse con el aumento o reducción del tamaño de los individuos parentales (da Rosa *et al.*, 2003). En Loja, la variación de tamaño fue principalmente entre los ambientes domiciliar y peridomiciliar

con el silvestre, siendo estos últimos los más pequeños. Esto posiblemente se debe a la calidad de la comida (sangre) del ambiente silvestre, o a que los individuos más pequeños son menos visibles (adaptación) (Hinton, 1981; OMS, 2002). El tamaño reducido de los huevos del hábitat silvestre está en contradicción con la observación usual de un tamaño mayor de los adultos en condiciones silvestres. También es un resultado contrario a lo que se observa para la misma especie en la provincia de Manabí.

En Manabí, los huevos del ambiente silvestre son los más grandes. Esto posiblemente se debe a que la selección natural favorece a los individuos grandes en condiciones menos favorables, ya que estos son capaces de resistir la escasez temporal de alimentos (Dujardin *et al.*, 1999a; Jaramillo *et al.*, 2002; da Rosa *et al.*, 2003; Schachter-Broide *et al.*, 2009). Otro posible motivo se relaciona con el grado de competencia dentro del ambiente doméstico, es decir el mayor tamaño de la colonia determina menor cantidad de sangre ingerida por la hembra (Jaramillo *et al.*, 2002; da Rosa *et al.*, 2003; Schachter-Broide *et al.*, 2004). Se ha registrado generalmente la reducción del tamaño de las alas y cabezas en triatomíneos que sufren domiciliación (Jaramillo *et al.*, 2002; Dujardin *et al.*, 1999b).

La diferencia del tamaño en la transición de los ambientes domiciliarios y peridomiciliarios al ambiente silvestre, se puede relacionar a la dieta que los individuos presentan (cantidad y tipo de sangre), a la densidad poblacional de cada hábitat, a ambos (Caro-Riaño *et al.*, 2009), al tamaño del individuo parental y a la selección natural (requerimientos del hábitat) (Dujardin, 2008; Jirakanjanakit *et al.*, 2007; Schachter-Broide *et al.*, 2004). Esto significa que el tamaño tiene efecto en la aptitud del individuo (selección del fenotipo más apto) (Nijhout, 2003), siendo posible que en ambiente silvestre de Manabí sea más apto ser grande y en Loja sea más conveniente ser pequeño.

En los huevos de esta especie la variación de tamaño entre hábitats se mantiene a pesar de que los huevos son obtenidos de colonias de laboratorio. Por ello, se puede considerar que las diferencias de tamaño observadas tienen un probable origen genético. La diferencia genética adquirida por el tamaño se puede atribuir al fenómeno de asimilación genética, proceso por el cual un carácter fenotípico que inicialmente se produce en respuesta a alguna influencia del medio ambiente, se convierte por selección en un carácter genotípico que se observa en ausencia de la influencia del medio ambiente (Waddington, 1953).

En los huevos de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) se demostró que el tamaño del huevo (longitud y ancho) es heredable, pero la variación de tamaño dentro de la especie no es transmisible maternalmente entre generaciones, sino que es una variación genética aditiva (Fox, 1994). Esto se relaciona con el fenómeno de asimilación genética en huevos de insectos.

6.2.2.2 Comparación de la conformación

La conformación del huevo varió entre las dos provincias igual que varía la conformación alar de estas dos poblaciones (Villacís *et al.*, 2010). Esto sugiere diferencias genéticas en las dos poblaciones, lo que puede ser resultado de un proceso incipiente de especiación (Villacís *et al.*, 2010). Esto se puede observar también en los dendrogramas fenéticos (árboles Neighbor-Joining), donde la diferencia entre provincias es más importante que entre hábitats. Se sugiere realizar experimentos de cruces entre estas dos poblaciones y comprobar la capacidad reproductiva de los híbridos poblacionales.

Las diferentes estimaciones de la forma (“size-out”, contorno, opérculo) varían significativamente entre hábitats, con la excepción de las poblaciones silvestres y peridomésticas de Loja. La diferencia significativa entre hábitats podría sugerir que durante la adaptación de los triatominos al hábitat doméstico, solo ciertos genotipos del silvestre son aptos para el establecimiento de colonias (Dujardin, 2008). Esto restringe la variabilidad genética de la nueva población (efecto fundador), generando diferenciación a través de endogamia y deriva genética (Dujardin, 2008). Esto se espera a la condición de un flujo reducido o nulo de individuos adultos entre hábitats.

La forma del huevo entre los tres ambientes de Loja nos indica que el peridomicilio es el hábitat transitorio y nexo entre el silvestre y domicilio, debido a que la forma de este es intermedia entre los dos ambientes. La ausencia de diferencia de la forma del opérculo entre el silvestre y peridomicilio de Loja puede sugerir que el origen de las colonias del peridomicilio es silvestre, por lo que las poblaciones naturales de cada especie son importantes a nivel epidemiológico. Sin embargo, la posición elegida para el análisis de los huevos de *R. ecuadoriensis* debe ser evaluada. Debido a que en este estudio se los colocó en posición lateral, siendo recomendable un análisis de los huevos en posición ventral (al igual que el resto de especies).

En las tres especies analizadas el tamaño indicó variación intraespecífica de los huevos, pero esta no permite discriminar los hábitats. La forma del huevo ilustró mayores diferencias entre hábitats, principalmente en los huevos de *R. ecuadoriensis*. La forma obtenida mediante MG definió mejor las diferencias intraespecíficas de los huevos. El análisis “size-out” de ambas comparaciones (geográfica y por hábitat) se asemeja al análisis del opérculo, ambos presentan mayor solapamiento que el análisis del contorno de los huevos. Por ello, se

recomienda la MG del contorno de los huevos como técnica para identificar diferencias fenotípicas intraespecíficas en los huevos de los triatominos.

6.3 La identificación de los huevos de triatominos y el control vectorial

Después de la identificación de las especies blanco, el segundo paso para planificar una buena estrategia de control y prevención de la ECh es conocer las características biológicas de las especies y poblaciones de triatominos. Las especies *P. chinai*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis* tienen un alto potencial vectorial, debido a sus hábitos de alimentación y defecación (Villacís *et al.*, 2008; Mosquera *et al.*, 2016; Padilla, 2016). Estudios acerca del potencial vectorial y ciclo de vida de *P. howardi* se están realizando en la actualidad en el CISEAL.

En Loja se ha reportado que se puede encontrar *P. chinai* y *R. ecuadoriensis* en la misma casa, al igual que *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis* (Grijalva *et al.*, 2005; Grijalva *et al.*, 2012). En Manabí, reportes indican que *P. howardi* puede encontrarse compartiendo hábitat con *R. ecuadoriensis* (Villacís *et al.*, 2015). Estudios realizados por Grijalva *et al.* (2005) en Loja sugieren la habilidad de *T. carrioni* para colonizar el domicilio en cortos periodos de tiempo, lo que nos indica la capacidad de las especies de moverse y aumentar su distribución. Es importante poder identificar los estadios iniciales (huevos y ninfas) de cada especie, con la finalidad de evaluar la aplicación de las estrategias de control vectorial para evitar sucesión ecológica.

Los análisis morfométricos, especialmente la MG del contorno del huevos, permiten identificar los huevos de *P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis*. Siendo esta

técnica más factible que la identificación de los huevos mediante análisis exocoriales (microscopía electrónica de barrido) debido a su bajo costo y fácil acceso.

Por la diversidad de especies en Ecuador y Latinoamérica es necesario aumentar las especies de estudio mediante esta técnica, con el objetivo de poder realizar una base de datos de huevos que nos permita reconocer a qué especie pertenece un huevo desconocido o asegurar su correcta identificación. La identificación de las especies domiciliadas ayuda a formular estrategias de control vectorial. En Loja, *R. ecuadoriensis* es bivoltina mientras que *P. chinai* y *T. carrioni* son univoltinas (Villacís *et al.*, 2008; Mosquera *et al.*, 2016; Padilla, 2016), por lo que las estrategias de control deben adaptarse a controlar ambos tipos de adaptaciones ecológicas (ciclos de vida) o pueden generar resistencia en alguna de estas especies.

Otro factor importante en el control y prevención de la ECh es conocer la compleja relación entre las distintas poblaciones de cada especie (hábitat), ya que las poblaciones silvestres pueden ser fuente de reinfestación (Dujardin *et al.*, 1997; Dujardin & Slice, 2007). La identificación de la ausencia/presencia de diferencias intraespecíficas de los huevos nos puede ayudar a entender si existe flujo de los adultos entre estos tres hábitats. Además, el reconocimiento de la variación de la conformación de los huevos entre hábitats, permite identificar las especies con tendencia a la domiciliación.

En las dos provincias de estudio el vector principal de la ECh es *R. ecuadoriensis*, cuyos huevos (i) son puestos en grupo pegados al sustrato, (ii) son los más pequeños, (iii) tienen una forma peculiar que se diferencia principalmente por la presencia de cuello, (iv) se tornan café-rojizos durante el desarrollo, (v) presentan coloración propia del corion, (vi) presentan el mayor porcentaje de nacimiento (85%), (vii) requirieron de menor tiempo para completar

su desarrollo (17 ± 1.457 días) y (vi) tienen marcada variación de forma y tamaño entre hábitats (domiciliar, peridomiciliar y silvestre). Algunas de estas características quizá otorguen mayor aptitud biológica a los huevos de esta especie, lo que puede relacionarse con su eficiencia como vector.

Por consiguiente, los cambios morfológicos (tamaño y forma) observados en los huevos de *R. ecuadoriensis* pueden tener una importancia epidemiológica grande si están ligados a la eficiencia biológica de la especie (Jaramillo *et al.*, 2002). No obstante, la capacidad de domiciliación que presentan *P. chinai*, *P. howardi* y *T. carrioni* debe ser considerada de suma importancia, ya que pueden ser futuras competencias de *R. ecuadoriensis* u ocupar los nichos que esta deje vacíos debido al control vectorial.

7 LITERATURA CITADA

- Abad-Franch, F., Paucar, A., Carpio, C., Cuba Cuba, C.A., Aguilar, H.M., Miles, M.A. 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: Implications for the Design of Control Strategies. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (5): 611–620.
- Abad-Franch, F., Aguilar, H.M., Paucar, A., Lorosa, E., Noireau, F. 2002. Observations on the domestic ecology of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 199-202.
- Abad-Franch, F., Monteiro, F.A., Jaramillo, N., Gurgel-Gonçalves, R., Dias, F.B.S., Diotaiuti, L. 2009. Ecology, evolution, and the long-term surveillance of vector-borne Chagas disease: A multi-scale appraisal of the tribe Rhodniini (Triatominae). *Acta Tropica* 110 (2-3): 159–177.
- Ábalos, J.W. & Wygodzinsky, P. 1951. Las Triatominae Argentinas (Reduviidae, Hemiptera). Universidad Nacional de Tucumán. Instituto de Medicina Regional. Monografía No. 2. Publicación No. 601. Tucumán, Argentina.
- Adams, D.C., Rohlf, J. & Slice, D.E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* 71 (1): 5–16.
- Aguilar, H.M., Abad-Franch, F., Racines, J., Paucar, A. 1999. Epidemiology of Chagas Disease in Ecuador. A Brief Review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (1): 387–393.
- Aldana, E., Avendaño-Rangel, F., Lizano, E., Rodríguez-Bonfante, C., Bonfante-Cabarcas, R. 2011. Morphological analysis of *Panstrongylus geniculatus* eggs (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae) from a Chagas’ endemic area in the center-west of Venezuela. *Acta Microscopica* 20 (2): 103–111.
- Alonso Calle, D., Quiñones, M.L., Erazo, H.F., Jaramillo, N. 2008. Discriminación por morfometría geométrica de once especies de *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) presentes en Colombia. *Biomédica* 28: 371-85.
- Amano, Y.J. & Diaz, L. 2012. Introducción a la Microscopia Electrónica: Principios y Aplicaciones. Instituto de Higinie y Medicina Tropical. Guayaquil-Ecuador.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Machado, E.A., Medeiros, M.N., Silva-Neto, M.A.C., Masuda, H. 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 77 (3): 405–423.

- Aufderheide, A.C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers, L., Fornaciari, G., Allison, M. 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Cross Mark* 101 (7): 2034–2039.
- Barata, J.M.S. 1981. Aspectos morfológicos de ovos de triatominae. *Revista de Saúde Pública* 15: 490–542.
- Barata, J.M.S. 1998. Macroscopic and exochorial structures of triatominar eggs (Hemiptera, Reduviidae). En: *Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas*. Chapter 10 (Carcavallo, R. U., Girón, I. G., Jurberg, J., Lent, H., eds) pp. 409-429. Editora Fiocruz.
- Beament, J.W. 1946. The Formation and Structure of the Chorion of the Egg in an Hemipteran, *Rhodnius prolixus*. *The Quarterly Journal of Microscopical Science* 87 (4): 393–439.
- Beament, J.W. 1947. The formation and structure of the micropylar complex in the egg-shell of *Rhodnius prolixus* Stahl. (Heteroptera: Reduviidae). *The Journal of Experimental Biology* 23 (1): 213–233.
- Berni, M., Ribeiro, M., Tobias-Santos, V., Caceres-Rodrigues, A., Borges, F., do Vionette-Amaral, R., Masuda, H., Sorgine, M., Nunes da Fonseca, R., Araujo, H. 2014. *Toll* signals regulate dorsal – ventral patterning and anterior – posterior placement of the embryo in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *Evodevo* 5: 38.
- Black, C.L., Ocaña-Mayorga, S., Riner, D., Costales, J.A., Lascano, M.S., Davila, S., Arcos-Terán, L., Seed, J.R., Grijalva, M. J. 2007. Household Risk Factors for *Trypanosoma cruzi* Seropositivity in two Geographic Regions of Ecuador. *The Journal of Parasitology* 93 (1): 12–16.
- Black, C.L., Ocaña-Mayorga, S., Riner, D.K., Costales, J.A., Lascano, M.S., Arcos-Teran, L., Preisser, J., Seed, J.R., Grijalva, M.J. 2009. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in Rural Ecuador and Clustering of Seropositivity within Households. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81 (6): 1035–1040.
- Bookstein, F. 1990a. Introduction and Overview: geometry and biology. En: *Proceeding of the Michigan morphometrics of Workshop*. (Rohlf, J. & Bookstein, F., eds.). pp. 61-74. The University of Michigan Museum of Zoology. Special Publication No. 2. Ann Arbor-Michigan.
- Bookstein, F. 1990b. Higher-Order Features of Shape Change for Landmark Data. En: *Proceeding of the Michigan morphometrics of Workshop*. (Rohlf, J. & Bookstein, F., eds.). pp. 237-250. The University of Michigan Museum of Zoology. Special Publication No. 2. Ann Arbor-Michigan.

- Briones, M.R.S., Souto, R.P., Stolf, B.S., Zingales, B. 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and Biochemical Parasitology* 104 (2): 219–232.
- Bumpus, H.C. 1899. The elimination of the unfit as illustrated by the introduced sparrow, *Passer domesticus* (Fourth Contribution to the Study of Variation). Woods Hole Marine, Biological Laboratories: Biological Lectures. Pp. 209-226.
- Caro-Riaño, H., Jaramillo, N. & Dujardin, J.P. 2009. Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 162–168.
- Catalá, S.S. 1889. Relaciones entre consumo de sangre y ovogenesis en *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera-Reduviidae). *Chagas* 5: 3–10.
- CDC. 2016. American Trypanosomiasis [en línea] <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>> [Consultado: abril, 2016].
- Chaves, L.F. & Añez, N. 2003. Geometría de las células del exocorión de huevos de *Rhodnius prolixus* Stål 1859 (Heteroptera : Reduviidae). *Entomotropica* 18 (1): 1–5.
- Chaves, L.F., Ramoni-Perazzi, P., Lizano, E., Añez, N. 2003. Morphometrical changes in eggs of *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae) during development. *Entomotropica* 18 (2): 83–88.
- Constantinou, C. 1984. Circadian Rhythm of Oviposition in the Blood Sucking Bugs, *Triatoma phyllosoma*, *T.infestans* and *Panstrogylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Interdisciplinary Cycle Research* 15 (3): 203–212.
- Costa, J., Barth, O.M., Marchon-Silva, V., de Almeida, C.E., Freitas-Sibajev, M., Goreti, R., Panzera, F. 1997. Morphological Studies on the *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) Genital Structures and Eggs of Different Chromatic Forms. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 493-498.
- Costales, J.A., Jara-Palacios, M.A., Llewellyn, M.S., Messenger, L.A., Ocaña-Mayorga, S., Villacís, A.G., Tibayrenc, M., Grijalva, M.J. 2015. *Trypanosoma cruzi* population dynamics in the Central Ecuadorian Coast. *Acta Tropica* 151 (1): 88–93.
- Coura, J.R. 2007. Chagas disease : what is known and what is needed – A background article. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (1): 113–122.
- Coura, J.R. 2013. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 108 (8): 962–967.

- Cuba Cuba, C.A., Abad-Franch, F., Roldán Rodríguez, J., Vargas Vásquez, F., Pollack Velasquez, L., Miles, M.A. 2002. The Triatomines of Northern Peru, with Emphasis on the Ecology and Infection by Trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (2): 175–183.
- da Rosa, J.A., Barata, J.M.S., Santos, J.L.F., Cilense, M. 2000. Morfologia de ovos de *Triatoma circummaculata* e *Triatoma rubrivaria* (Hemiptera, Reduviidae). *Revista de Saúde Pública Journal of Public Health* 34: 538–542.
- da Rosa, J.A., Justino, H.G. & Barata, J.M.S. 2003. Diferença no tamanho de cascas de ovos de colônias de *Panstrongylus megistus*. *Revista de Saúde Pública* 37 (4): 528–530.
- Darroch, J.N. & Mosimann, J.E. 1985. Canonical and Principal Components of Shape. *Biometrika* 72: 241-252.
- de Lana, M. & Marquéz, M. 2010. Biology of *Trypanosoma cruzi* and Biological Diversity. En: *American Trypanosomiasis (Chagas disease): One Hundred Tears of Research*. (Telleria, J. & Tibayrenc, M., eds.) pp. 339-353. First edition, Elsevier Editorial, London.
- de Villar, M.I.P., Zerba, E., Wood, E.J., de Licastro, S. 1980. Neurogenesis and occurrence of cholinesterase in the eggs of *Triatoma infestans*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 65: 65–70.
- Deeming, D.C. & Ruta, M. 2014. Egg shape changes at the theropod-bird transition, and a morphometric study of amniote eggs. *Royal Society Open Science* 1: 140311.
- Devera, R., Fernandes, O. & Coura, J.R. 2003. Should *Trypanosoma cruzi* be Called “*cruzi*” Complex? A Review of the Parasite Diversity and the Potential of Selecting Population after in vitro Culturing and Mice Infection. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (1): 1–12.
- Dias, J.C.P. 1965. Reinfestação do município de Bambuí por triatomíneos transmissores da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 63: 107-119.
- Dias, J., Silveira, A. & Schofield, C.J. 2002. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (5): 603–612.
- dos Santos, C.M., Jurberg, J., Galvão, C., da Rosa, J.A., Júnior, W.C., Barata, J.M.S., Obara, M.T. 2009. Comparative descriptions of eggs from three species of *Rhodnius* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (7): 1012–1018.

- dos Santos, C.B., Tavares, M.T., Leite, G.R., Ferreira, A.L., Rocha, L.D. Falqueto, A. 2014. First Report of *Aprostocetus asthenogmus* (Hymenoptera: Eulophidae) in South America and Parasitizing Eggs of Triatominae Vectors of Chagas Disease. *Journal of Parasitology Research* 2014: 547439.
- Dujardin, J.P., Bermudez, H. & Schofield, C. J. 1997. The use of morphometrics in entomological surveillance of sylvatic foci of *Triatoma infestans* in Bolivia. *Acta Tropica* 66 (3): 145–153.
- Dujardin, J.P., Chavez, T., Moreno, J.M., Machane, M., Noireau, F., Schofield, C.J. 1999a. Comparison of Isoenzyme Electrophoresis and Morphometric Analysis for Phylogenetic Reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Journal of Medical Entomology* 36 (6): 653–659.
- Dujardin, J.P., Steindel, M., Chavez, T., Machane, M., Schofield, C.J. 1999b. 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, J. P. 2002. Collection of Landmark for Identification and Characterization (CLIC). Unité de Recherches 062. Unité Mixte de Recherches UMR9926. Institut de Recherches pour le Développement (IRD, France).
- Dujardin, J.P. & Slice, D.E. 2007. Contributions of Morphometrics to Medical Entomology. En: *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies* (M. Timbary ed.) pp. 433–446. United States of America.
- Dujardin, J.P., Beard, C.B. & Ryckman, R. 2007. The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Infection, Genetics and Evolution* 7 (2): 161–167.
- Dujardin, J.P. 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution* 8 (6): 875–890.
- Dujardin, J.P., Costa, J., Bustamante, D., Jaramillo, N., Catalá, S.S. 2009. Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. *Acta Tropica* 110 (2-3): 101–111.
- Dujardin, J.P., Kaba, D. & Henry, A.B. 2010. The exchangeability of shape. *BMC Research Notes* 3: 266.
- Dujardin, J.P., Kaba, D., Solano, P., Dupraz, M., McCoy, K.D., Jaramillo, N. 2014. Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies? *Infection, Genetics and Evolution* 28: 704–714.

- Dujardin, J.P., Thi, K.P., Xuan, L.T., Panzera, F., Pita, S., Schofield, C.J. 2015. Epidemiological status of kissing-bugs in South East Asia: A preliminary assessment. *Acta Tropica* 151 (1): 142–149.
- Evangelista-Martínez, Z., Imbert-Palafox, J.L., Becerril-Flores, M.A., Gómez-Gómez, J.V. 2010. Análisis Morfológico de Huevos de *Triatoma barberi* Usinger (Hemiptera: Reduviidae). *Neotropical Entomology* 39 (2): 207–213.
- Feliciangeli, M.D., Fernandez, E. & Tonn, R.J. 1978. A Microhymenopteran parasite of eggs of *Psammolestes arthuri* (Hemiptera: Reduviidae) and observations of experimental parasitism of eggs of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 14 (5): 593–594.
- Forattini, O.P., Rabello, E., Castanho, M., Pattoli, D. 1970. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. I.- Observações sobre *Panstrongylus megistus* e suas relações com focos naturais de Infecçãoemárea urbana nacidade de São Paulo. *Revista de Saúde Pública* 4: 19- 30.
- Forattini, O.P., Alves Ferreira, O., da Rocha e Silva, E.O., Rabello, E.X. 1977. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana, VIII - domiciliação de *Panstrongylus megistus* e sua presença extradomiciliar. *Revista de Saúde Pública* 11 (4): 73–86.
- Fox, C. 1994. Maternal and genetic influences on egg size and larval performance in a seed beetle (*Callosobruchus maculatus*): multigenerational transmission of a maternal effect? *Heredity* 73: 509–517. doi:10.1038/hdy.1994.149
- Freitas, J.L.P. 1963. Importancia do expurgo seletivo dos domicílios e anexos para a profilaxia da moléstia de Chagas pelo combate aos triatomíneos. *Arg. Hig. São Paulo* 28: 217-272.
- Galvão, C. & Justi, S.A. 2015. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Tropica* 151 (1): 116–125.
- Garzón, E.A., Barnabé, C., Córdova, X., Bowen, C., Paredes, W., Gómez, E., Ouaisi, A., Tibayrenc, M., Guevara, Á. 2002. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. *Transactions of the Royal. Society of Tropical Medicine and Higiene* 96: 378–382.
- Gaspe, M.S., Schahter-Broide, J., Gurevitz, J.M., Kitron, U., Gürtler, R.E., Dujardin, J.P. 2012. Microgeographic spatial structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera:Reduviidae) populations using wing geometric morphometry in the Argentine Chaco. *Journal of Medical Entomology* 49 (3): 504–514.

- Gautam, S.G., Opit, G.P., Margosan, D., Hoffmann, D., Tebbets, J.S., Walse, S. 2015. Comparative egg morphology and chorionic ultrastructure of key stored-product insects pests. *Annals of the Entomological Society of America* 108: 43-56.
- González, G., Aldana, E., Lizano, E., López, G. 2009. Arreglo de los Polígonos del Exocorion de Huevos Ecllosionados de Algunas Especies de los géneros *Triatoma* Laporte, *Meccus* Stal y *Nesotriatoma* Usinger (Heteroptera: Reduviidae). *Entomologistas do Brasil* 2 (3): 76-89.
- Gorla, D.E. & Schofield, C.J. 1985. Analysis of egg mortality in experimental populations of *Triatoma infestans* under natural climatic conditions in Argentina. *Bulletin of the Society of Vector Ecologists* 10: 107-117.
- Graps, A. 1995. An introduction to wavelets. *IEEE Xplore: Computing in Science & Engineering* 2: 1-29.
- Grijalva, M.J., Escalante, L., Paredes, R.A., Costales, J. A., Padilla, A., Rowland, E.C., Aguilar, H.M., Racines, J. 2003. Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the Amazon region of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69 (4): 380-385.
- Grijalva, M.J., Palomeque-Rodríguez, F., Costales, J.A., Davila, S., Arcos-Teran, L. 2005. High Household Infestation Rates by Synanthropic Vectors of Chagas Disease in Southern Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 42 (1): 68-74.
- Grijalva, M.J. & Villacís, A.G. 2009. Presence of *Rhodnius ecuadoriensis* in sylvatic habitats in the southern highlands (Loja Province) of Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 46 (3): 708-711.
- Grijalva, M.J., Palomeque-Rodríguez, F., Villacís, A.G., Black, C.L., Arcos-Teran, L. 2010. Absence of domestic triatomine colonies in an area of the coastal region of Ecuador where Chagas disease is endemic. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 105 (5): 677-681.
- Grijalva, M.J., Villacís, A.G., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C.A., Baus, E.G. 2011. Limitations of selective deltamethrin application for triatomine control in central coastal Ecuador. *Parasites & Vectors* 4 (1): 1-10.
- Grijalva, M.J., Suarez-Davalos, V., Villacís, A.G., Ocaña-Mayorga, S., Dangles, O. 2012. Ecological factors related to the widespread distribution of sylvatic *Rhodnius ecuadoriensis* populations in southern Ecuador. *Parasites & Vectors* 5, 17.
- Grijalva, M.J., Villacís, A.G., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C.A., Moncayo, A.L., Baus, E.G. 2015. Comprehensive Survey of Domiciliary Triatomine Species Capable of Transmitting Chagas Disease in Southern Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Diseases*

- 9: e0004142.
- Guhl, F. 2007. Chagas disease in Andean countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 29-37.
- Guhl, F., Pinto, N. & Aguilera, G. 2009. Sylvatic triatominae: a new challenge in vector control transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (1): 71-75.
- Gurgel-Gonçalves, R., Maeda, M. H., Ferreira, J.B.C., da Rosa, A.F., Cuba Cuba, C.A. 2011. Morphometric changes of *Rhodnius neglectus* (Hemiptera: Reduviidae): in the transition from sylvatic to laboratory conditions. *Zoologia (Curitiba)* 28 (5): 680–682.
- Hernández, J.M. 1991. Estudio de los caracteres del huevo en diversos Cerambycidae ibéricos y su interés taxonómico (Coleóptera). *Graellsia* 47: 49–59.
- Hinton, H.E. 1981. Biology of insect eggs. British Library Cataloguing in Publication Data Hinton. First edition. Oxford, England.
- Hodin, J. 2009. She shapes events as they come: Plasticity in female insect reproduction. En: Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequence. (Whitman, D., Ananthakrishnan, T.N., eds.) pp. 423–521. Enfield, NH, USA: Science Publishers.
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S.E., Sachs, J.D., Savioli, L. 2007. Control of Neglected Tropical Diseases. *New England Journal of Medicine* 10 (6): 1018–1027.
- Huebner, E. & Anderson, E. 1972a. A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. I. The ontogeny of the follicular epithelium. *Journal of Morphology* 136: 459–494.
- Huebner, E. & Anderson, E. 1972b. A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. III. Cytoarchitecture and development of the trophic chamber. *Journal of Morphology* 138 (1): 1–39.
- Huebner, E. & Anderson, E. 1972c. A Cytological Study of the Ovary of *Rhodnius prolixus*. II. Oocyte Differentiation. *Journal of Morphology* 137 (1): 385–415.
- Hwang, W.S. & Weirauch, C. 2012. Evolutionary History of Assassin Bugs (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): Insights from Divergence Dating and Ancestral State Reconstruction. *PLoS One* 7: e45523.
- Ibáñez, C.I., Bozzini, J.P. & Mariano, M.I. 2009. *Triatoma infestans* (Klug 1834)'s Embriology [II] Gonadogenesis. *Acta Microscopica* 18: 1–18.
- INAMHI. 2014. Boletín Climatológico Anual 2013.

- Jaramillo, N., Castillo, D. & Wolff, M. 2002. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (5): 667–673.
- Jirakanjanakit, N., Leemingsawat, S., Thongrungrat, S., Apiwathnasorn, C., Singhaniyom, S., Bellec, C., Dujardin, J.P. 2007. Influence of larval density or food variation on the geometry of the wing of *Aedes (Stegomyia) aegypti*. *Tropical Medicine and International Health* 12 (11): 1354–1360.
- Jurberg, J. & Galvão, C. 2006. Biology, Ecology, and Systematics of Triatominae (Heteroptera: Reduviidae), Vectors of Chagas Disease, and Implications for Human Health. *Denisia* 19: 1096–1116.
- Justi, S.A., Russo, C.A.M., dos Santos, J.R., Obara, M.T., Galvão, C. 2014. Molecular phylogeny of Triatomini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Parasites & Vectors* 7: 149.
- Kelly, G.M. & Huebner, E. 1989. Embryonic Development of the Hemipteran Insect *Rhodnius prolixus*. *Journal of Morphology* 199: 175–196.
- Kendall, D.G. 1977. The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability* 9: 428-430.
- King, R.C. & Akai, H. 1984. Insect ultrastructure. Symposia of the Royal Entomological Society of London. Primera edition. Volumen 2. New York and London.
- Kliewer J.W. 1961. Weight and hatchability of *Aedes aegypti* eggs (Diptera: Culicidae) *Annals of the Entomological Society of America* 54:912–917.
- Klingenberg, C.P. 1996. Multivariate allometry. En: *Advances in Morphometrics* (Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P., Slice, D.E., eds.) pp. 23-49. Plenum Press. New York.
- Klingenberg, C.P. & Spence, J.R. 1997. On the role of body size for life-history evolution. *Ecological Entomology* 22: 55–68.
- Klingenberg, C.P. & Leamy, L.J. 2001. Quantitative genetics of geometric shape in the mouse mandible. *Evolution* 55: 2342–2352
- Krieger, J.D. 2010. Controlling for Curvature in the Quantification of Leaf Form. En: *Morphometrics for Nonmorphometricians*. (Elewa, A., ed.) pp. 27-71. Minia University. Springer. Minia, Egypt.
- Kuhl, F.P. & Giardina, C.R. 1982. Elliptic Fourier Features of a Closed Contour. *Computer Graphics and Image Processing* 18: 236–258.

- Lee, B.Y., Bacon, K.M., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J. 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infection Diseases* 13: 342-348.
- Lent, H. & Wygodzinsky, P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History* (Volumen 163). New York.
- Lestrel, P. 1989. Method for Analyzing Complex Two-Dimensional Forms: Elliptical Fourier Functions. *American Journal of Human Biology* 1: 149–164.
- Linley, J.R., Lounibos, L.P. & Conn, J. 1993. A description and morphometric analysis of the eggs of four South American populations of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics* 25: 198-214.
- Lounibos, L.P., Coetzee, M., Duzak, D., Nishimura, N., Linley, J.R., Service, M.W., Cornel, A.J., Fontenille, D., Mukwaya, L.G. 1999. A description and morphometric comparison of eggs of species of the *Anopheles gambiae* complex. *Journal of American Mosquito Control Association* 15 (2): 157–185.
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P., Pena, S.D.J. 2004. Should *Trypanosoma cruzi*: Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 99 (1): 1–12.
- Manly, B.F.J. 2004. *Multivariate statistical methods: A primer*. Third edition. Chapman & Hall Statistics Texts.
- Mellanby, H. 1935. The Early Embryonic Development of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Heteroptera). *Journal of Cell Science* s2-78: 71–90.
- Molina, J.A., Gualdrón, L.E., Brochero, H.L., Olano, V.A., Barrios, D., Guhl, F. 2000. Distribución actual e importancia epidemiológica de las especies de triatomíneos (Reduviidae : Triatominae) en Colombia. *Biomédica* 20: 344– 360.
- Moncayo, A. 2003. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (5): 577–591.
- Mosquera, K.D., Villacís, A.G. & Grijalva, M.J. 2016. Life Cycle, Feeding, and Defecation Patterns of *Panstrongylus chinai* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Under Laboratory Conditions. *Journal of Medical Entomology*: 1–6.
- Nieto-Sanchez, C., Baus, E.G., Guerrero, D., Grijalva, M.J. 2015. Positive deviance study to inform a Chagas disease control program in southern Ecuador. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (3): 299–309.
- Nijhout, H.F. 2003. The control of body size in insects. *Developmental Biology* 261: 1–9.

- Noireau, F. & Dujardin, J.P. 2010. Biology of Triatominae. En: American Trypanosomiasis (Chagas disease): One Hundred Years of Research. (Telleria, J. & Tibayrenc, M., eds.) pp. 149-164. First edition, Elsevier Editorial, London.
- Obara, M.T., Barata, J.M.S., da Silva, N.N., Ceretti Júnior, W., Urbinatti, P.R., da Rosa, J.A., Jurberg, J., Galvão, C. 2007a. Estudo de ovos de quatro espécies do gênero *Meccus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vectores da doença de Chagas. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz 102 (1): 13–19.
- Obara, M.T., da Rosa, J.A., da Silva, N.N., Ceretti Júnior, W., Urbinatti, P.R., Barata, J.M.S., Jurberg, J., Galvão, C. 2007b. Estudo Morfológico e Histológico dos Ovos de Seis Espécies do Gênero *Triatoma* (Hemiptera: Reduviidae). Neotropical Entomology 36 (5): 798–806.
- Ocaña-Mayorga, S., Llewellyn, M.S., Costales, J.A., Miles, M.A., Grijalva, M.J. 2010. Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. PLOS Neglected Tropical Diseases 4: 1–8.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2010. Chagas Disease: Control and Elimination. UNDP/World Bank/WHO.
- Padilla, F.A. 2016. Ciclo de vida, hábitos alimenticios y de defecación, de *Triatoma carrioni* (Larrouse, 1926) pertenecientes a la provincia de Loja, bajo condiciones controladas de laboratorio. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Páez-Colasante, X. & Aldana, E. 2008. Morfometría geométrica del borde borial y del collar de huevos de cinco especies del género *Rhodnius* Stal (Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). EntomoBrasilis 1 (3): 57–61.
- Patterson, J.S., Barbosa, S.E. & Feliciangeli, M.D. 2009. On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. Acta Tropica 110 (2-3): 187–199.
- Perrard, A., Baylac, M., Carpenter, J.M., Villemant, C. 2014. Evolution of wing shape in hornets: Why is the wing venation efficient for species identification? Journal of Evolutionary Biology 27: 2665–2675.
- Picollo, M.I., Wood, E.J., de Licastro, S.A., Zerba, E. 1976. Acción ovicida de insecticidas organofosforados en *Triatoma infestans* (Vinchuca). Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana X (4): 309–319.
- Pinto, C. 1924. Biología do *Triatoma brasiliensis* Neiva. Sciência Médica 2: 541–543.

- Polanco, V., Patiño, M., Torrellas, A., Marrero, R., Feliciangeli, M.D. 2005. Hallazgo de huevos de *Rhodnius prolixus* parasitados por microhimenópteros en un hábitat silvestre, en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental* 45 (1): 49–51.
- Rabinovich, J.E., Jordá, M.T. & Bernstein, C. 2000. Local mate competition and precise sex ratios in *Telenomus fariai* (Hymenoptera: Scelionidae), a parasitoid of triatomine eggs. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 48: 308-315.
- Rabinovich, J.E., Pietrokovsky, S. & Wisnivesky-Colli, C. 2006. Temperature and development rate of *Triatoma guasayana* (Hemiptera: Reduviidae) eggs under laboratory conditions: Physiological and adaptive aspects. *Physiological Entomology* 31 (4): 361–370.
- Rassi, A.J., Rassi, A. & Marin-Neto, J.A. 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375: 1388–1402.
- Radio, P.A. 1926. Studies of the Eggs of Some Reduviidea (Heteroptera). *University of Kansas Science Bulletin* 16 (4): 157–179.
- Reyment, R.A. 2010. Morphometrics: An Historical Essay. En: *Morphometrics for Nonmorphometricians*. (Elewa, A., ed.) pp. 9-24. Minia University. Springer. Minia, Egypt.
- Rivas, N., Sánchez, M.E., Martínez-Ibarra, A., Camacho, A.D., Tovar-Soto, A., Alejandre-Aguilar, R. 2013. Morphological study of eggs from five Mexican species and two morphotypes in the genus *Triatoma* (Laporte, 1832). *Journal of Vector Ecology* 38 (1): 90–96.
- Rodriguez, M.H., Chavez, B., Hernandez-Avila, J.E., Orozco, A., Arredondo-Jimenez, J.I. 1999. Description and Morphometric Analysis of the Eggs of *Anopheles (Anopheles) vestitipennis* (Diptera: Culicidae) from Southern Mexico. *Journal of Medical Entomology* 36: 78-87.
- Rohlf, F.J. & Archie, J.W. 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology* 33 (3): 302–317.
- Rohlf, F.J. 1990a. Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 299–319.
- Rohlf, F. 1990b. Fitting Curves to Outlines. En: *Proceeding of the Michigan morphometrics of Workshop*. (Rohlf, J. & Bookstein, F., eds.) pp. 167-178. The University of Michigan Museum of Zoology. Special Publication No. 2. Ann Arbor-Michigan.
- Rohlf, F.J. & Slice, D.E. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40-59.

- Rohlf, F.J. & Marcus, L.F. 1993. A Revolution in Morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (4): 129–132.
- Ryckman, R. 1962. Biosystematics and hosts of the *Triatoma protracta* complex in North America: (Hemiptera, Reduviidae, Rodentia, Cricetidae). University of California Publications in Entomology.
- Sánchez, D. 2015. Presencia de triatominos en *Phytelephas aequatorialis* en 74 comunidades rurales de la provincia de Manabí. Tesis de Licenciatura, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Sánchez-Otero, J. 2014. Introducción al Diseño Experimental. Giro Creativo. Quito, Ecuador.
- Sánchez-Otero, J. 2015. Introducción a la estadística no paramétrica y al análisis multivariado. Giro Creativo. Quito, Ecuador.
- Santos, R., Rosas-Oliveira, R., Saraiva, F. B., Majerowicz, D., Gondim, K. C. 2011. Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 77 (1): 1–16.
- Schachter-Broide, J., Dujardin, J.P., Kitron, U., Gürtler, R.E. 2004. Spatial Structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) Populations from Northwestern Argentina Using Wing Geometric Morphometry. *Journal of Medical Entomology* 41 (4): 643–649.
- Schachter-Broicccde, J., Gürtler, R.E., Kitron, U., Dujardin, J.P. 2009. Temporal Variations of Wing Size and Shape of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) Populations From Northwestern Argentina Using Geometric Morphometry. *Journal of Medical Entomology* 46 (5): 994–1000.
- Schilman, P.E., Minoli, S.A. & Lazzari, C.R. 2009. The adaptive value of hatching towards the end of the night: lessons from eggs of the haematophagous bug *Rhodnius prolixus*. *Physiological Entomology* 34 (3): 231–237.
- Schofield, C.J. 1994. *Triatominae Biology & Control*. Firts Edition. UK: Eurocommunica Publications.
- Schofield, C. & Dujardin, J.P. 1997. Chagas' Disease vector control in Central America. *Parasitology Today* 13 (4): 141-144.
- Schofield, C.J. 2001. *Field Testing and Evaluation of Insecticides for Indoor Residual Spraying against domestic vectors of Chagas Disease* Geneva. World Health Organization.

- Schofield, C.J. & Galvão, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica* 110 (2-3): 88–100.
- Soto-Vivas, A., Liria, J. & de Luna, E. 2011. Morfometría geométrica y filogenia en *Rhodniini* (Hemiptera, Reduviidae) de Venezuela. *Acta Zoológica Mexicana* 27 (1): 87–102.
- Srickman, D. 1983. Development of eggs of *Triatoma sordida* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 20 (5): 574.
- Steinwascher, K. 1984. Egg Size Variation in *Aedes aegypti*: Relationship to Body Size and Other Variables. *The American Midland Naturalist* 112 (1): 76-84.
- Strauss, R.E. 2010. Discriminating Groups of Organisms. En: *Morphometrics for Nonmorphometricians*. (Elewa, A., ed.) pp. 73-91. Minia University. Springer. Minia, Egypt.
- Suarez-Davalos, V., Dangles, O., Villacís, A.G., Grijalva, M.J. 2010. Microdistribution of Sylvatic Triatomine Populations in Central-Coastal Ecuador. *Journal of Medical Entomology* 47 (1): 80–88.
- Tolosa, A.C., Germano, M., Cueto, G.M., Vassena, C., Zerba, E., Picollo, M.I. 2008. Differential Patterns of Insecticide Resistance in Eggs and First Instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Argentina and Bolivia. *Journal of Medical Entomology* 45 (3): 421–426.
- Toro, M.V., Manriuez, G. & Suazo, I. 2010. Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: de la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology* 28 (4): 977–990.
- Tucker, J.B. & Meats, M. 1976. Microtubules and control of insect egg shape. *The Journal of Cell Biology* 71: 207–217.
- Tuft, P.H. 1950. The structure of the insect egg-shell in relation to the respiration of the embryo. *Journal of Experimental Biology* 26 (4): 327–334.
- Vargas, E., Espitia, C., Patiño, C., Pinto, N., Aguilera, G., Jaramillo, C., Bargues, M.D., Guhl, F. 2006. Genetic structure of *Triatoma venosa* (Hemiptera: Reduviidae): molecular and morphometric evidence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 39-45.
- Villacís, A.G., Arcos-Teran, L. & Grijalva, M.J. 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.G., Grijalva, M.J. & Catalá, S.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.G., Ocaña-Mayorga, S., Lascano, M.S., Yumiseva, C.A., Baus, E.G., Grijalva, M.J. 2015. Abundance, Natural Infection with Trypanosomes, and Food Source of an Endemic Species of Triatomine, *Panstrongylus howardi* (Neiva 1911), on the Ecuadorian Central Coast. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92 (1): 187–192.
- Viotti, R., Alarcón de Noya, B., Araujo-Jorge, T., Grijalva, M.J., Guhl, F., López, M.C., Ramsey, J.M., Ribeiro, I., Schijman, A.G., Sosa-Estani, S., Torrico, F., Gascón, J. 2014. Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (2): 635–639.
- Visciarelli, E., Ferrero, A.A. & Picollo, M.I. 2001. Caracterización morfológica del desarrollo embrionario de *Triatoma patagonica* Del Ponte 1929 (Hemiptera, Reduviidae). *Entomología y vectores* 8: 449–461.
- Waddington, C.H. 1953. Genetic assimilation for an acquired character. *Evolution* 7: 118–126.
- Went, D. 1978. Oocyte maturation without follicular epithelium alters egg shape in a dipteran insect. *Journal of Experimental Zoology* 205 (1): 149-155.
- Weyn, B., van de Wouwer, G., van Daele, A., Scheunders, P., van Dyck, D., van Marck, E., Jacob, W. 1988. Automated breast tumor diagnosis and grading based on wavelet chromatin texture description. *Cytometry* 33: 32–40.
- Wigglesworth, V.B. 1972. *The Principles of Insect Physiology*. Second Edition. Methuen and Company Limited. Osmania University. Britain-London.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D., Fink, W.L. 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists*. Elsevier Academic Press, New York and London.
- Zheng, M., Zhang, D., Damiens, D., Yamada, H., Gilles, J. 2015. Standard operating procedures for standardized mass rearing of the dengue and chikungunya vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) - I - egg quantification. *Parasit Vectors* 8: 42.

8 FIGURAS

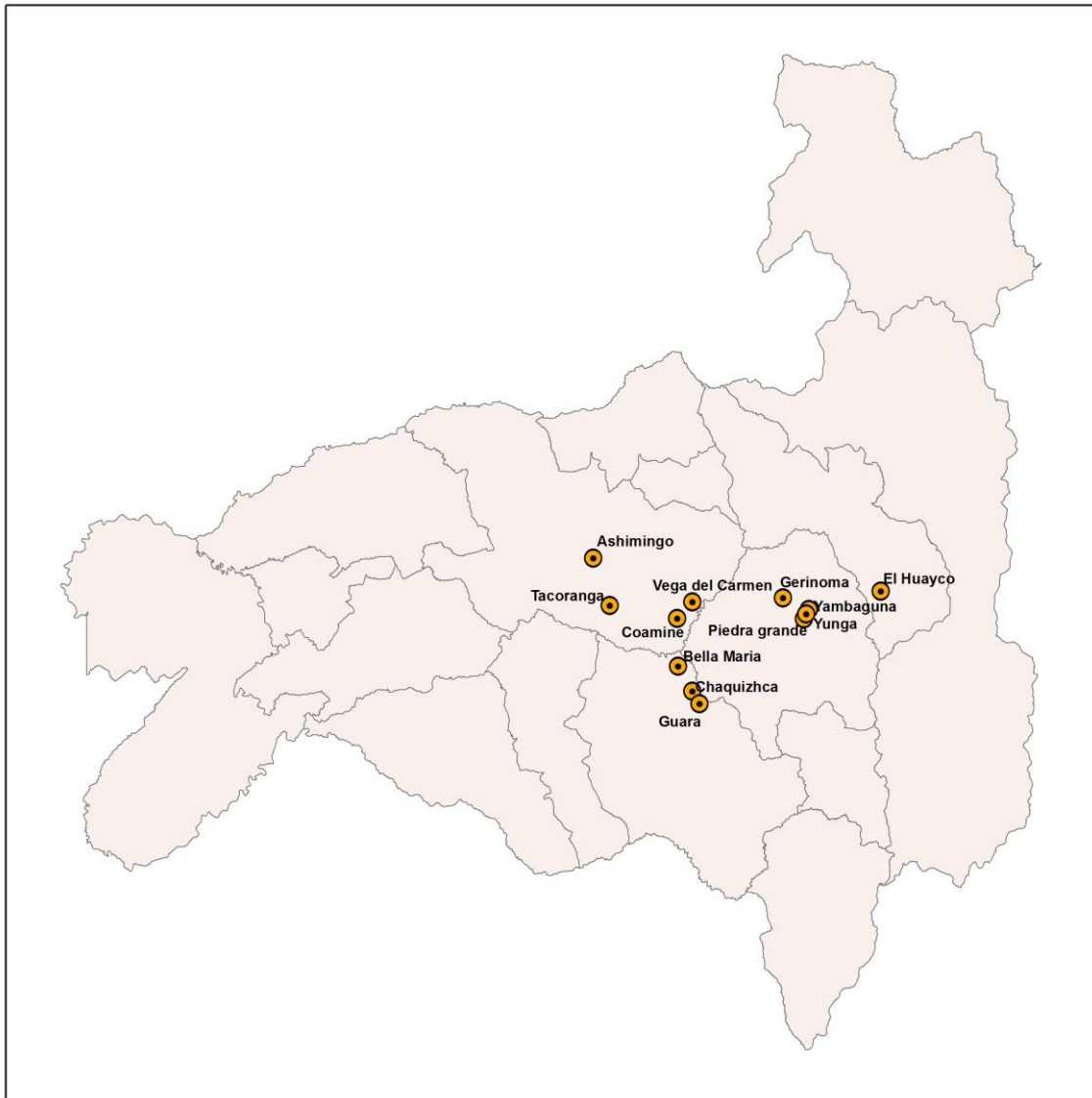


Figura 1. Mapa de la provincia de Loja (Sur-Andina).

Se señalan las 13 comunidades donde se recolectaron los especímenes de *Panstrongylus chinai*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

Mapa: César Yumiseva (CISeAL)

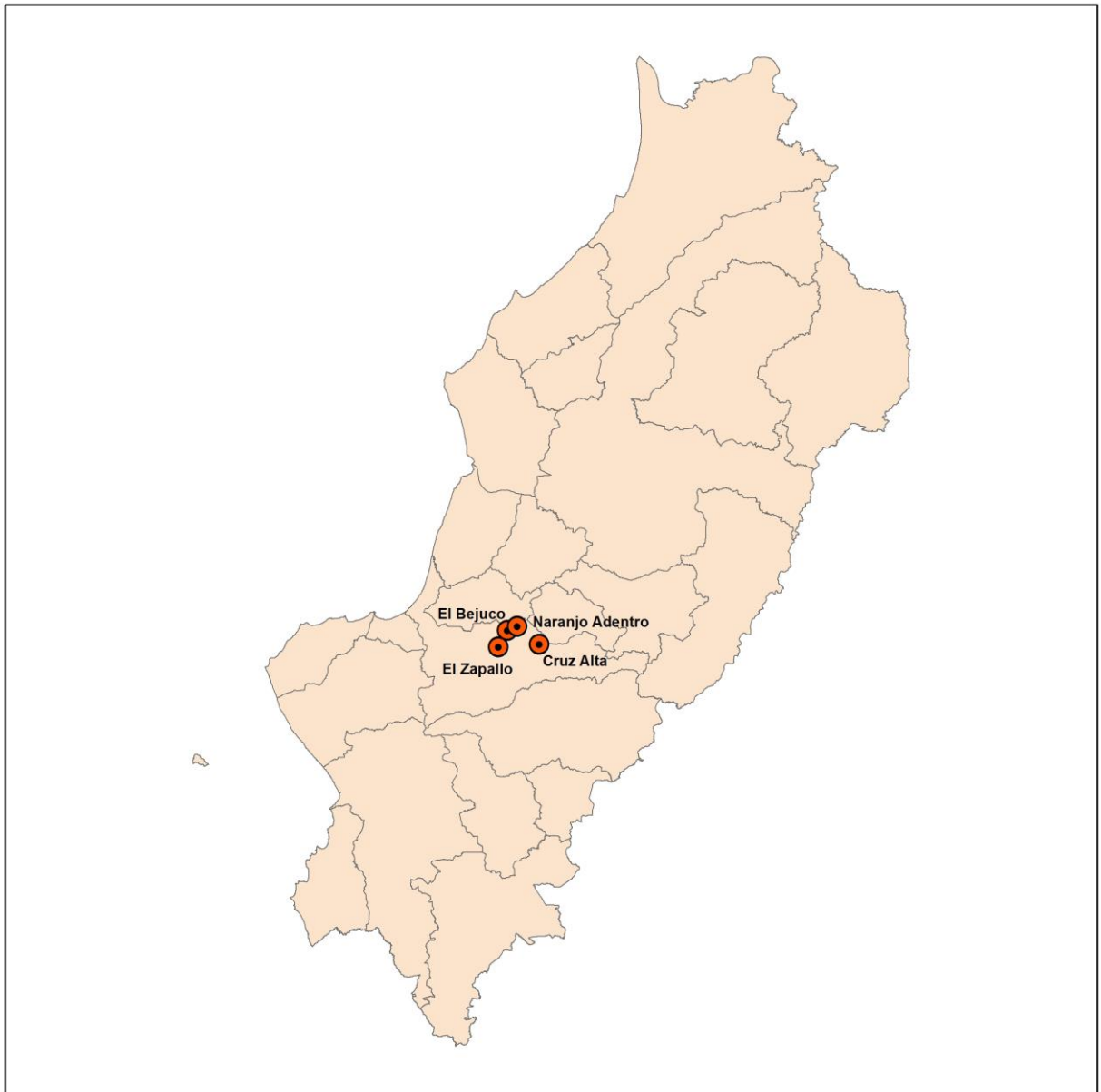


Figura 2. Mapa de la provincia de Manabí (Centro-Costa).

Se señalan las cuatro comunidades en que se recolectaron los individuos de *Panstrongylus howardi* y *Rhodnius ecuadoriensis* usados en este estudio.

Mapa: César Yumiseva (CISeAL)



Figura 3. Recolección de triatominos en ambientes domiciliar, peridomiciliar y silvestre.

(A) Vivienda típica de las comunidades de Loja. (B) Vivienda típica de Manabí. (C) Búsqueda de triatominos en hábitat domiciliar: dormitorio. (D) Búsqueda entomológica en peridomicilio: nidos de gallinas y acumulación de material. (E) Búsqueda en ambiente silvestre: nidos de aves y acumulación de material orgánico de *Phytelphas aequatorialis* (palma de cade o tagua).

Fotos: Archivo CISEAL

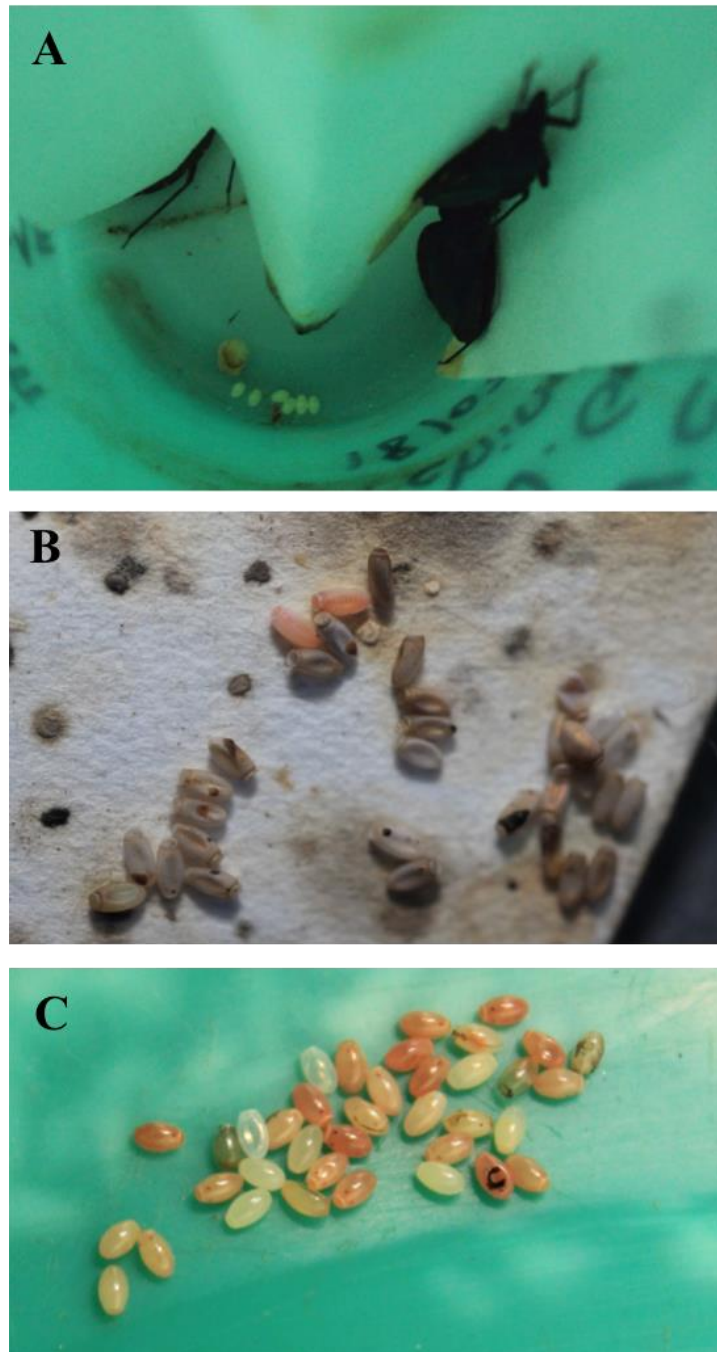


Figura 4. Obtención de huevos.

(A) Huevos de *Panstrongylus chinai*, puestos individualmente en la base del frasco. (B) Huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* pegados al papel filtro. (C) Diversidad de estadios de los huevos de *Triatoma carrioni*, obtenidos de hembras de campo.

Fotos: Santillán-Guayasamín, 2015

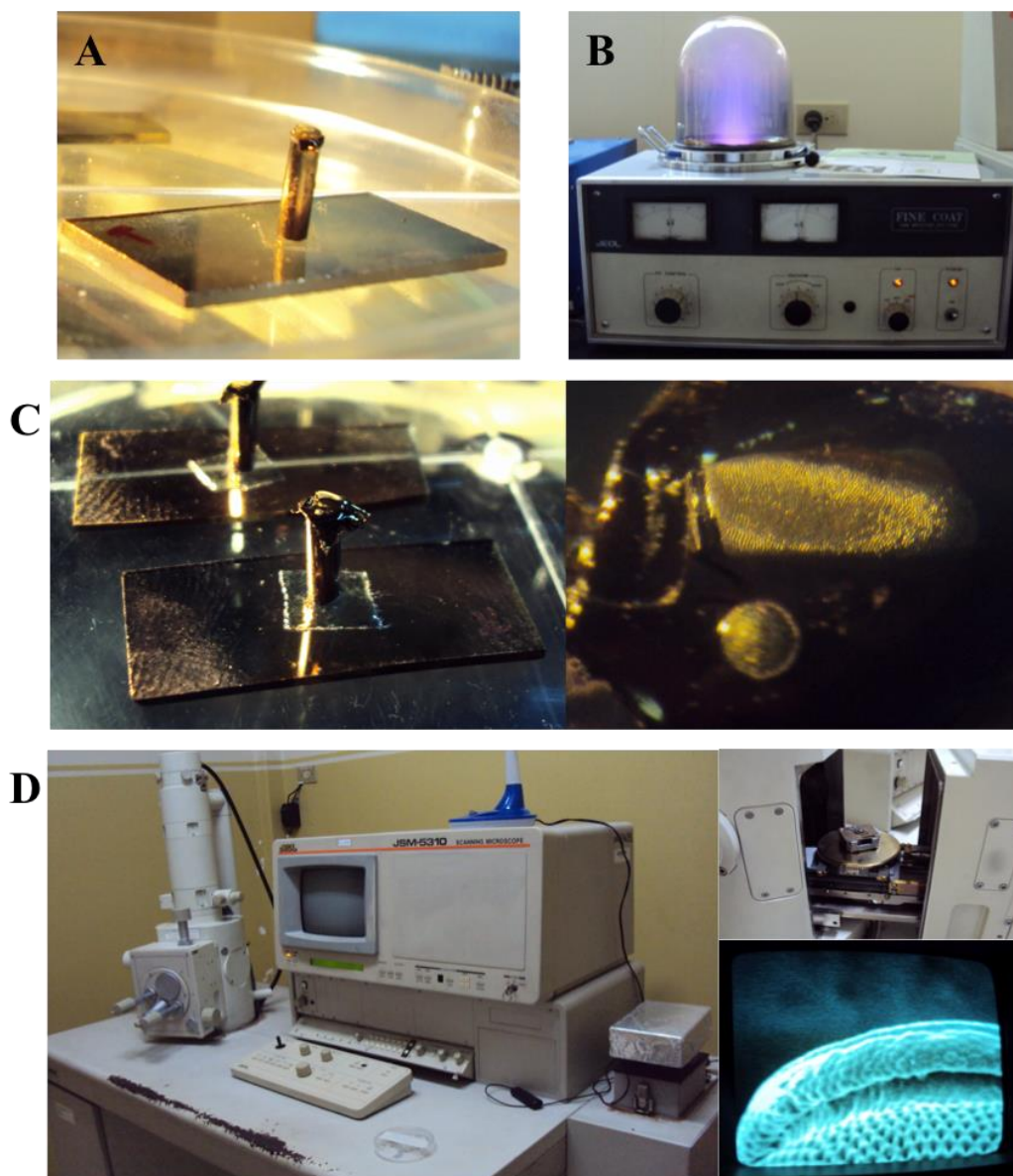


Figura 5. Análisis Exocorial: Microscopía Electrónica de Barrido.

(A) Plataforma de cobre. El huevo fue pegado en la parte superior de la plataforma mediante cinta doble faz. (B) Evaporador de vacío Jeol JFC-1200. Aparato donde los huevos se recubrieron de oro. (C) Huevo de *Rhodnius ecuadoriensis* recubierto de oro y montado en la plataforma de cobre. Acercamiento del huevo a la izquierda de la figura. (D) Microscopio Electrónico de Barrido JEOL® JSM 5310. La muestra se coloca en el brazo de soporte (derecha superior). La imagen se observa en la pantalla del microscopio para enfocar las estructuras de interés (derecha inferior).

Fotos: Santillán-Guayasamín, 2015

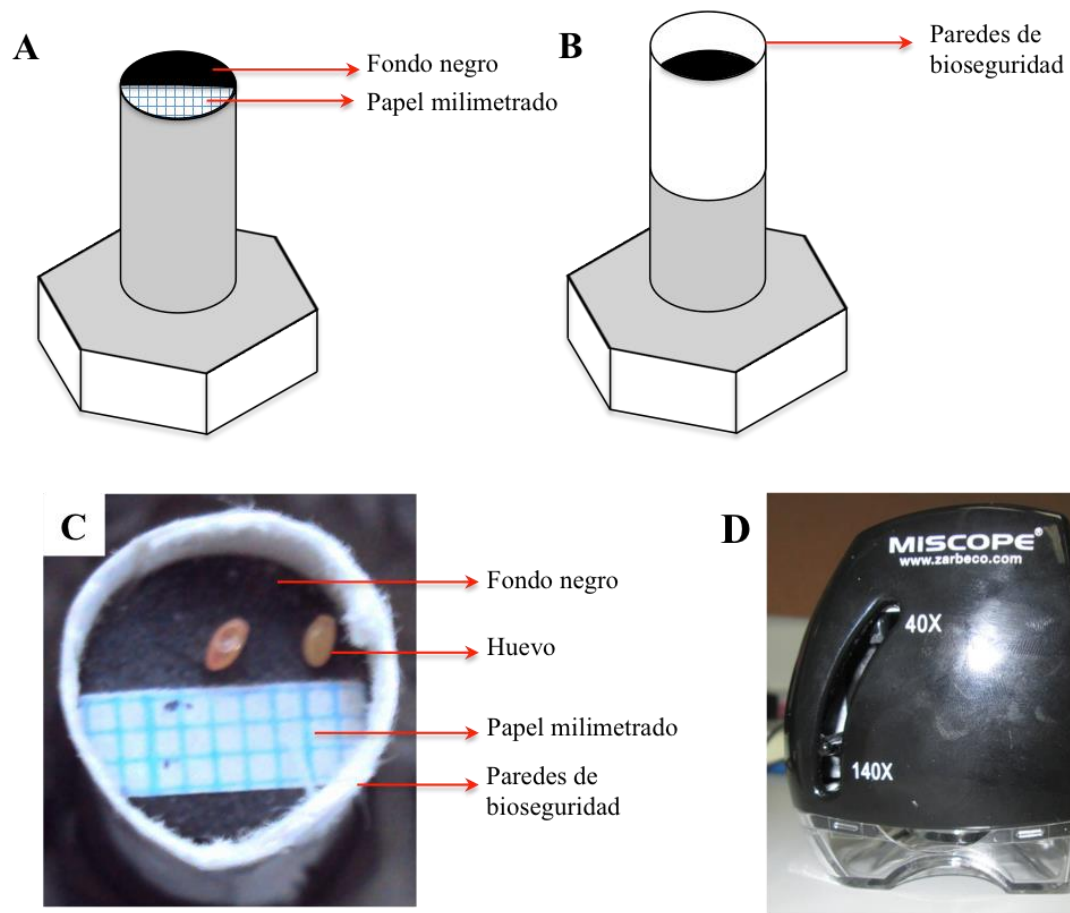


Figura 6. Plataforma para la toma de fotografías de morfometría.

(A) Plataforma. Tuerca con un círculo de cartulina negra y un semicírculo de papel milimetrado en la parte superior. (B) Plataforma con paredes de bioseguridad. Estas fueron construidas con un cilindro de cartulina blanca. (C) Vista superior de la plataforma, se observa dos huevos de *Triatoma carrioni*. (D) Cámara Miscope®-MIP.

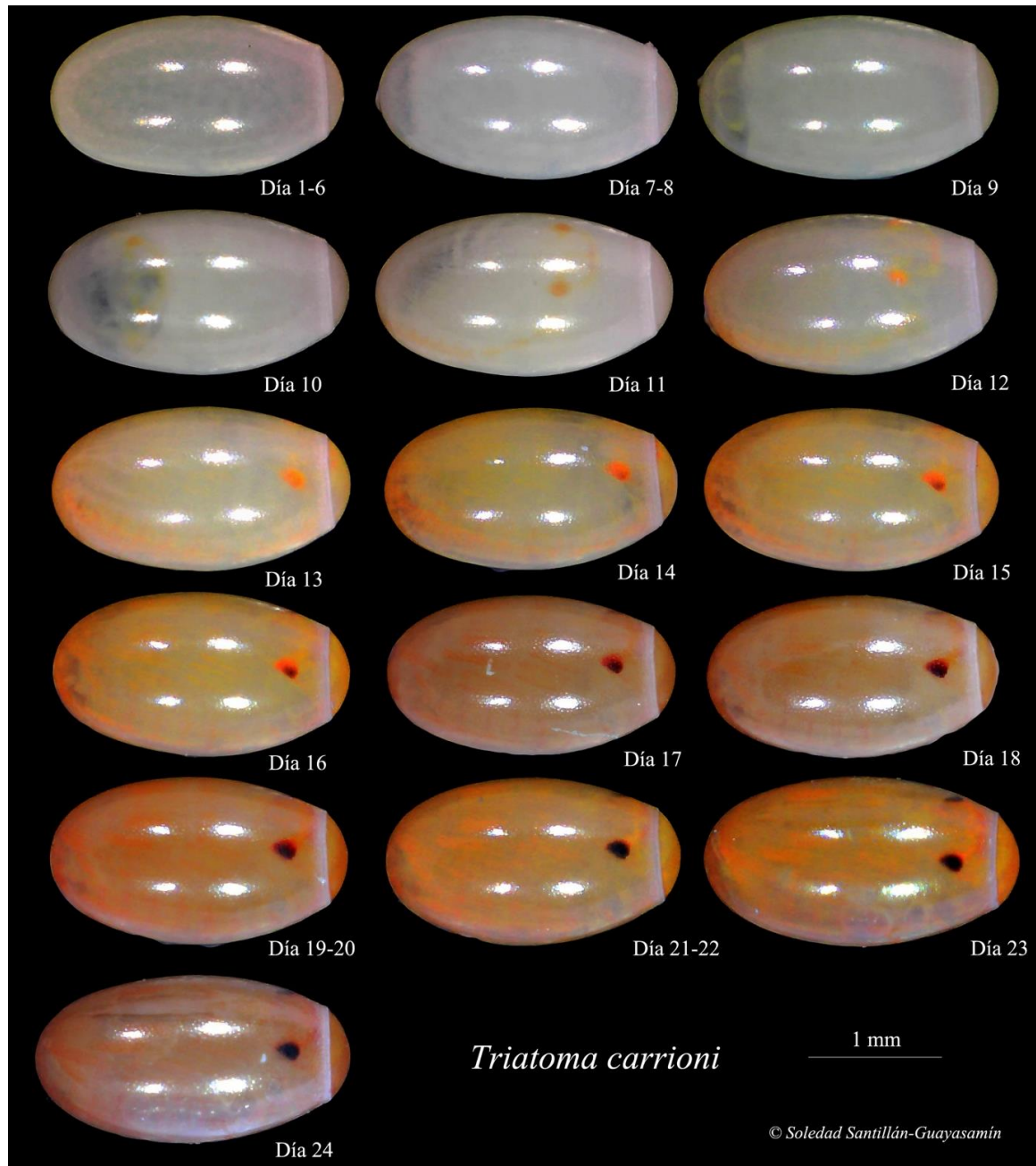


Figura 7. Desarrollo del embrión de *Triatoma carrioni* observado a través del corion.

El huevo cambia de coloración de blanco-crema a café rojizo. Se observa la migración de las manchas oculares a la parte anterior u opercular del huevo. Este proceso ocurre del día 10 al 15. Las manchas oculares cambian de rojo a negro paulatinamente,

Fotos: Santillán-Guayasamín, 2015

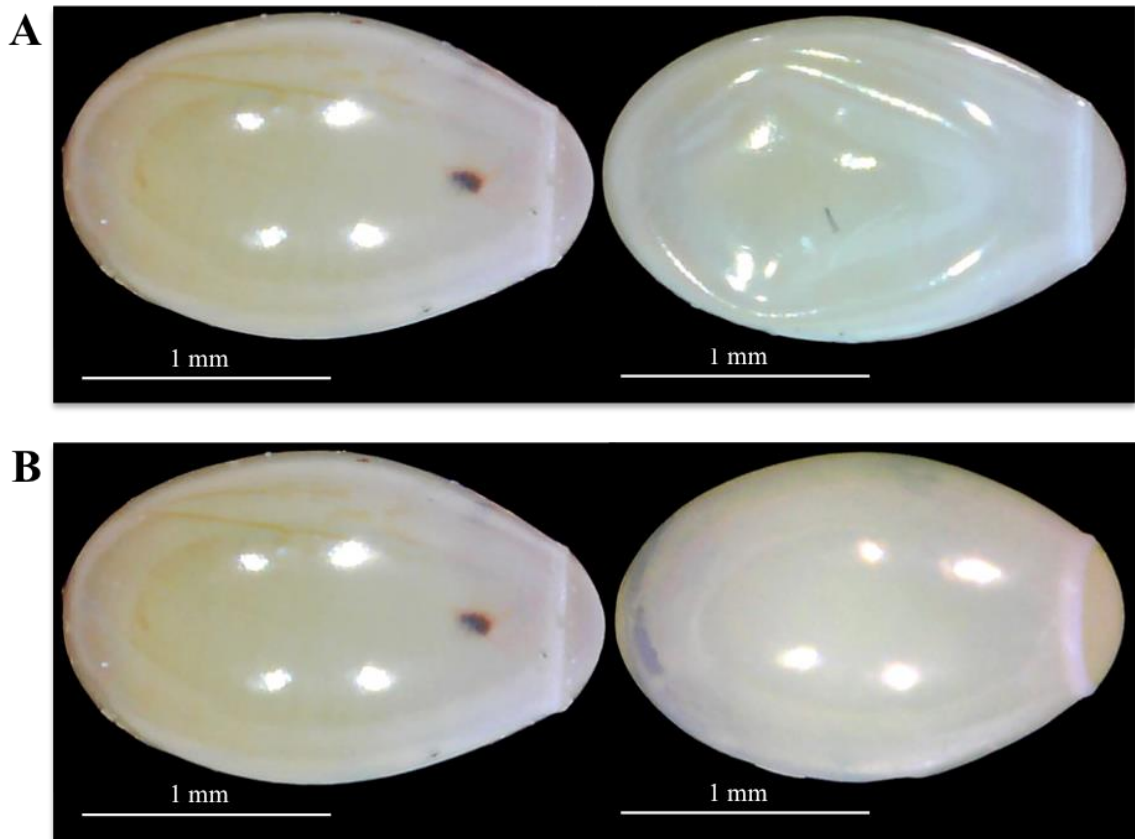


Figura 8. Huevos de *Panstrongylus chinai*: análisis de posición y de estado de viabilidad.

(A) Huevo en posición ventral (izquierda) y posición dorsal (derecha) en el día 25 de su desarrollo. En posición ventral, se observa la cara convexa y las manchas oculares del embrión. En posición dorsal, se observa la cara cóncava debido a la hendidura lateral. (B) Huevos viables (izquierda) y no-viables (derecha) en el día 25 de su desarrollo. Los huevos no-viables carecen de evidencia de desarrollo (manchas oculares).

Fotos: Santillán-Guayasamín, 2015

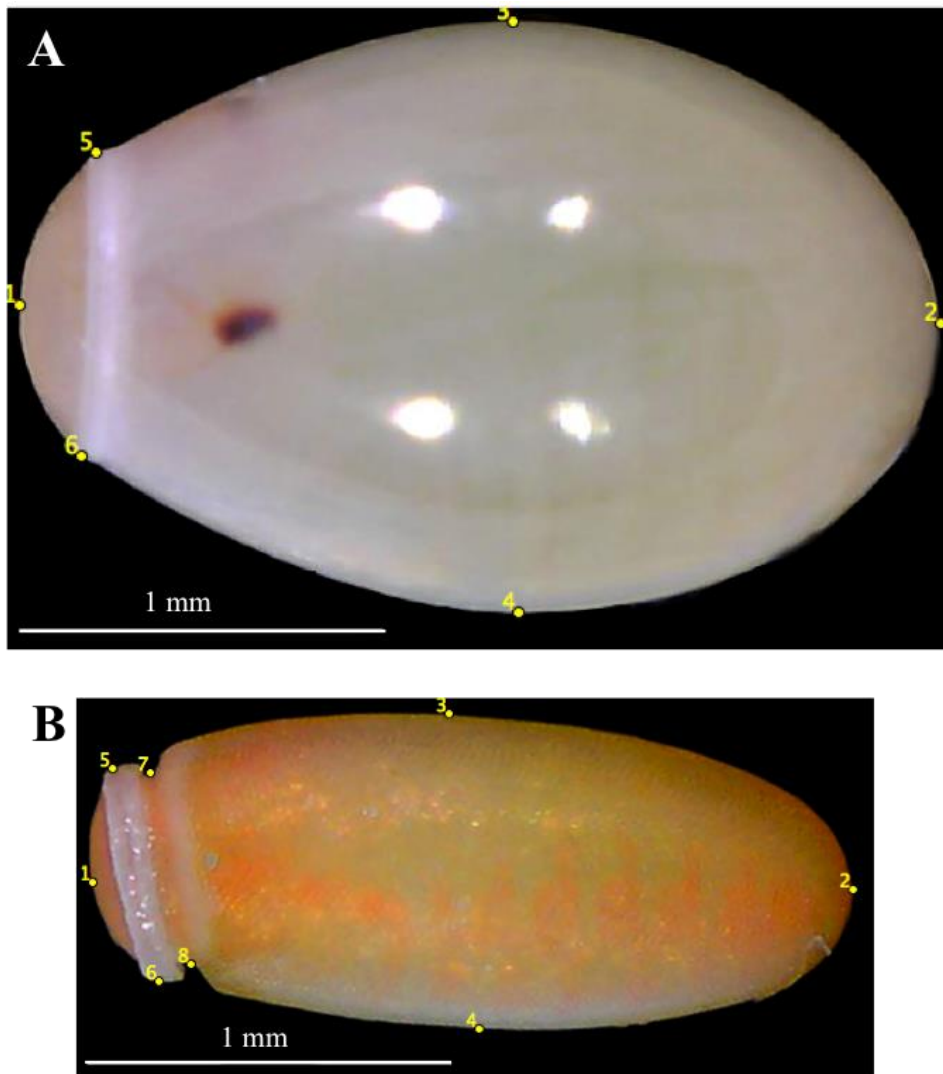


Figura 9. Vista ventral/lateral del huevo de *Panstrongylus chinai* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

(A) Huevo de *Panstrongylus chinai* en posición ventral. (B) Huevo de *Rhodnius ecuadoriensis* en posición lateral. Los puntos amarillos indican los landmarks que se utilizaron para calcular las variables de morfometría tradicional (MT), distancias entre puntos. Las variables fueron:

- LM: Distancia entre punto 1 y 2
- DM: Distancia entre punto 3 y 4
- DO: Distancia entre punto 5 y 6
- DC: Distancia entre punto 7 y 8 (solo para *Rhodnius ecuadoriensis*)

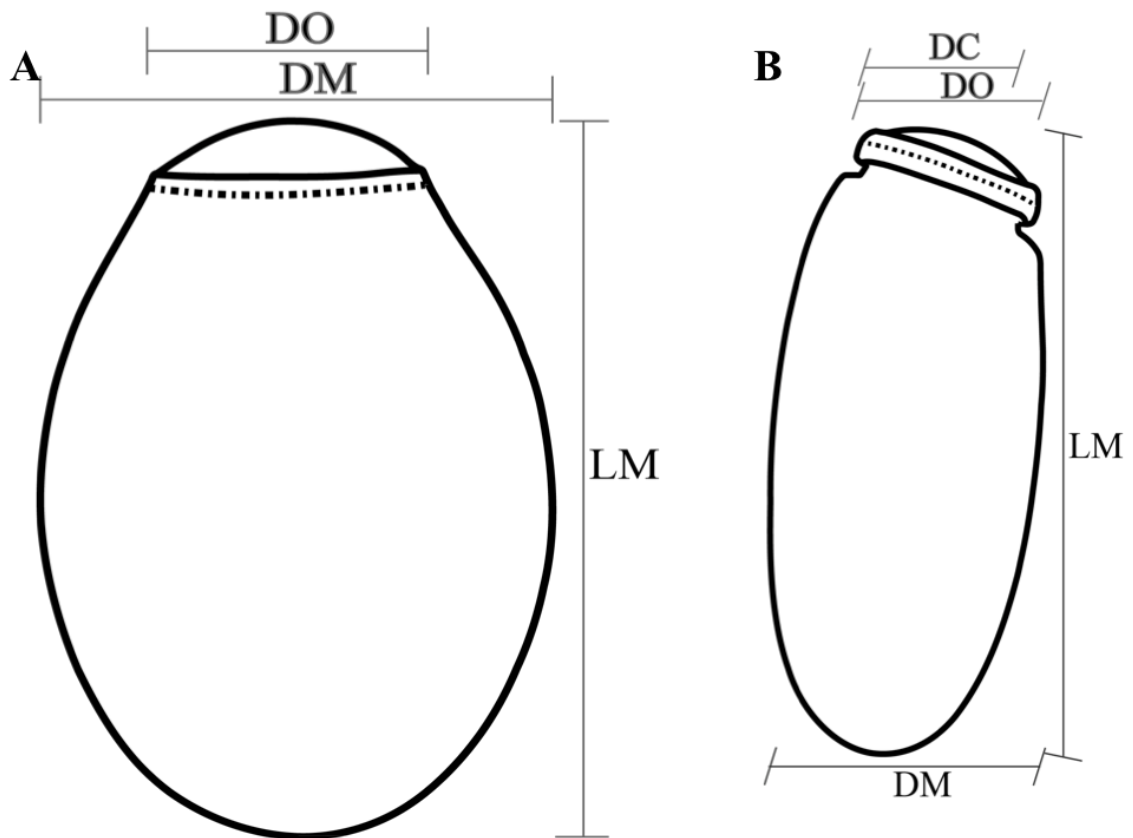


Figura 10. Esquema de variables de morfometría tradicional estudiadas.

(A) Las variables obtenidas de los huevos de la tribu Triatomini (*Panstrongylus* y *Triatoma*) fueron LM, DM y DO. (B) Las variables obtenidas de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* (tribu Rhodniini) fueron LM, DM, DO y DC

LM: Longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo, DC: diámetro del cuello (solo *Rhodnius ecuadoriensis*).

Ilustraciones: Santillán-Guayasamín, 2015

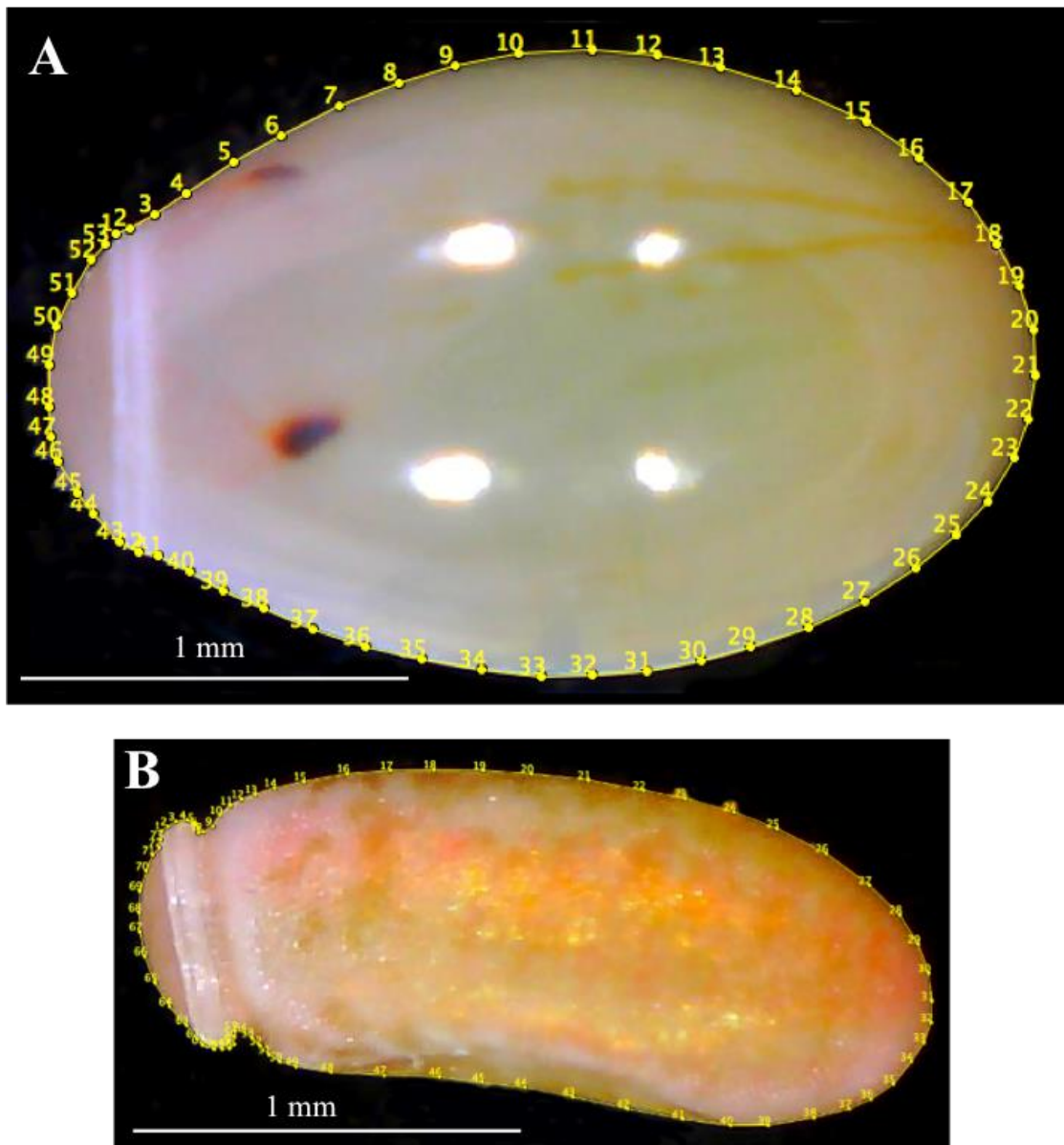


Figura 11. Digitalización de pseudolandmarks en el contorno exterior del huevo.

(A) Huevo de *Panstrongylus chinai* (sin cuello). (B) Huevo de *Rhodnius ecuadoriensis* (con cuello). Los puntos amarillos son los pseudolandmarks digitalizados en el contorno exterior del huevo. Los pseudolandmarks fueron analizados mediante el análisis Elíptico de Fourier. Este análisis permite digitalizar distinto número de puntos entre individuos y puntos no equidistantes.

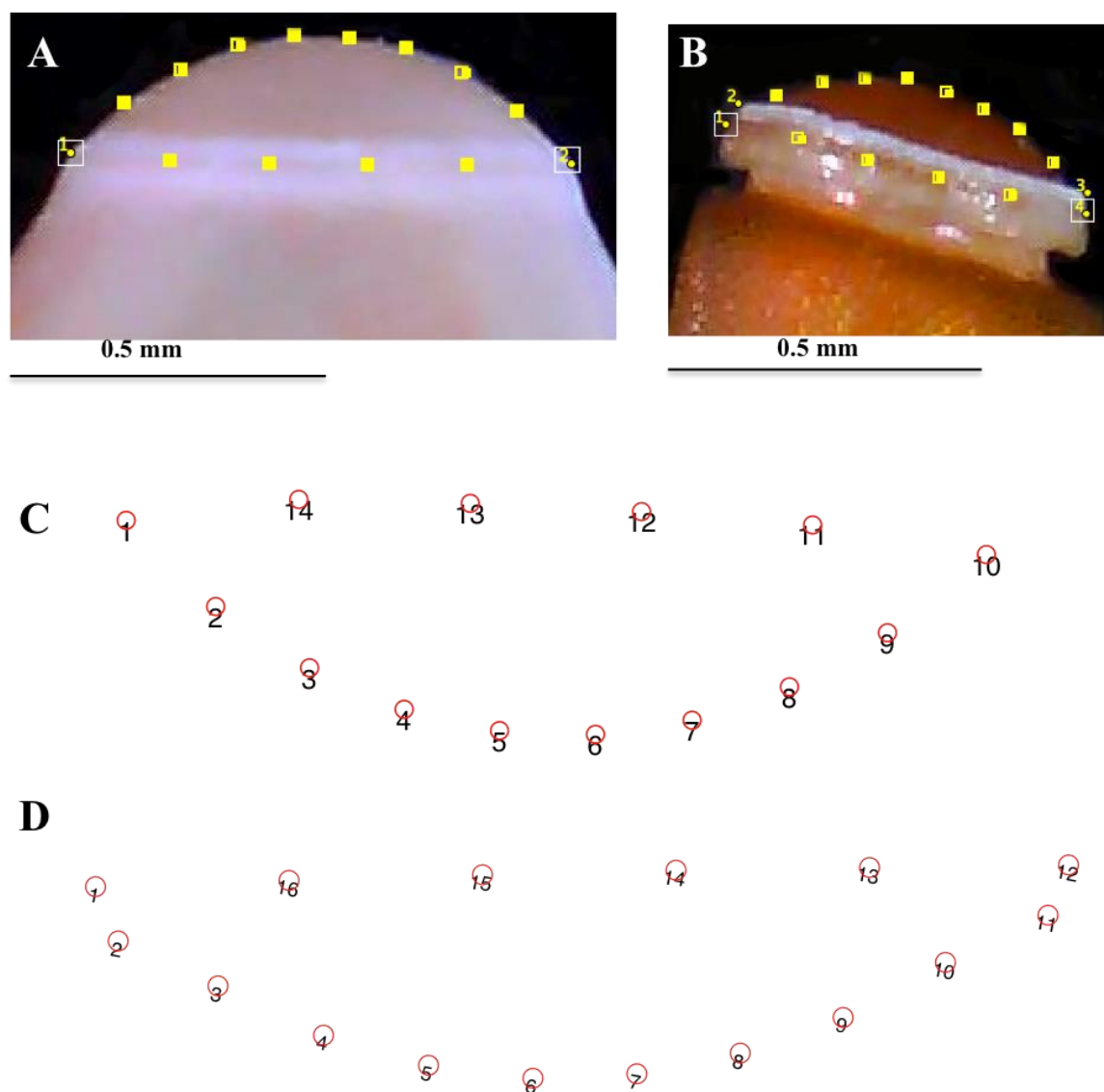


Figura 12. Digitalización de landmarks/semilandmarks en los opérculos.

(A) Digitalización para los huevos de la tribu Triatomini. La configuración fue {1 8} {2 4}, dos landmarks y doce semilandmarks. (B) Digitalización para los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis*. La configuración fue {2 8} {4 4}, cuatro landmarks y doce semilandmarks. (C) Esquema de digitalización del opérculo de los huevos de la tribu Triatomini. Los puntos 1 y 10 son landmarks. (D) Esquema de digitalización del opérculo de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis*. Los puntos 1, 2, 11 y 12 son landmarks.

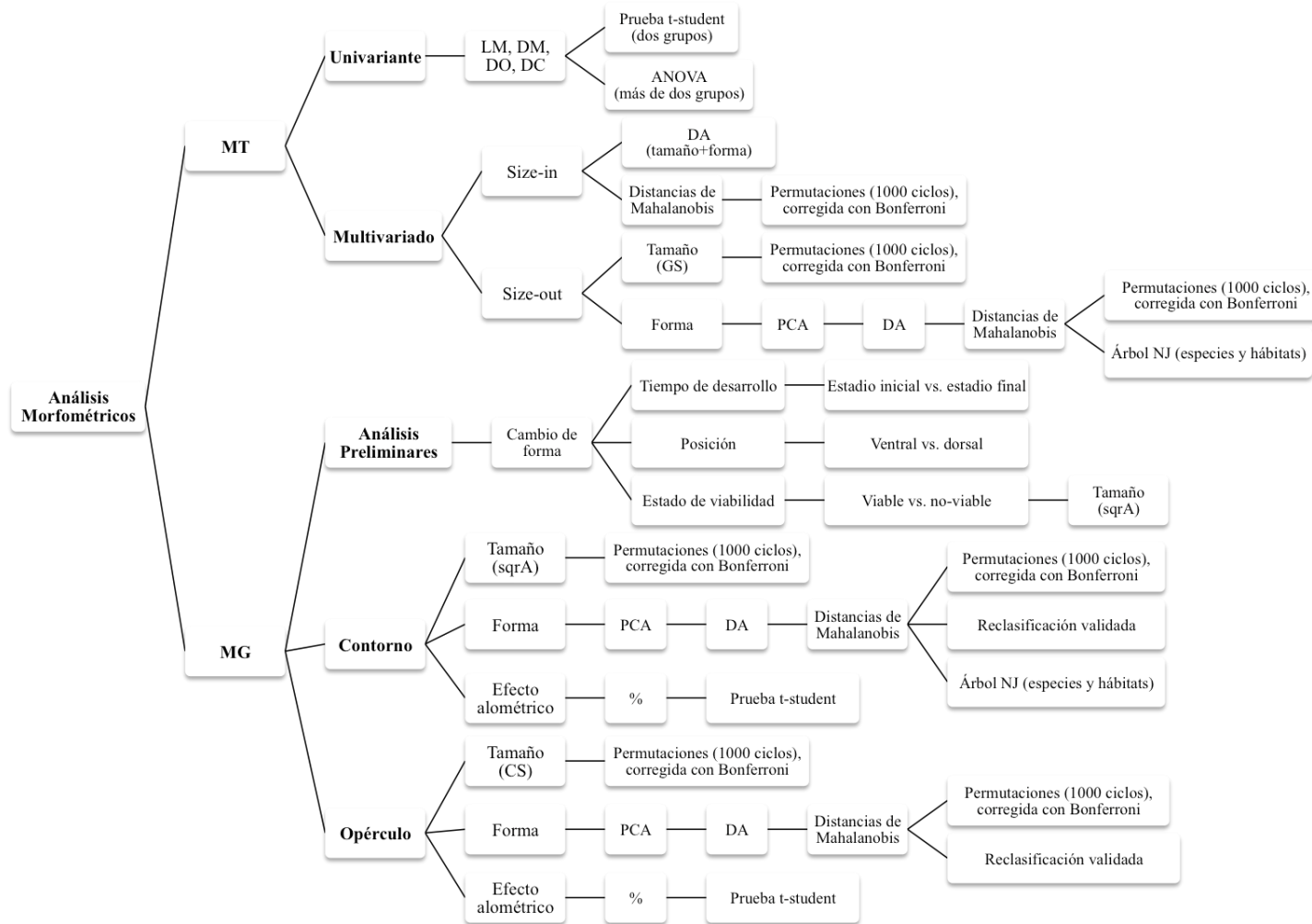


Figura 13. Diagrama de análisis morfométricos realizados.

Se detalla los análisis estadísticos utilizados para cada técnica y comparación

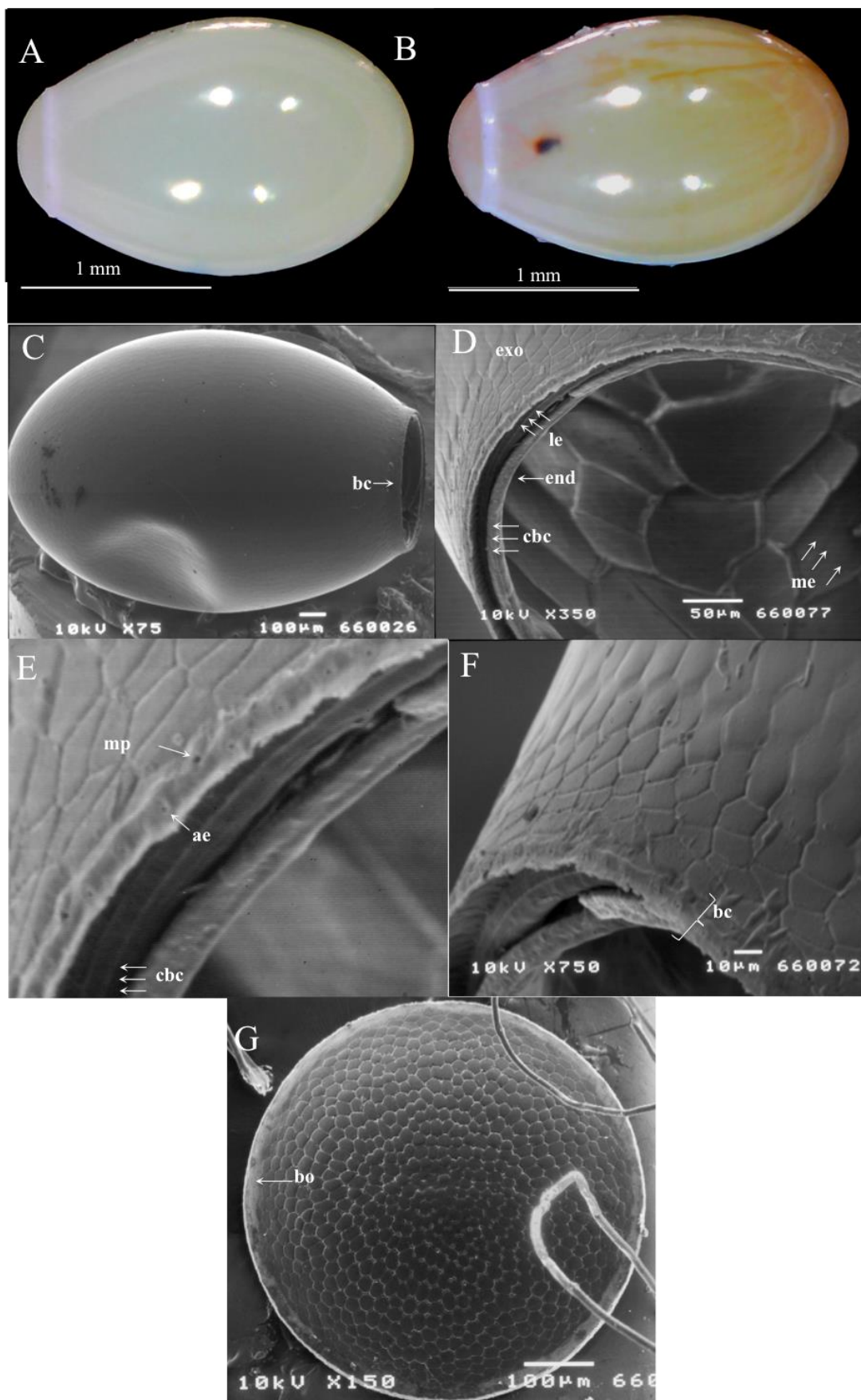


Figura 14. Micrografía del huevo de *Panstrongylus chinai*.

(A) Huevo en el primer día de desarrollo, presenta coloración blanco-crema. (B) Huevo en el día 28 de desarrollo, presenta coloración café-rojizo. (C) Aspecto general del huevo. Micrografía de individuo eclosionado. (D) Vista frontal del borde corial. Se observa el endocorion. (E) Acercamiento al borde corial. Se identifican aerópilos y micrópilos. (F) Patrones geométricos de las células del exocorion. (G) Vista frontal del opérculo. Se observan los patrones geométricos que esta estructura presenta. (C-G) Fotografías de microscopía de barrido. **ae**: aerópilo; **bc**: borde corial; **bo**: borde opercular; **cbc**: canal del borde corial entre endocorion y exocorion; **end**: endocorion; **exo**: exocorion; **le**: línea de eclosión; **me**: membrana endocorial; **mp**: micrópilo.

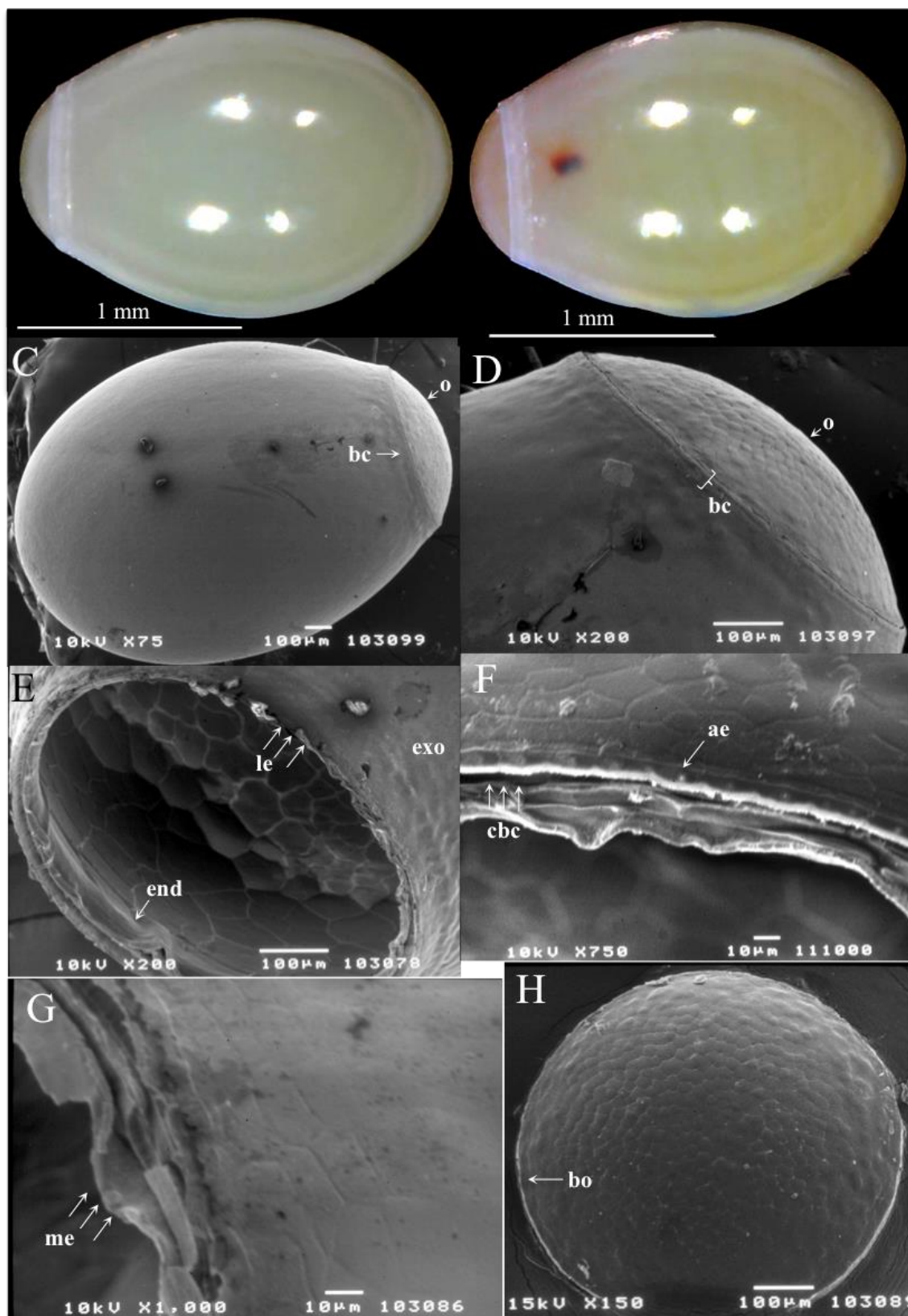


Figura 15. Micrografía del huevo de *Panstrongylus howardi*.

(A) Huevo en el primer día de desarrollo, presenta coloración blanco-crema. (B) Huevo en el día 25 de desarrollo, presenta coloración café. (C) Aspecto general del huevo. Micrografía

de individuo no-viable. (D) Vista lateral del borde corial y opérculo. Se observa la barra de sellado. (E) Vista frontal del borde corial. Se observa el endocorion. (F) Acercamiento al borde corial. Se identifican aerópilos. (G) Patrones geométricos de las células del exocorion. (H) Vista frontal del opérculo. Se observan los patrones geométricos que esta estructura presenta. (C-G) Fotografías de microscopía de barrido. **ae**: aerópilo; **bc**: borde corial; **bo**: borde opercular; **cbc**: canal del borde corial entre endocorion y exocorion; **end**: endocorion; **exo**: exocorion; **le**: línea de eclosión; **me**: membrana endocorial; **o**: opérculo.

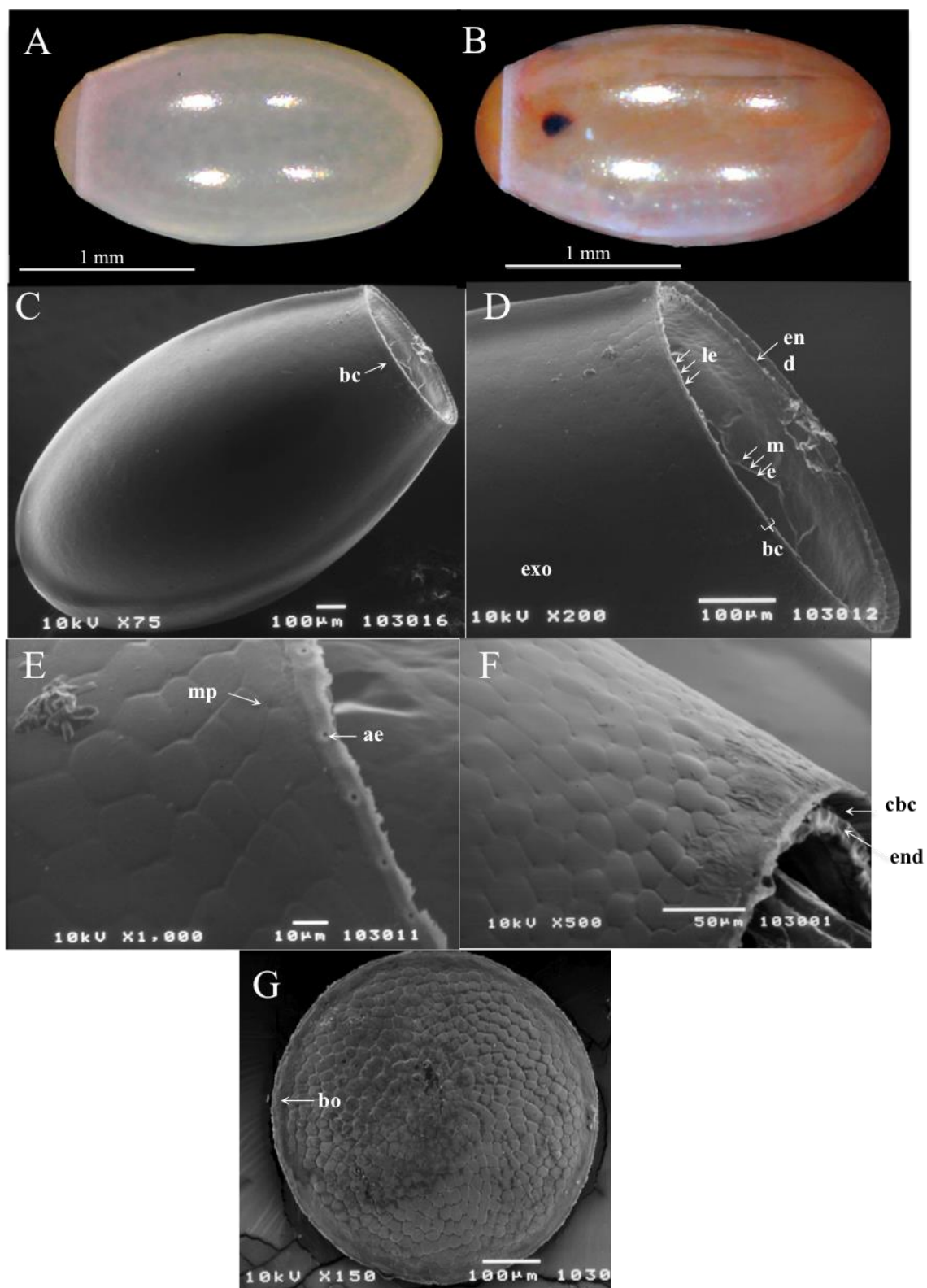


Figura 16. Micrografía del huevo de *Triatoma carrioni*.

(A) Huevo en el primer día de desarrollo, presenta coloración blanco-crema. (B) Huevo en el día 24 de desarrollo, presenta coloración rojo-intenso. (C) Aspecto general del huevo. Micrografía de individuo eclosionado. (D) Vista lateral del borde corial. (E) Acercamiento

al borde corial. Se identifican aerópilos y micrópilos. (F) Patrones geométricos de las células del exocorion. (G) Vista frontal del opérculo. Se observan los patrones geométricos que esta estructura presenta. (C-G) Fotografías de microscopía de barrido. **ae**: aerópilo; **bc**: borde corial; **bo**: borde opercular; **cbc**: canal del borde corial entre endocorion y exocorion; **end**: endocorion; **exo**: exocorion; **le**: línea de eclosión; **me**: membrana endocorial; **mp**: micrópilo.

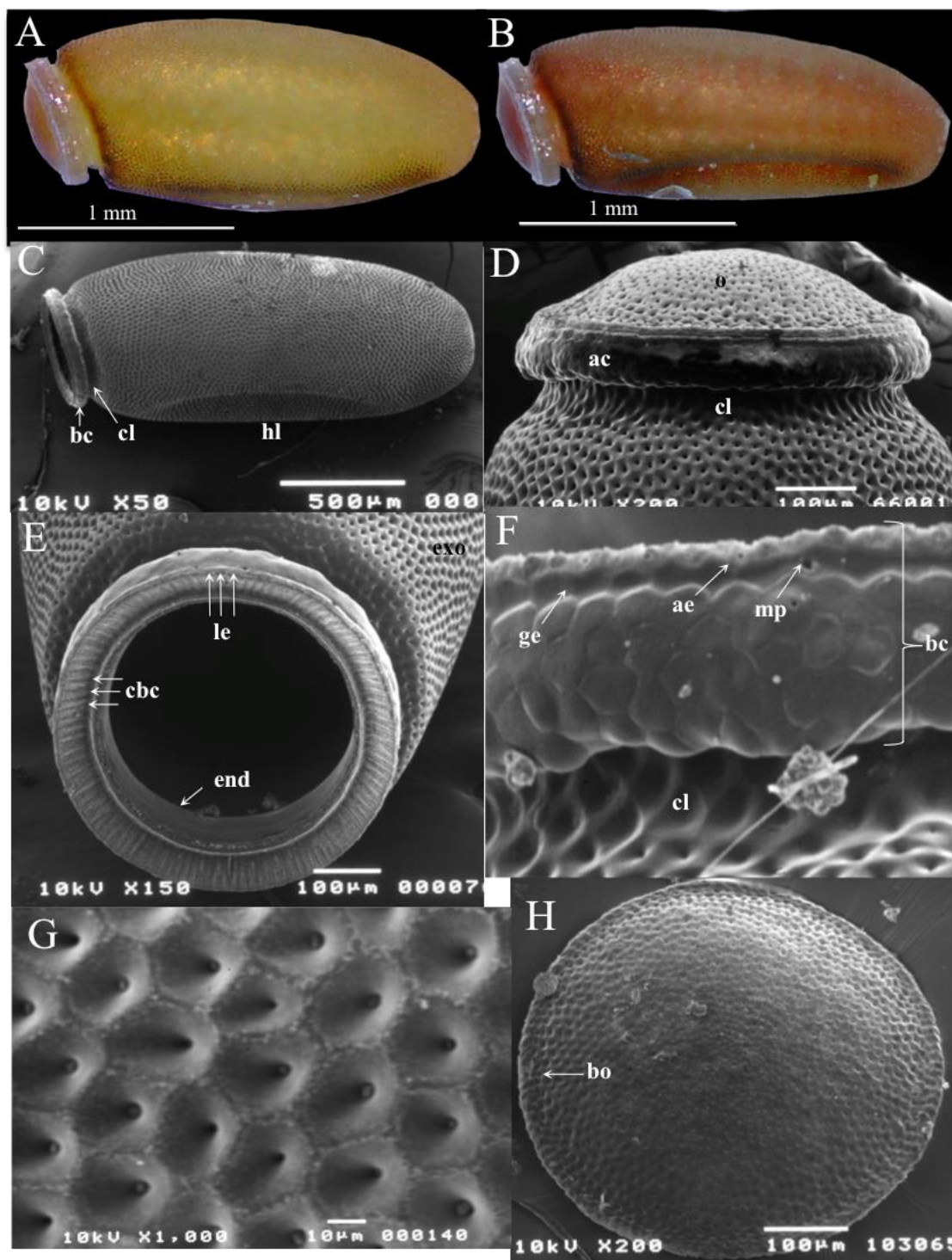


Figura 17. Micrografías del huevo de *Rhodnius ecuadoriensis*.

(A) Huevo en el primer día de desarrollo, presenta coloración blanco-crema con partes cafés. (B) Huevo en el día 11 de desarrollo, presenta coloración café-rojiza brillante. (C) Aspecto general del huevo. Micrografía de individuo eclosionado. (D) Vista lateral del borde corial y opérculo. Micrografía de individuo no-viable. Se observa la barra de sellado. (E) Vista frontal del borde corial, se observa el endocorion. (F) Acercamiento al borde corial, se

identifican aerópilos y micrópilos. (G) Patrones geométricos de las células del exocorion. Se observan los tubos/pozos foliculares. (H) Vista frontal del opérculo. Se observan los patrones geométricos que esta estructura presenta. (C-H) Fotografías de microscopía de barrido. **ae**: aerópilo; **bc**: borde corial; **bo**: borde opercular; **cbc**: canal del borde corial entre endocorion y exocorion; **cl**: cuello; **end**: endocorion; **exo**: exocorion; **ge**: gotera espermática; **hl**: hendidura lateral; **le**: línea de eclosión; **mc**: micrópilo; **o**: opérculo.

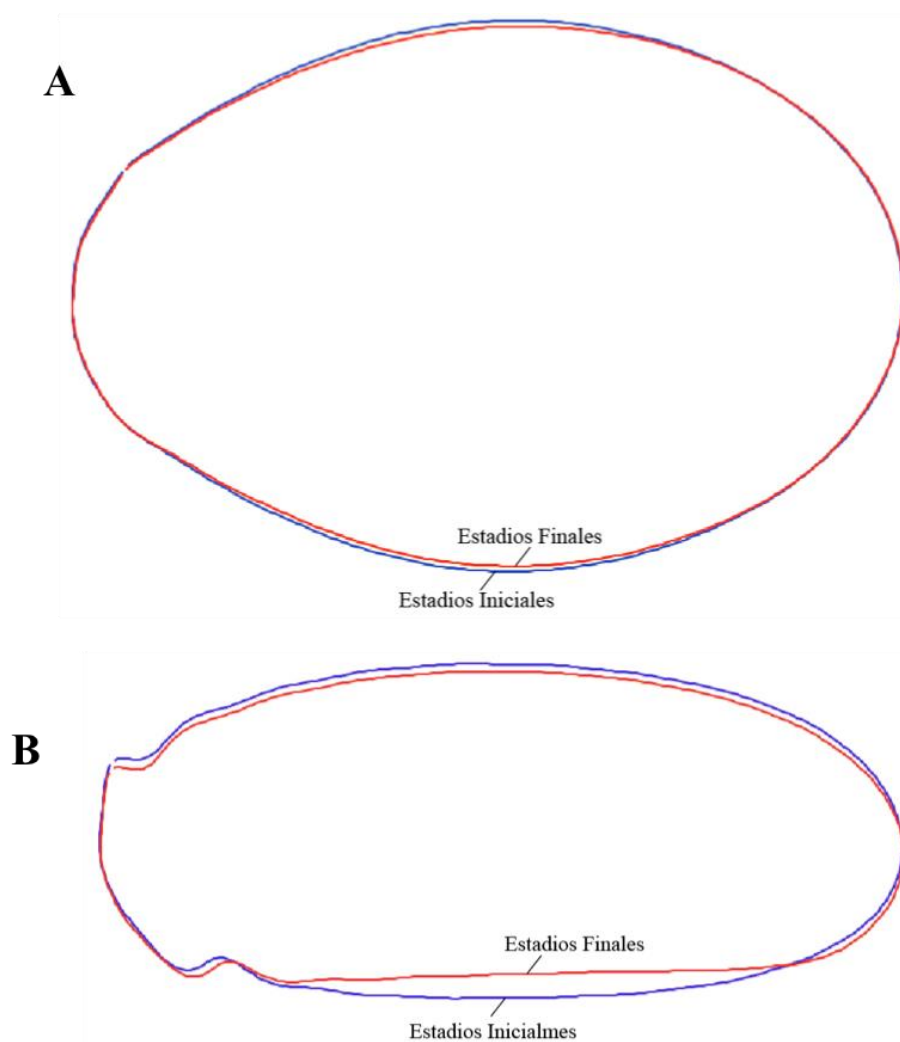


Figura 18. Diferencia de la forma del contorno de los huevos según el tiempo de desarrollo (estadio inicial y estadio final).

(A) Huevo de *Panstrongylus chinai*. Los estadios iniciales fueron considerados desde el día de puesta (día 1) hasta el día 15 de su desarrollo. Esto se relaciona con la coloración del huevo (Figura 16). El poder de captura de la forma del huevo fue del 0.9971 (14 armónicas). El número de armónicas determinan el grado de fidelidad de la forma extraída, es decir en este análisis se recreó la forma del huevo en un 99.71%. (B) Huevo de *Rhodnius ecuadoriensis*. Se utilizó el mismo criterio de separación de estadios. Los estadios iniciales fueron del día 1 al 10. La forma fue representada por 13 armónicas, que corresponde a 0.9908 de poder. En ambas especies, los huevos de estadios iniciales tienen mayor grosor que los de estadios finales.

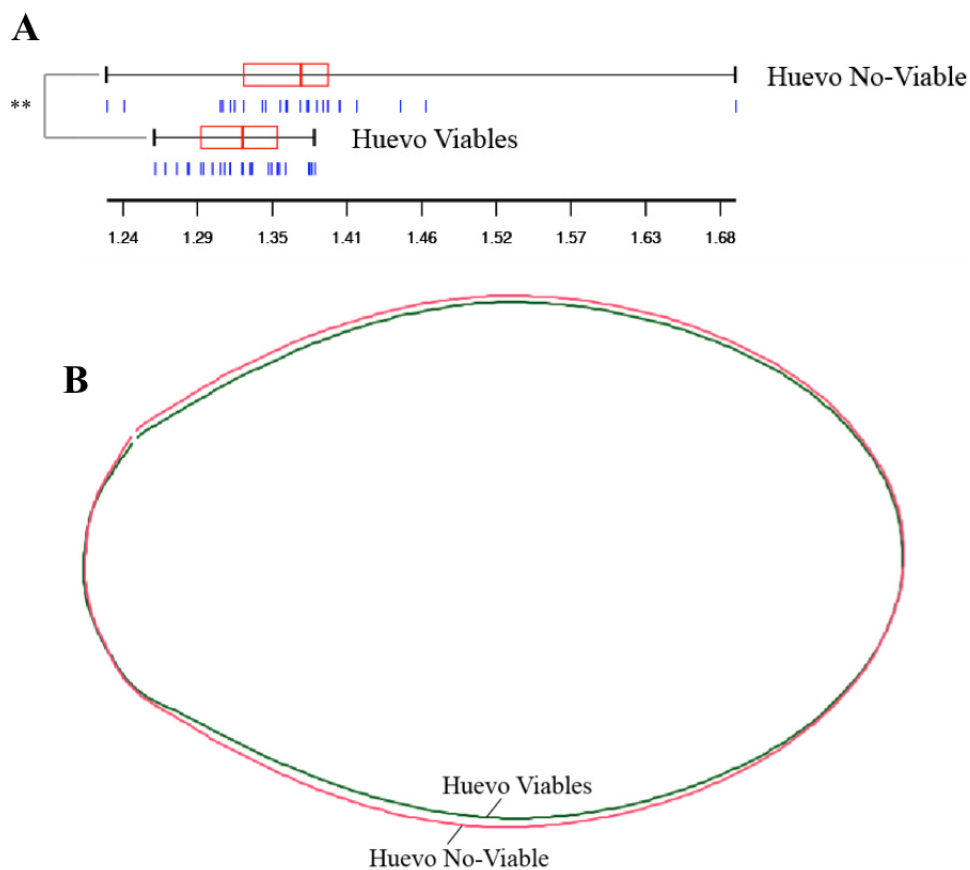


Figura 19. Análisis de la diferencia de tamaño y forma de los huevos de *Panstrongylus chinai* según el estado de viabilidad (viables y no-viables).

(A) Variación de la raíz cuadrado de la superficie de los huevos. La línea roja que divide la caja, representa la mediana y los extremos los cuartiles 25% y 75%. Las líneas azules verticales representan los individuos incluidos en el análisis. Se observa la diversidad de tamaños que estos presentan en el rango de cada especie. Los valores máximos y mínimos, se indica con las líneas negras verticales. La escala está en milímetros. En la parte izquierda del gráfico se indica la significación (**) entre los grupos. (B) Diferencia de la forma del contorno de los huevos. Se observa que los huevos viables son más angostos. La forma fue representada por 13 armónicas, que corresponde a 0.9962 de poder.

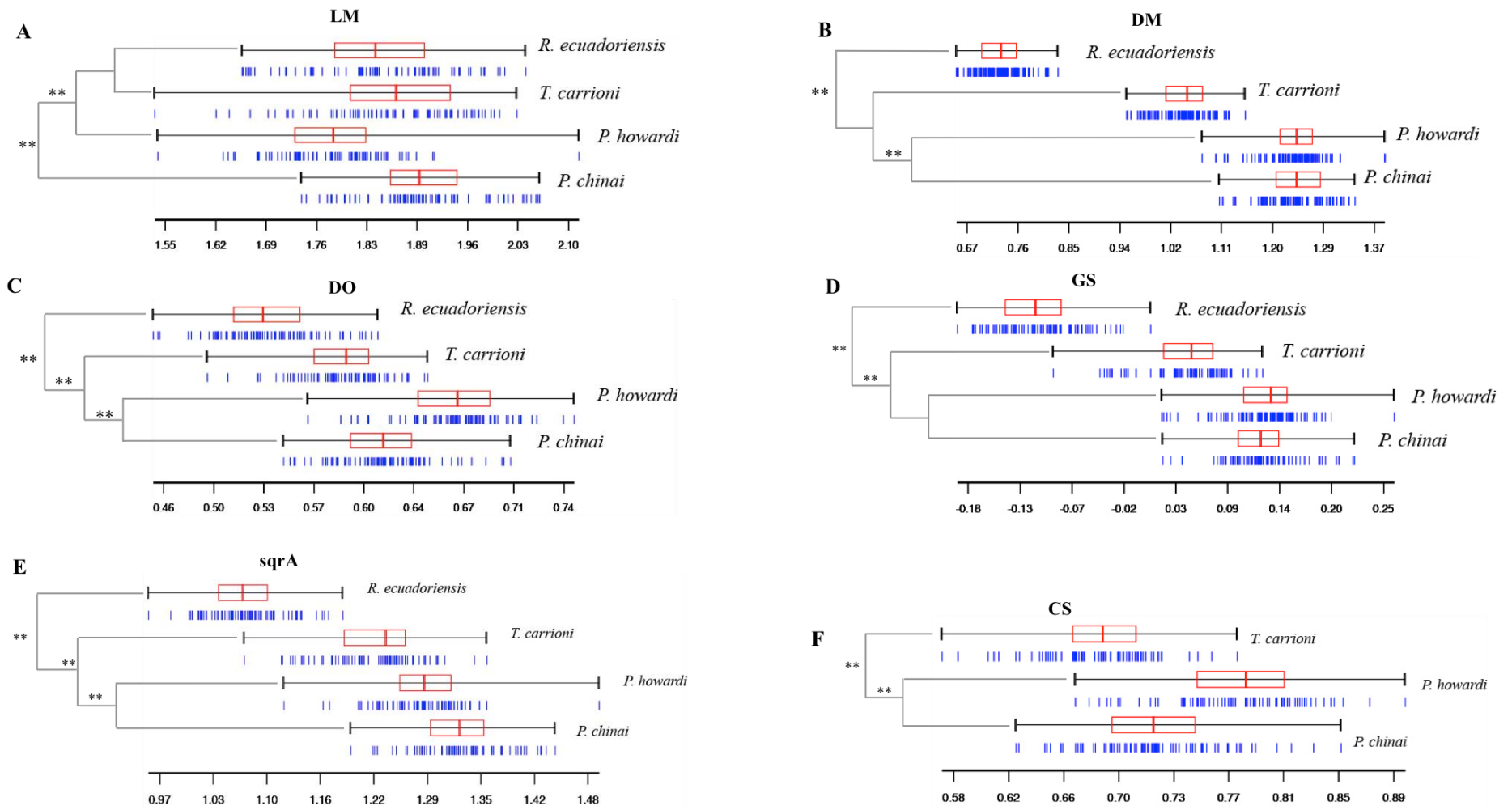


Figura 20. Variación interespecífica del tamaño de los huevos.

(A) Variación de la longitud máxima (LM) de los huevo de *Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*. (B) Variación del diámetro máximo (DM) de los huevos de *P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis*. (C) Variación del diámetro del opérculo (DO) de los huevos de *P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis*. (D) Variación del tamaño global (GS) obtenido del análisis “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevo de *P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis*. (E) Variación de la raíz cuadrada de la superficie (sqrA) de los huevo de *P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis*. (F) Variación del tamaño centroide (CS) de los opérculos de los huevos de *P. chinai*, *P. howardi* y *T. carrioni*. El opérculo de *R. ecuadoriensis* no se incluye en el análisis, debido a que no se encontraron puntos homogéneos en la parte opercular de los huevos de la tribu Triatomini (sin cuello) y Rhodniini (con cuello). La escala está en milímetros. En la parte izquierda de cada gráfico se indica la significación (**) entre los grupos. La significación de las variables LM, DM y DO se determinó mediante el ANOVA. La significación de GS, sqrA y CS se determinó mediante la prueba no-paramétrica (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

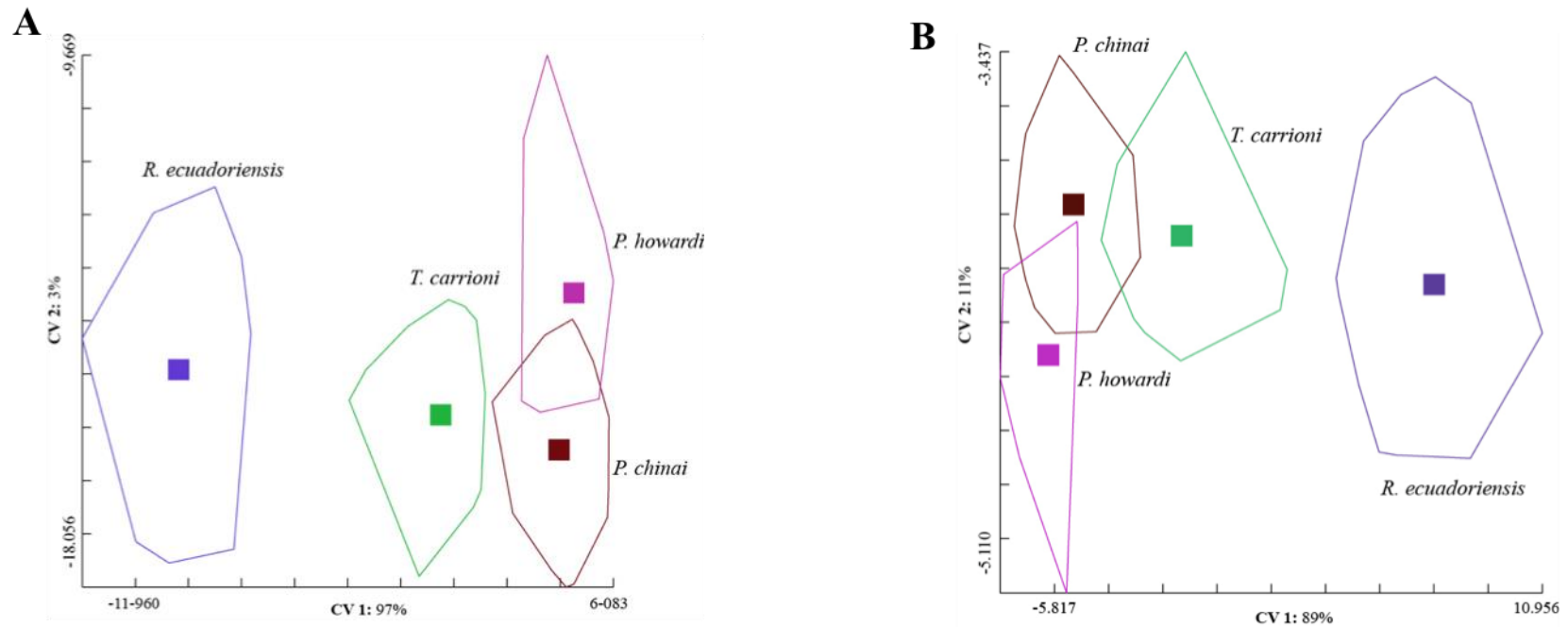


Figura 21. Variación interespecífica de los huevos mediante análisis de morfometría tradicional “size-in” y “size-out”.

(A) Análisis discriminante “size-in” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*. En los ejes se indica el porcentaje de contribución a la de variación total que cada uno presenta. El cuadrado de cada polígono representa el centroide de la distribución de cada grupo. (B) Análisis discriminante “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevos de *P. chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni* y *R. ecuadoriensis*.

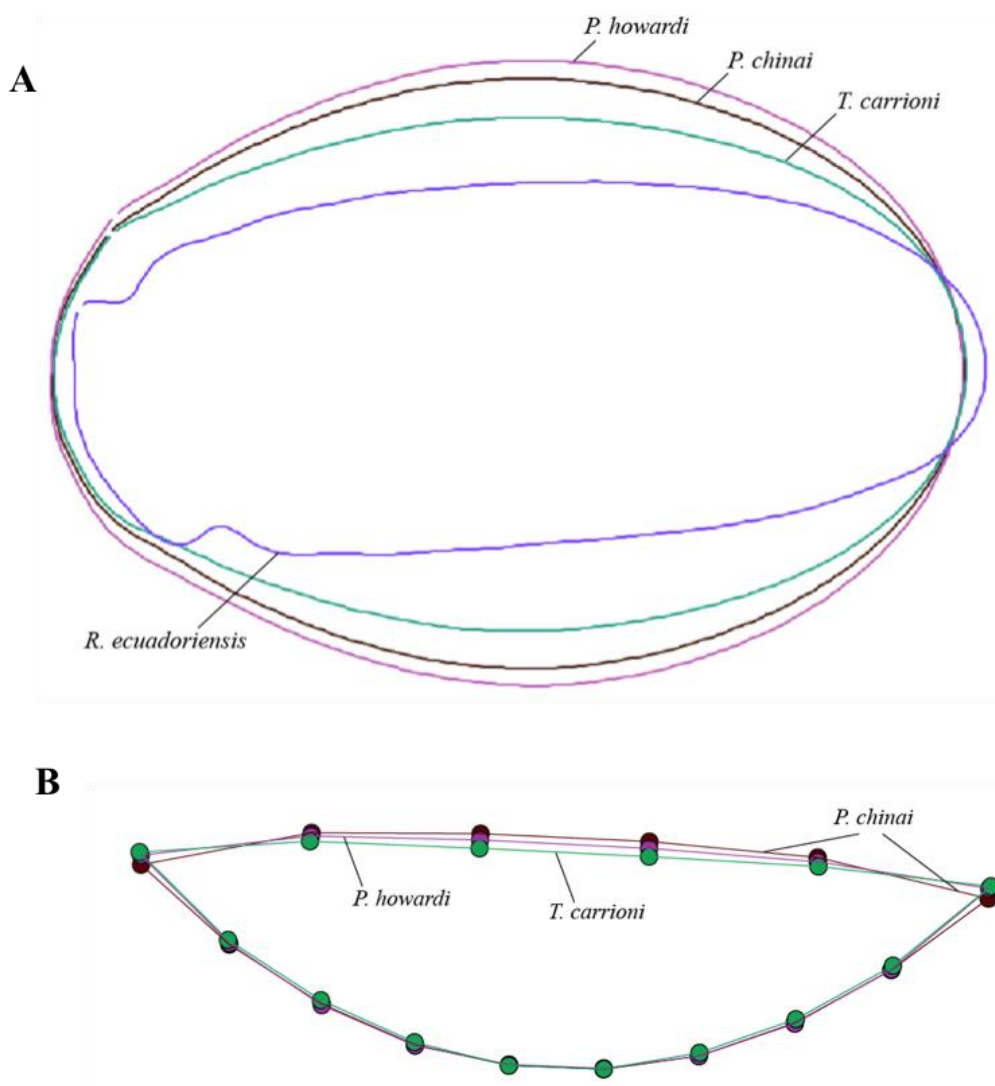


Figura 22. Diferencia de la conformación del huevo y del opérculo a nivel interespecífico.

(A) Forma de los contornos de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*. La forma fue representada por 20 armónicas, cuyo poder es del 0.9985. (B) Forma de los opérculos de los huevos de las especies de la tribu Triatomini (*P. chinai*, *P. howardi* y *T. carrioni*).

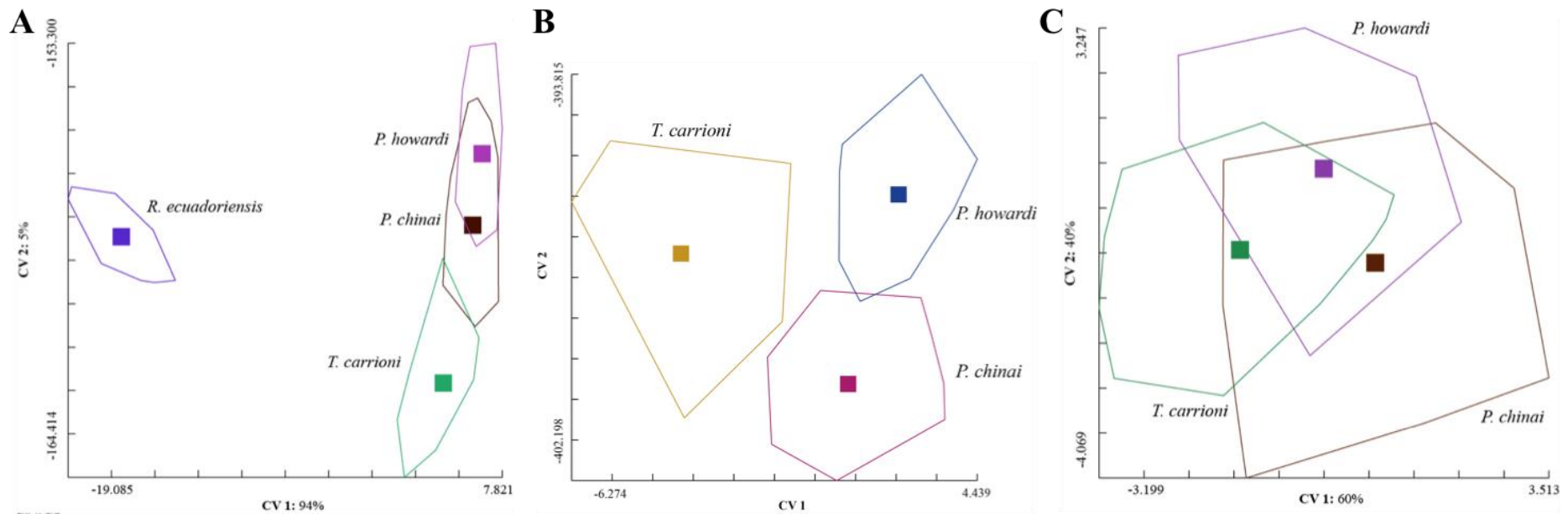


Figura 23. Variación interespecífica de la conformación del huevo y del opérculo.

(A) Análisis discriminante del contorno de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*. (B) Análisis discriminante del contorno de los huevos de la tribu Triatomini (*Panstrongylus* y *Triatoma*). En este análisis, se retiró el efecto de los huevos de *R. ecuadoriensis*. La discriminación de las tres especies es completa. (C) Análisis discriminante del opérculo de los huevos de la tribu Triatomini. Existe solapamiento en la distribución de las especies.

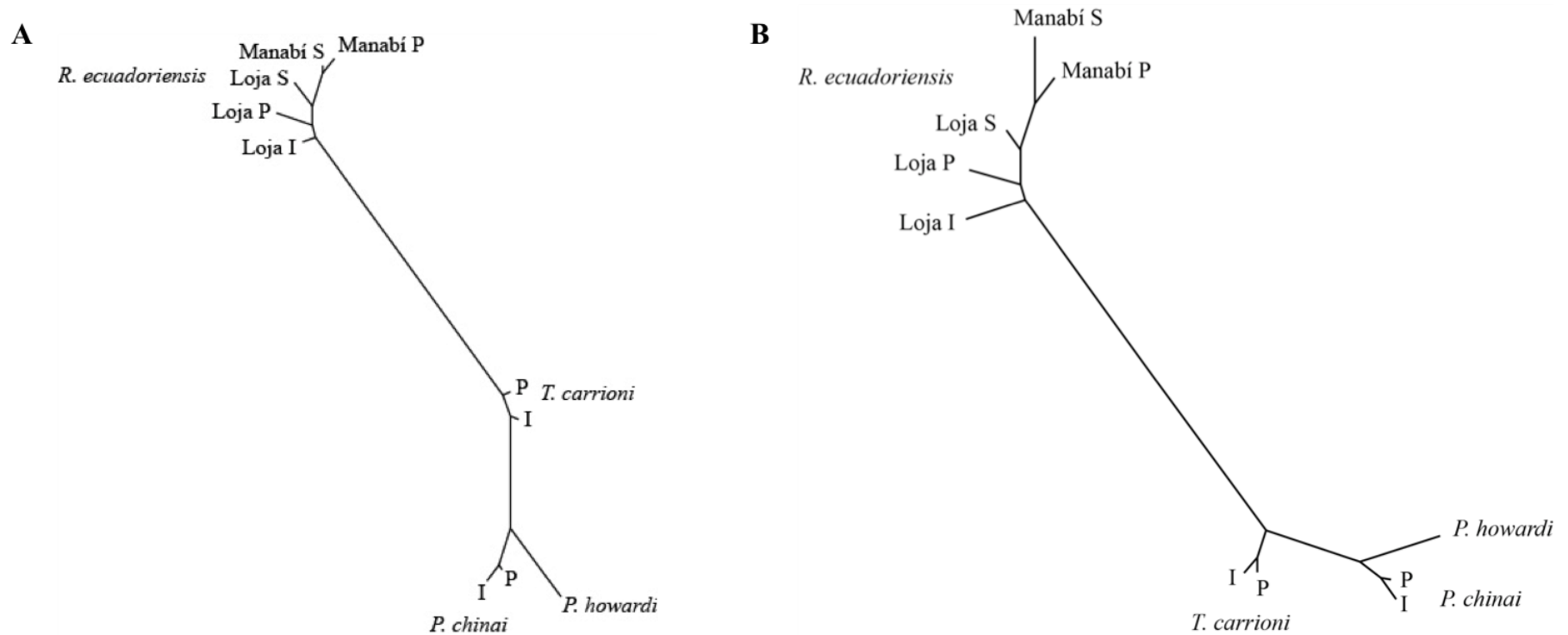


Figura 24. Árbol Neighbor-joining de la conformación del huevo obtenido mediante análisis tradicionales y análisis geométricos.

(A) Árbol obtenido mediante el análisis “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevos. (B) Árbol obtenido de la conformación del contorno del huevo. Los árboles se construyeron de las distancias fenéticas derivadas de las distancias de Mahalanobis (D^2). Los árboles incluyen los hábitats domiciliar (I), peridomiciliar (P) y silvestre (S) de las cuatro especies de triatomines estudiadas (*Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*).

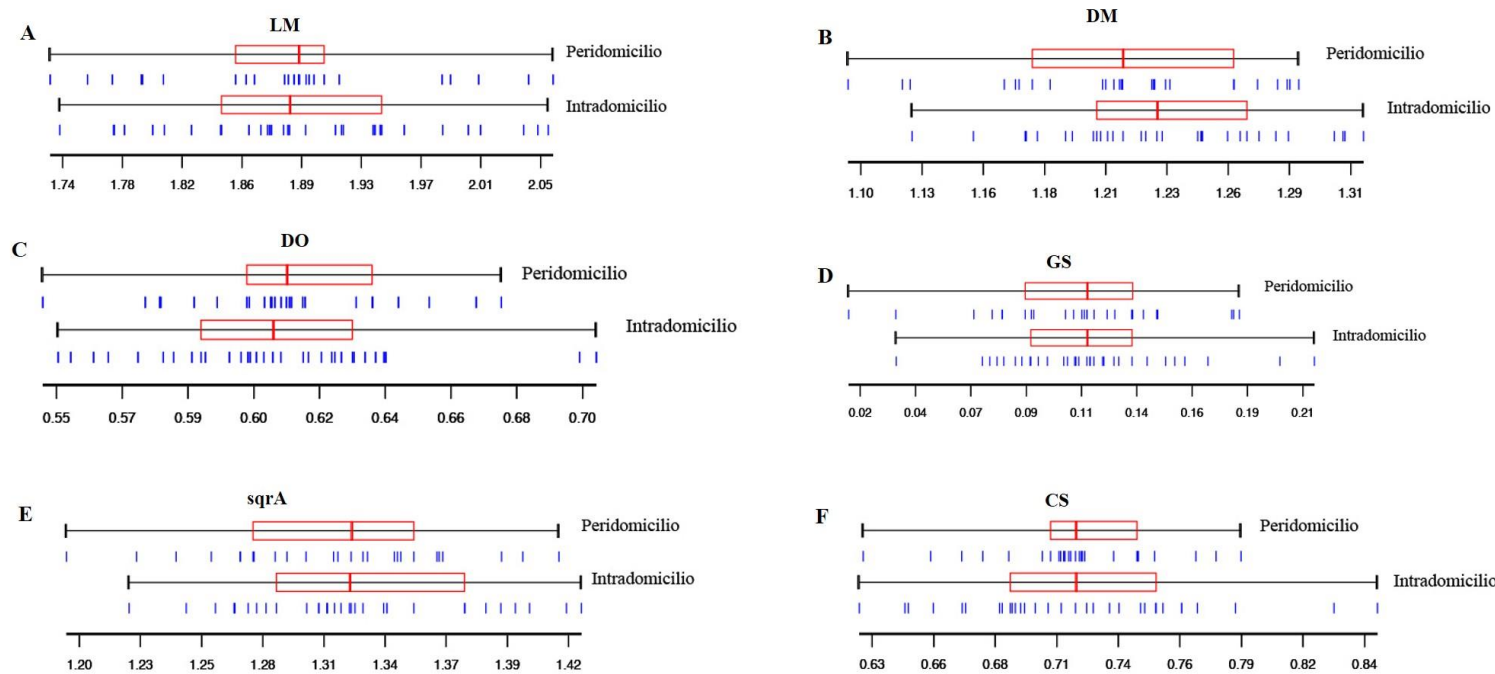


Figura 25. Variación intraespecífica del tamaño de los huevos de *Panstrongylus chinai* a nivel de hábitat (domiciliar y peridomiciliar).

(A) Variación de la longitud máxima (LM) de los huevo. (B) Variación del diámetro máximo (DM) de los huevos. (C) Variación del diámetro del opérculo (DO) de los huevos. (D) Variación del tamaño global (GS) obtenido del análisis “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevo. (E) Variación de la raíz cuadrada de la superficie (sqrA) de los huevo. (F) Variación del tamaño centroide (CS) de los opérculos de los huevos. La escala está en milímetros. No hubo significación entre los grupos. La significación de las variables LM, DM y DO se determinó mediante la prueba de t de Student; mientras que para GS, sqrA y CS se usó la prueba no-paramétrica corregida (1000 ciclos) con Bonferroni.

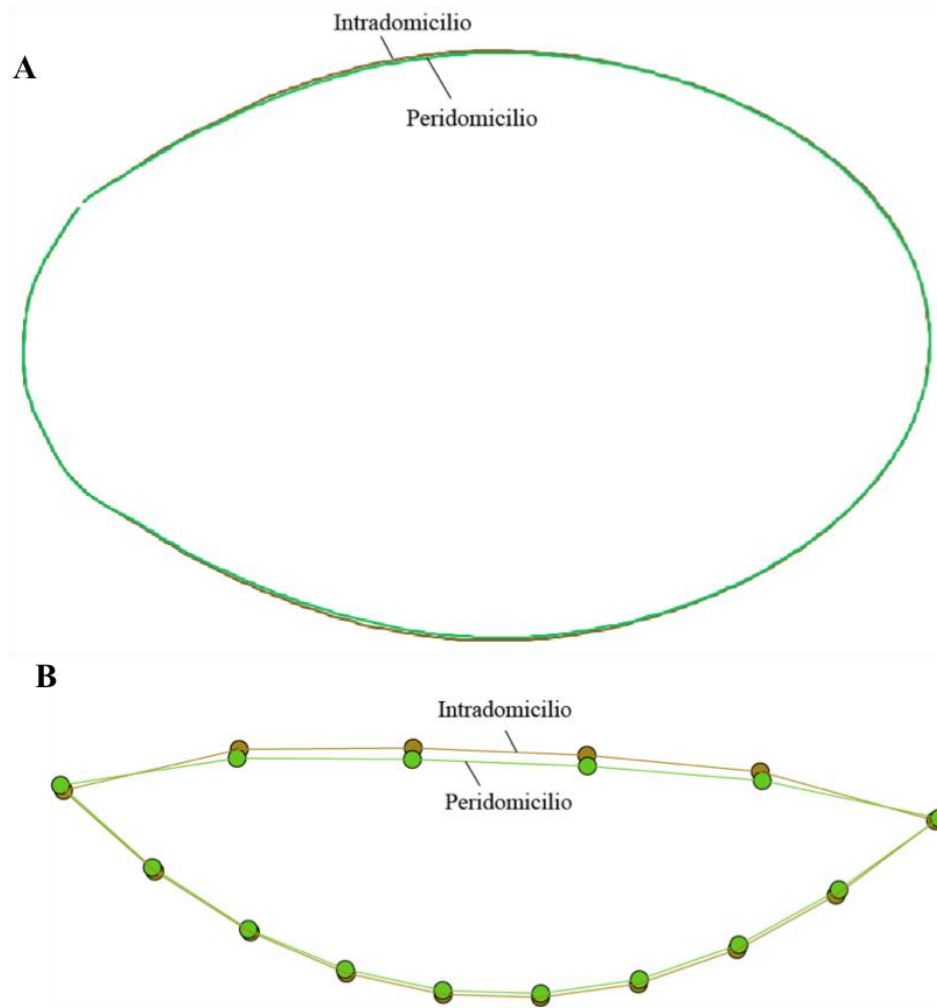


Figura 26. Diferencia de la conformación a nivel intraespecífico de los huevos de *Panstrongylus chinai*.

(A) Forma de los contornos de los huevos de los hábitats doméstico y peridoméstico. La forma fue representada por 14 armónicas, cuyo poder es del 0.9972. (B) Forma de los opérculos de los huevos de los ambientes domiciliar y peridomiciliar.

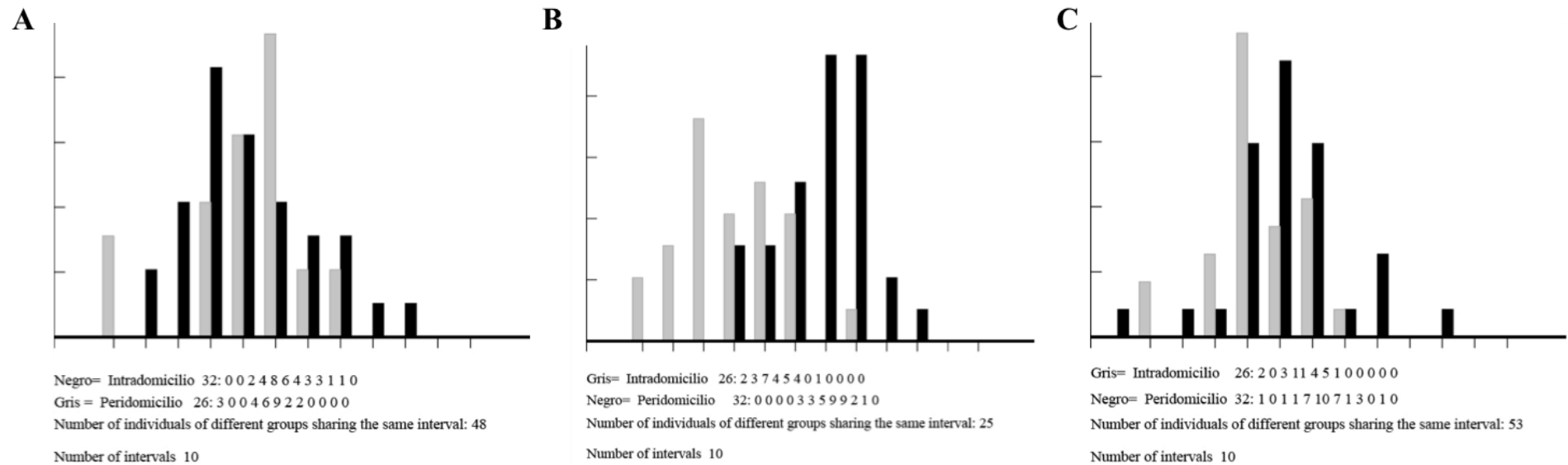


Figura 27. Variación intraespecífica de la forma de los huevos de *Panstrongylus chinai* a nivel de hábitat (domiciliar y peridomiciliar).

(A) Análisis discriminante “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevos. (B) Análisis discriminante del contorno de los huevos. (C) Análisis discriminante del opérculo de los huevos.

Cada gráfico indica: el color de cada grupo, el número de individuos por grupo, el número de individuos de diferentes grupos que comparten el mismo intervalo (solapamiento) y el número de intervalos.

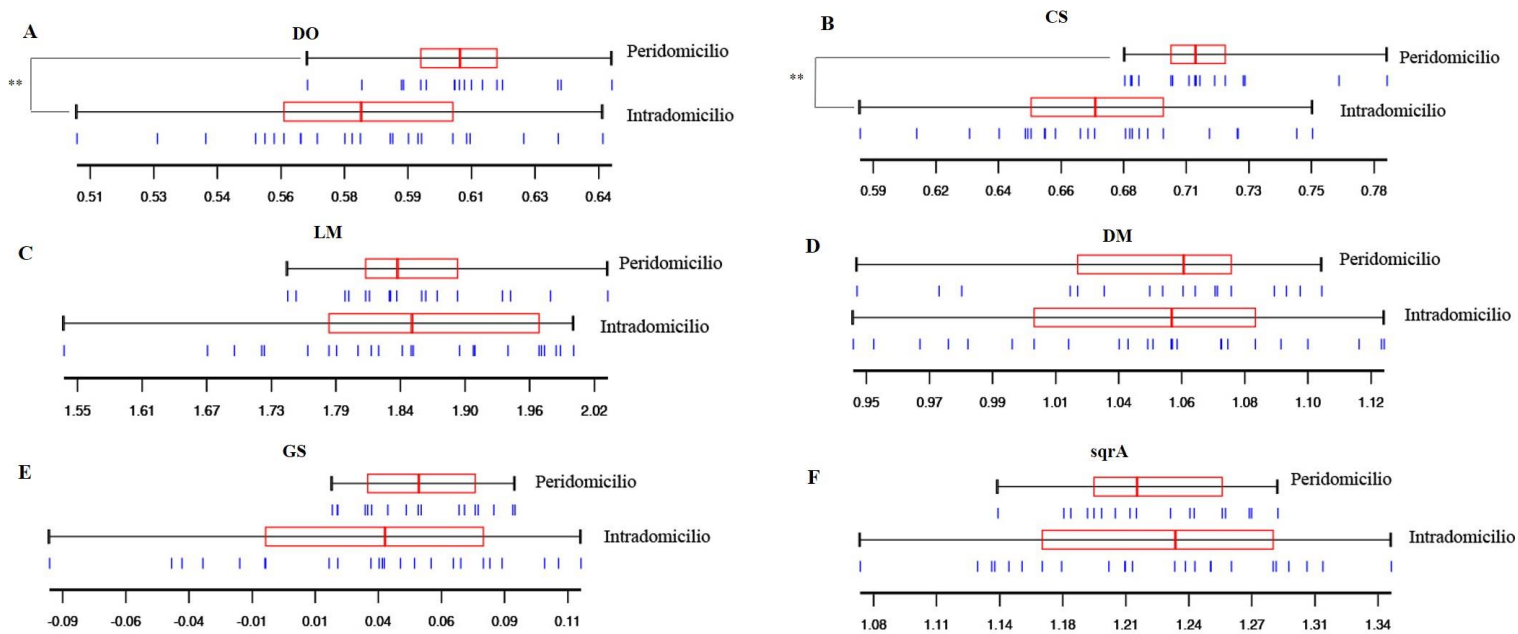


Figura 28. Variación intraespecífica del tamaño de los huevos de *Triatoma carrioni* a nivel de hábitat (domiciliar y peridomiciliar).

(A) Variación del diámetro del opérculo (DO) de los huevos. (B) Variación del tamaño centroide (CS) de los opérculos de los huevos. (C) Variación de la longitud máxima (LM) de los huevo. (D) Variación del diámetro máximo (DM) de los huevos. (E) Variación del tamaño global (GS) obtenido del análisis “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevo. (F) Variación de la raíz cuadrada de la superficie (sqrA) de los huevo. La escala está en milímetros. En la parte izquierda del gráfico A y B se indica la significación (**) entre los grupos. La significación de las variables LM, DM y DO se determinó mediante la prueba de t de Student; mientras que para GS, sqrA y CS se usó la prueba no-paramétrica corregida (1000 ciclos) con Bonferroni.

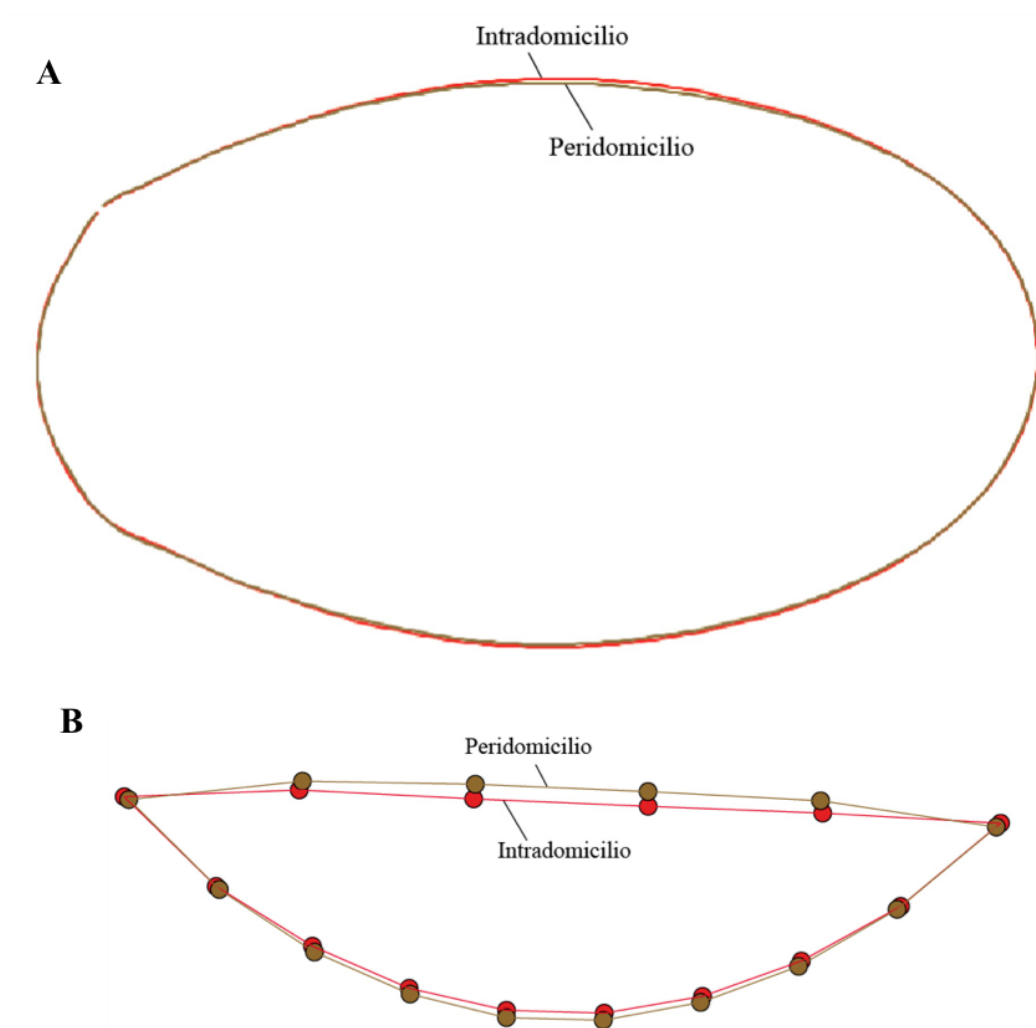


Figura 29. Diferencia de la conformación a nivel intraespecífico de los huevos de *Triatoma carrioni*.

(A) Forma de los contornos de los huevos de los hábitats doméstico y peridoméstico. La forma fue representada por 10 armónicas, cuyo poder es del 0.9961. (B) Forma de los opérculos de los huevos de los ambientes intradomiciliar y peridomiciliar.

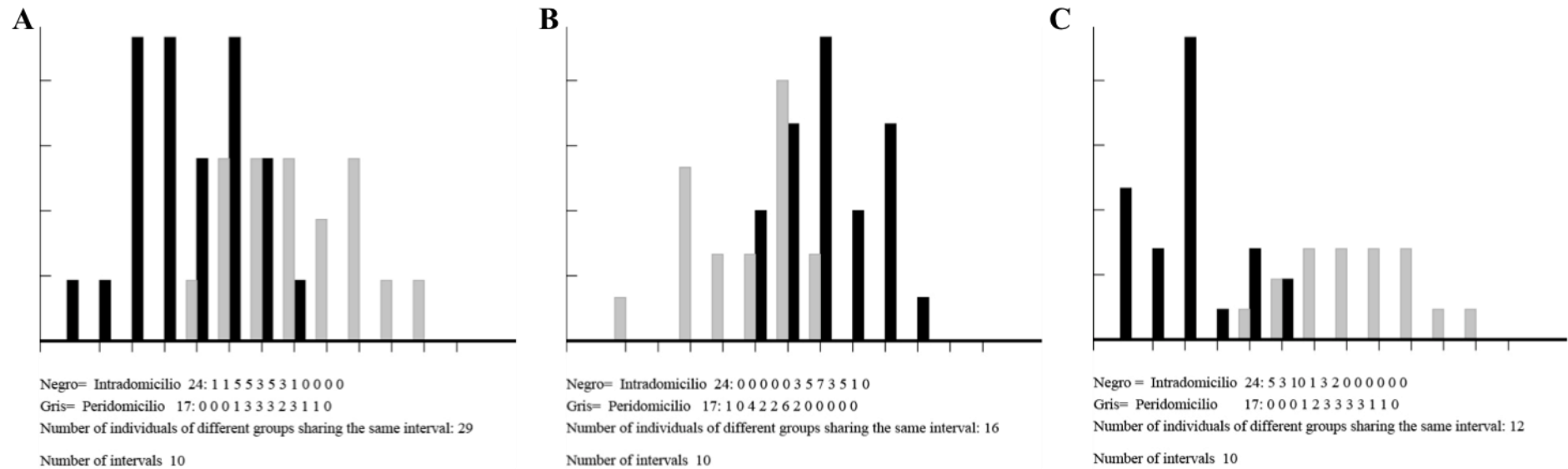


Figura 30. Variación intraespecífico de la forma de los huevos de *Triatoma carrioni* a nivel de hábitat (domiciliar y peridomiciliar).

(A) Análisis discriminante “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevos. (B) Análisis discriminante del contorno de los huevos. (C) Análisis discriminante del opérculo de los huevos.

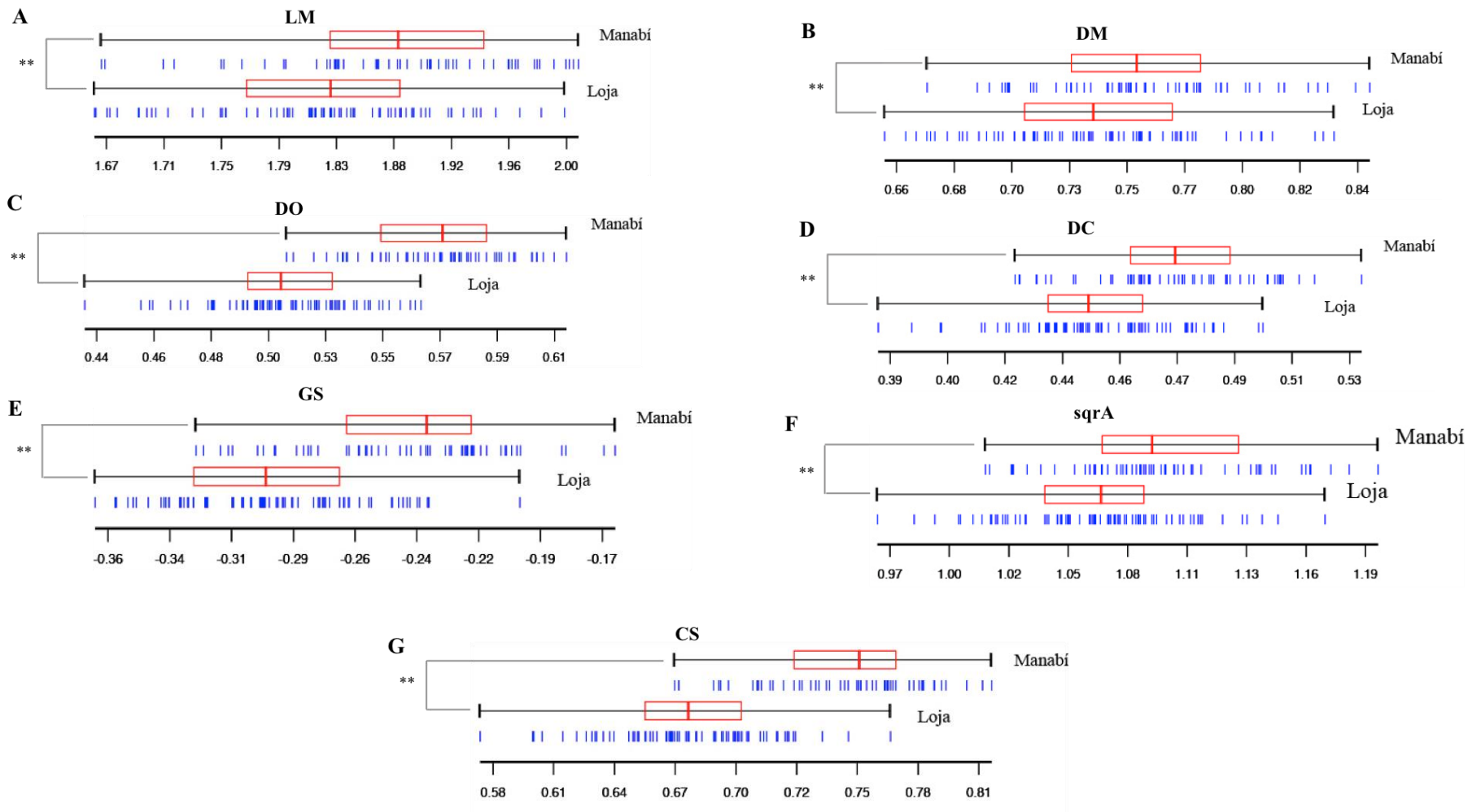


Figura 31. Variación intraespecífica del tamaño de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* a nivel de provincia (Loja y Manabí).

(A) Variación de la longitud máxima (LM) de los huevo. (B) Variación del diámetro máximo (DM) de los huevos. (C) Variación del diámetro del opérculo (DO) de los huevos. (D) Variación del diámetro del cuello (DC de los huevo. (E) Variación del tamaño global (GS) obtenido del análisis “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevo. (F) Variación de la raíz cuadrada de la superficie (sqrA) de los huevo. (G) Variación del tamaño centroide (CS) de los opérculos de los huevos. La escala está en milímetros. En la parte izquierda de cada gráfico se indica la significación (**) entre los grupos. La significación de las variables LM, DM y DO se determinó mediante la prueba de t de Student; mientras que para GS, sqrA y CS se usó la prueba no-paramétrica corregida (1000 ciclos) con Bonferroni.

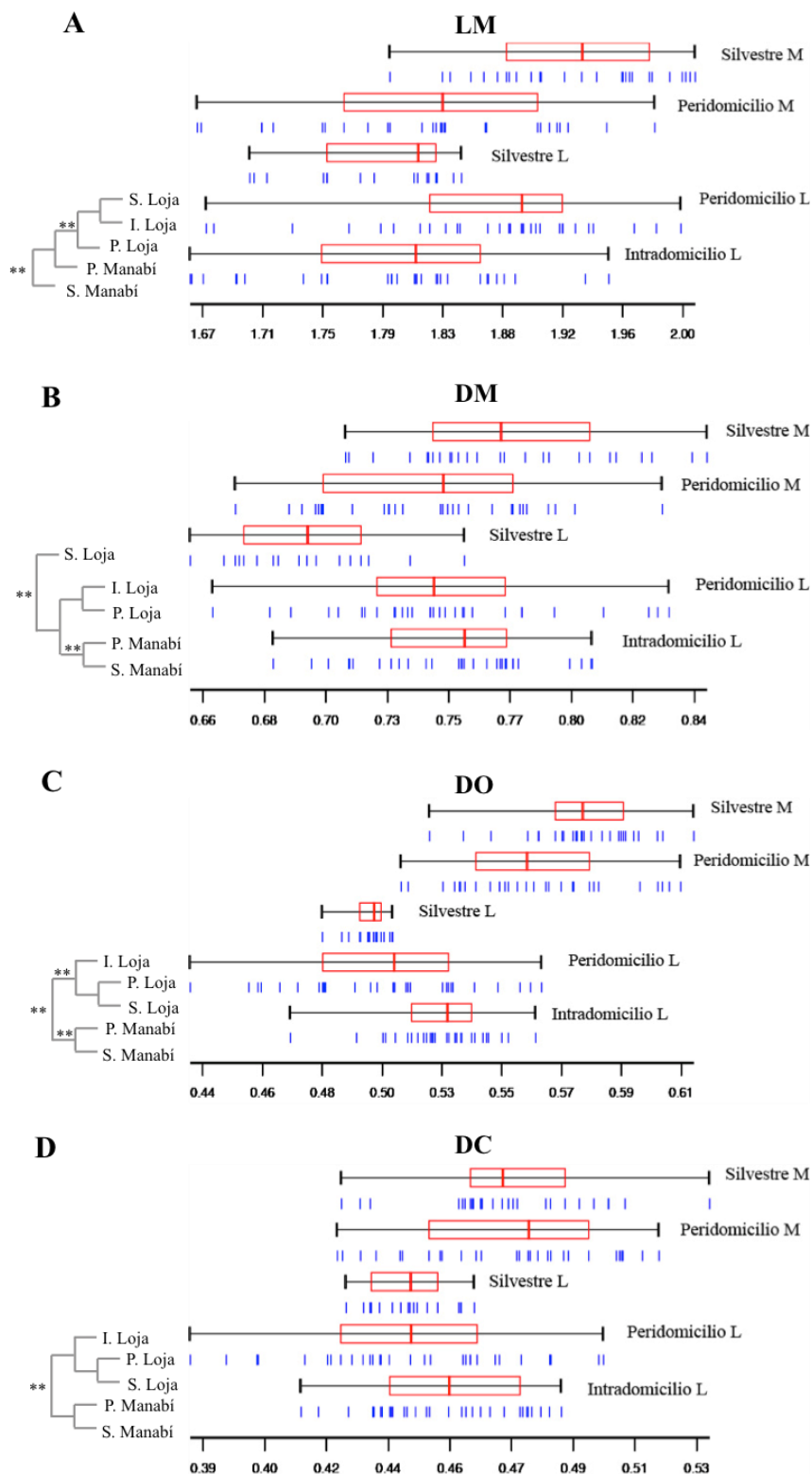


Figura 32. Variación intraespecífica del tamaño de las variables tradicionales (LM, DM, DO y DC) de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* a nivel de hábitats (domiciliar, peridomiciliar y silvestre)

(A) Variación de la longitud máxima (LM) de los huevo. (B) Variación del diámetro máximo (DM) de los huevos. (C) Variación del diámetro del opérculo (DO) de los huevos. (D) Variación del diámetro del cuello (DC) de los huevo. La escala está en milímetros. Los esquemas a la izquierda de cada gráfico indican la significación (**) entre grupos. La significación de las variables LM, DM y DO se determinó mediante el ANOVA.

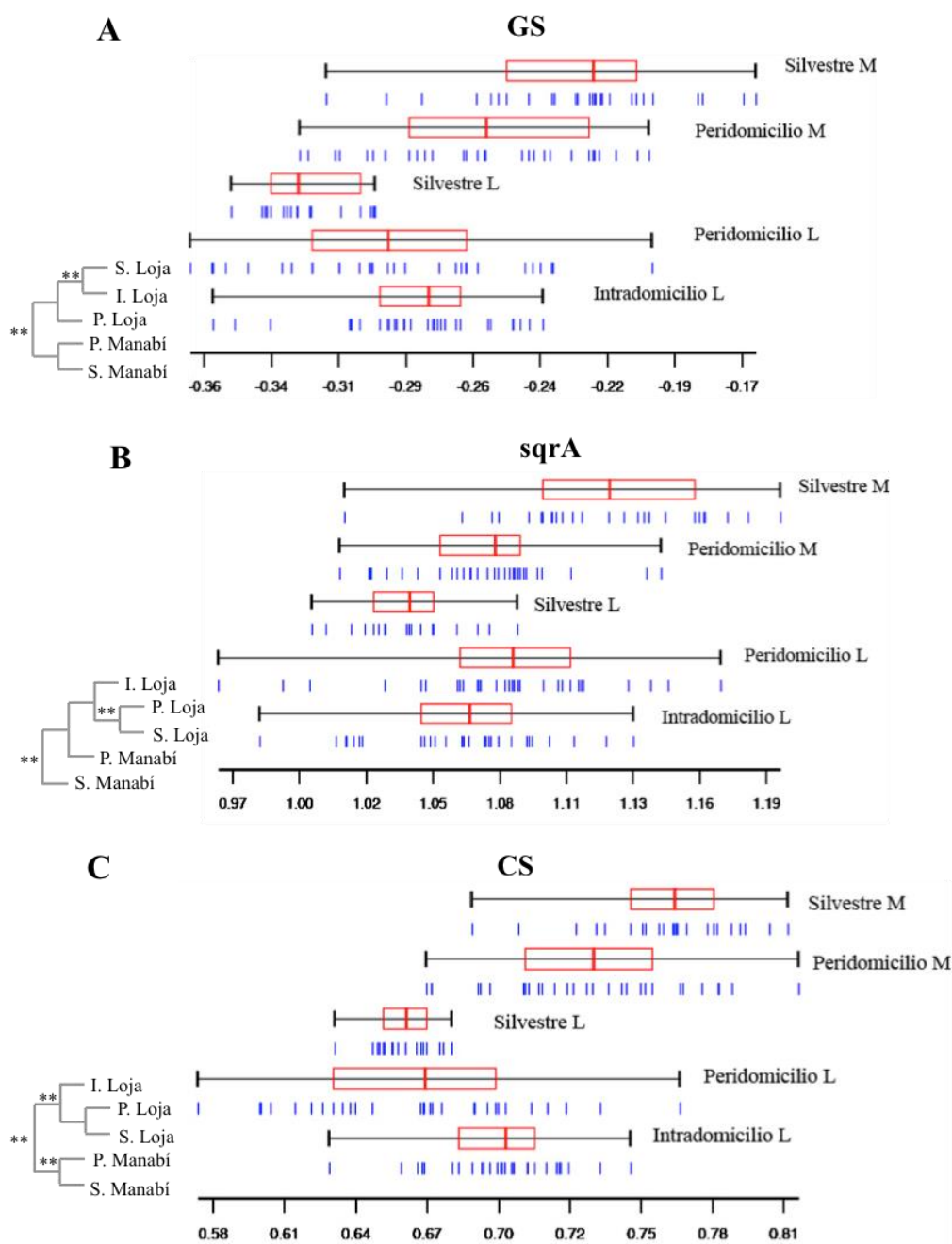


Figura 33. Variación intraespecífica del tamaño de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* a nivel de hábitats (domiciliar, peridomiciliar y silvestre)

(A) Variación del tamaño global (GS) obtenido del análisis “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM y DO) de los huevo. (B) Variación de la raíz cuadrada de la superficie (sqrA) de los huevo. (C) Variación del tamaño centroide (CS) de los opérculos de los huevos. La escala está en milímetros. Los esquemas a la izquierda de cada gráfico indican la significación (**) entre grupos. La significación de las variables GS, sqrA y CS se determinó mediante la prueba no-paramétrica (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

L: Loja y M: Manabí

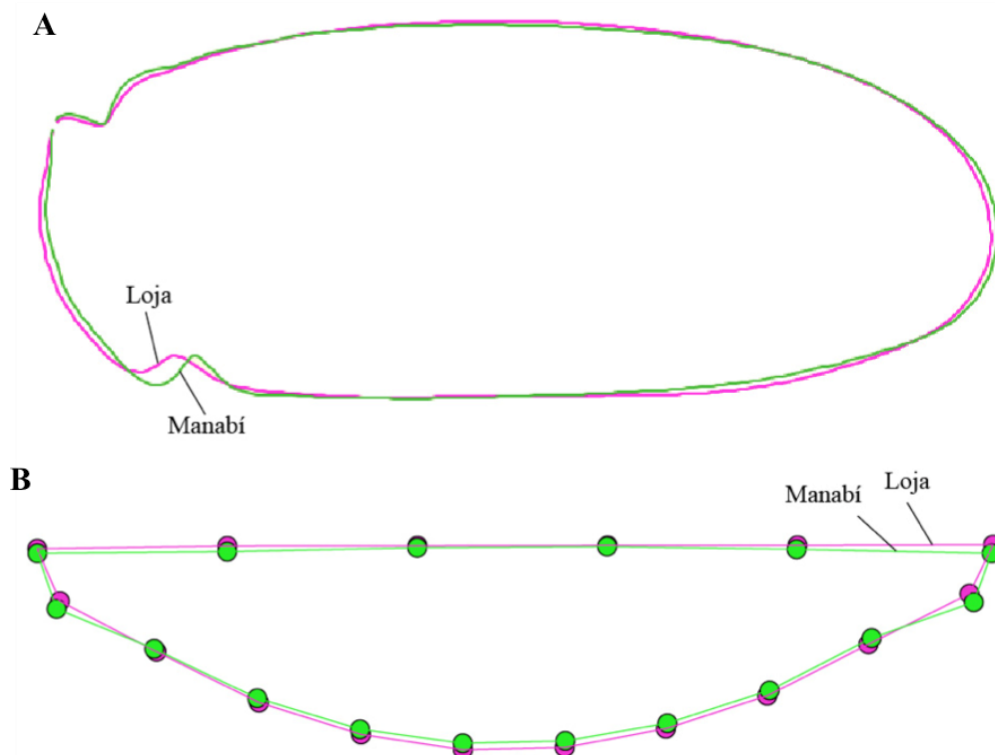


Figura 34. Diferencia intraespecífica de la forma de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* a nivel de provincia (Loja y Manabí).

(A) Forma de los contornos de los huevos. Las diferencias entre los huevos se centran en la zona opercular y en el cuello. La forma fue representada por 27 armónicas, cuyo poder es del 0.9990. (B) Forma de los opérculos de los huevos.

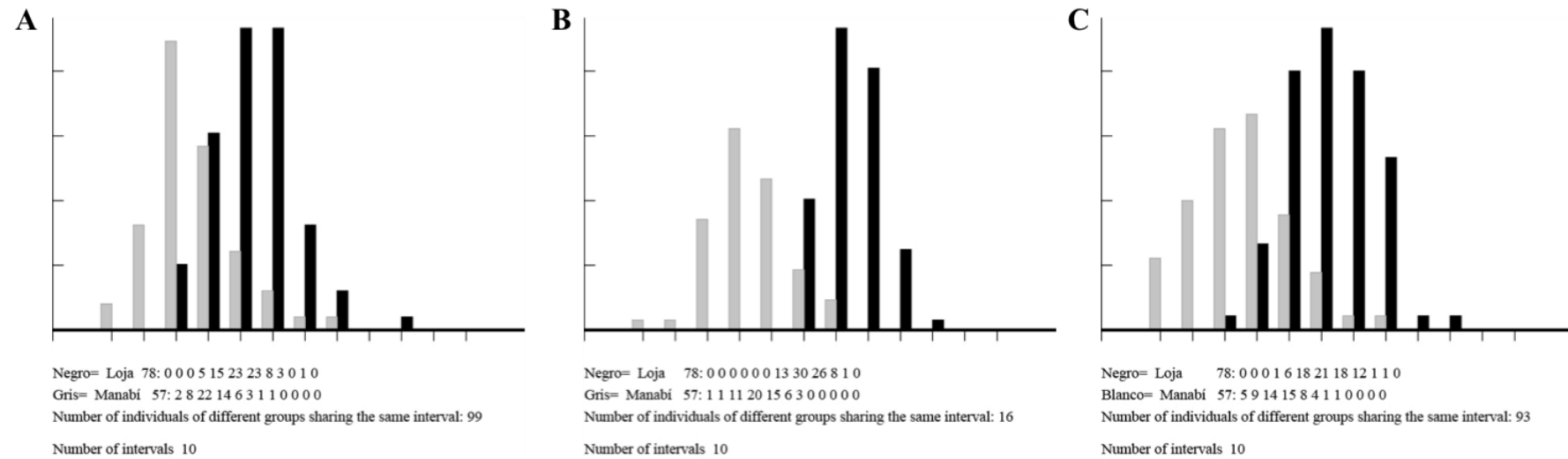


Figura 35. Variación intraespecífica de la forma de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* a nivel de provincia (Manabí y Loja).

(A) Análisis discriminante “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM, DO y DC) de los huevos. (B) Análisis discriminante del contorno de los huevos. (C) Análisis discriminante del opérculo de los huevos.

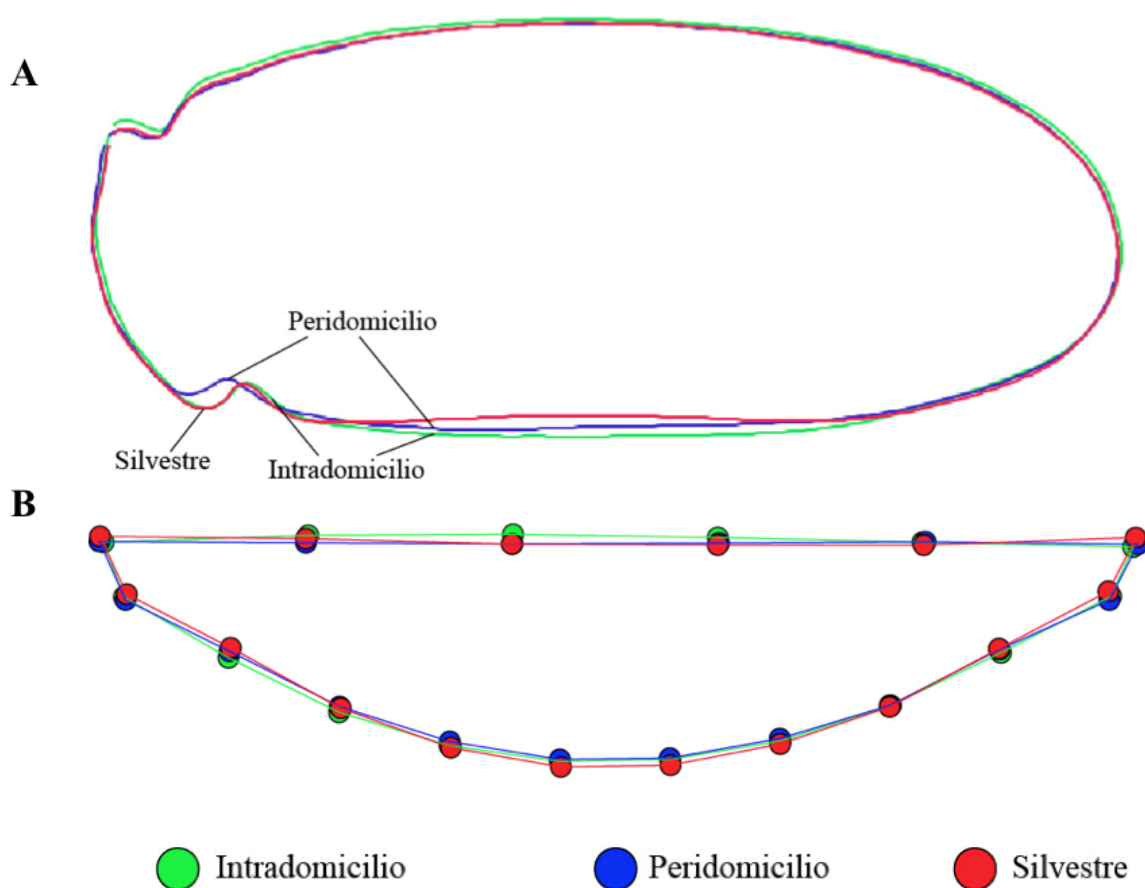


Figura 36. Diferencia intraespecífica de la forma de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* (Loja) a nivel de hábitat.

(A) Forma de los contornos de los huevos. La forma fue representada por 19 armónicas, cuyo poder es del 0.9960. (B) Forma de los opérculos de los huevos. Se indica el color que representa a cada hábitat.

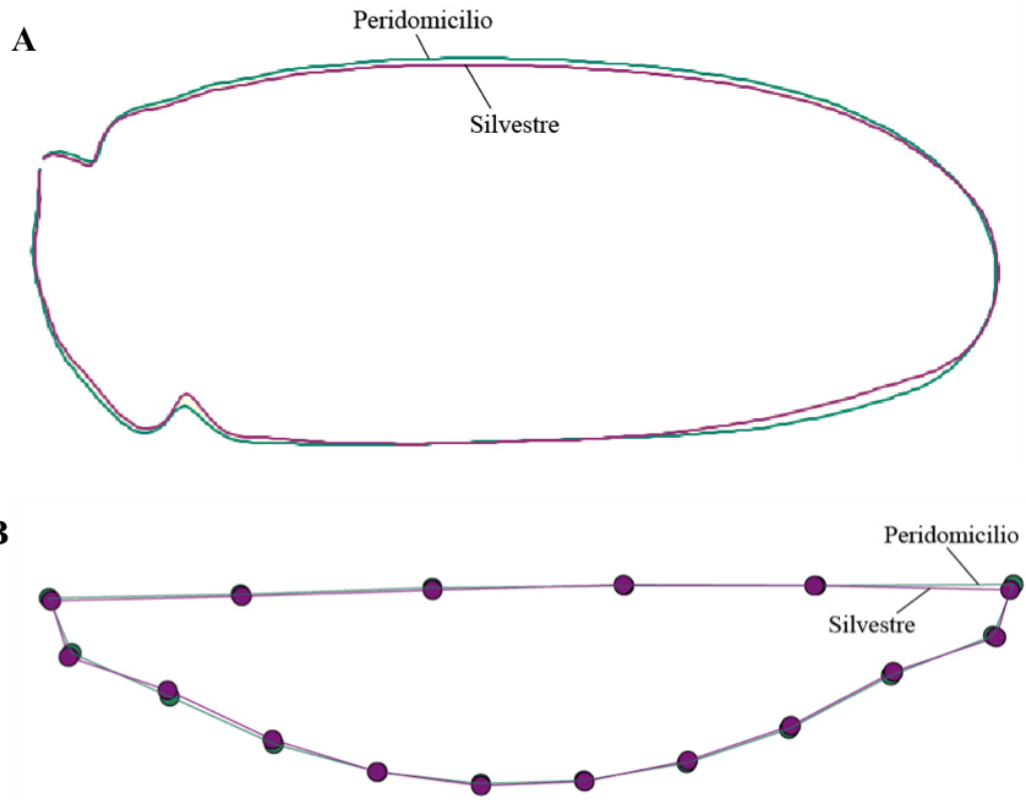


Figura 37. Diferencia intraespecífica de la forma de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* (Manabí) a nivel de hábitat.

(A) Forma de los contornos de los huevos. La forma fue representada por 14 armónicas, cuyo poder es del 0.98870. (B) Forma de los opérculos de los huevos.

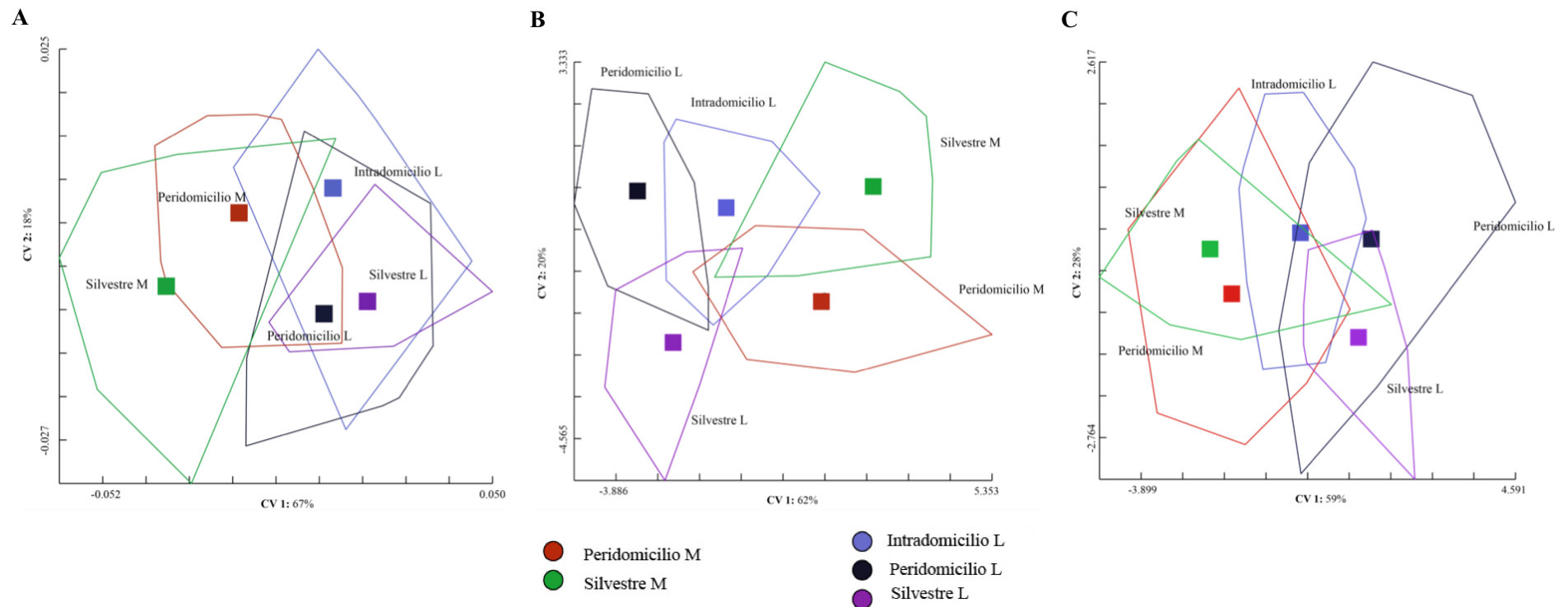


Figura 38. Variación intraespecífica de la forma de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* a nivel de hábitat (domiciliar, peridomiciliar y silvestre).

(A) Análisis discriminante “size-out” de las variables tradicionales (LM, DM, DO y DC) de los huevos. (B) Análisis discriminante del contorno de los huevos. (C) Análisis discriminante del opérculo de los huevos. Se indica el color que representa a cada hábitat (L: Loja y M: Manabí).

9 TABLAS

Tabla 1. Localización Geográfica de las poblaciones analizadas de *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

Especie	Provincia	Cantón	Comunidad	Hábitat	Año	
<i>Panstrongylus chinai</i>	Loja	Calvas	Bella María	Intradomicilio	2011	
			Chaquizca	Intradomicilio	2008	
			Guara	Peridomicilio	2008	
		Paltas	Catamayo	El Huayco	Intradomicilio	2006
			Tacoranga	Vega del Carmen	Intradomicilio	2010
						Peridomicilio
<i>Panstrongylus howardi</i>	Manabí	Portoviejo	Bejuco	Peridomicilio	2007	
<i>Triatoma carrioni</i>	Loja	Gonzanamá	Gerinoma	Intradomicilio	2015	
			Piedra Grande	Intradomicilio	2015	
			Yambaguana	Peridomicilio	2015	
			Yunga	Intradomicilio	2015	
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Loja	Calvas	Bella María	Intradomicilio	2011	
				Silvestre	2013	
			Paltas	Guara	Intradomicilio	2008
				Quisanga	Peridomicilio	2013
				Ashimingo	Peridomicilio	2005
				Coamine	Peridomicilio	2008
	Manabí	Portoviejo	Cruz Alta	Silvestre	2013	
				El Zapallo	Peridomicilio	2007
			Naranjo	Adentro	Peridomicilio	2005

Tabla 2. Clasificación de la muestra de huevos para los análisis morfométricos interespecíficos (entre especies) e intraespecíficos (entre hábitats).

Especie	Provincia	Hábitat	Lugar	Tamaño de muestra	
				Interespecífico	Intraespecífico
<i>Panstrongylus chinai</i>	Loja	Intradomicilio	Dormitorio	78	32
		Peridomicilio	Nido de Gallina		26
			Total		58
<i>Panstrongylus howardi</i>	Manabí	Peridomicilio	Piedras	75	0
<i>Triatoma carrioni</i>	Loja	Intradomicilio	Dormitorio	76	24
		Peridomicilio	Nido de Gallina		17
			Total		41
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Loja	Intradomicilio	Dormitorio	41	30
		Peridomicilio	Nido de Gallina		30
		Silvestre	Nido Ardilla		18
		Subtotal		78	
	Manabí	Peridomicilio	Nido de Gallina	40	30
		Silvestre	Nido Rata		27
	Subtotal			57	
			Total	81	135
TOTAL				310	234

Tabla 3. Resumen de las comparaciones realizadas para cada objetivo.

Objetivo	Rango de comparación	Grupos	Análisis
Interespecíficos	Especies	<i>Panstrongylus chinai</i> <i>Panstrongylus howardi</i> <i>Triatoma carrioni</i> <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	MT: Univariante y Multivariada (size-in y size-out) MG: Contorno
	Especies de la tribu Triatomini	<i>Panstrongylus chinai</i> <i>Panstrongylus howardi</i> <i>Triatoma carrioni</i>	MG: Opérculo
Intraespecíficos	<i>Panstrongylus chinai</i>	Hábitats	Intradomicilio Peridomicilio
			MT: Univariante y Multivariada (size-out) MG: Contorno y Opérculo
	<i>Triatoma carrioni</i>	Hábitats	Intradomicilio Peridomicilio
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Provincia	Loja Manabí	MT: Univariante y Multivariada (size-out) MG: Contorno y Opérculo
	Hábitats	Intradomicilio L Peridomicilio L Silvestre L Peridomicilio M Silvestre M	MT: Univariante y Multivariada (size-out) MG: Contorno y Opérculo

MT: morfometría tradicional, MG: morfometría geométrica, L: Loja, M: Manabí.

Tabla 4. Media (\bar{x}) y Desviación estándar (SD) del tiempo de desarrollo/eclosión (Te) de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

Espece	Provincia	N	$\bar{x}\pm SD$ [días]	Mínimo [días]	Máximo [días]	% de individuos que eclosionaron
<i>P. chinai</i>	Loja	75	29.23±1.521	26	35	76
<i>P. howardi</i>	Manabí	73	29±1.296	27	33	34
<i>T. carrioni</i>	Manabí	7 ⁺⁺	25±0.787	23	25	79
<i>R. ecuadoriensis</i>	Loja	38	17±1.583	12	21	96
	Manabí	39	18±1.249	15	20	76
	General	77	17±1.457	12	21	85

++ Los huevos de *Triatoma carrioni* se obtuvieron de hembras de campo, por lo que de pocos individuos se conoce el tiempo de desarrollo.

La fórmula para determinar el tiempo de desarrollo fue $Te = Tn - Tp + 1$, donde Tp es el día de puesta y Tn el de nacimiento

La fórmula para determinar el porcentaje de individuos que eclosionaron fue $\frac{N \text{ individuos nacidos}}{100}$

Tabla 5. Media (\bar{x}), Desviación estándar (SD) y varianza (σ^2) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, sqrA, CS) de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

<i>Panstrongylus chinai</i>				
Variable	$\bar{x}\pm SD$ [mm]	σ^2 [mm]	Mínimo [mm]	Máximo [mm]
LM	1.899±0.077	0.0060	1.74	2.05
DM	1.227±0.049	0.0025	1.10	1.32
DO	0.614±0.032	0.0011	0.55	0.7
sqrA	1.32±0.050	0.0025	1.20	1.43
CS	0.72±0.043	0.0018	0.63	0.84
<i>Panstrongylus howardi</i>				
Variable	$\bar{x}\pm SD$ [mm]	σ^2 [mm]	Mínimo [mm]	Máximo [mm]
LM	1.781±0.079	0.0062	1.56	2.1
DM	1.222±0.050	0.0025	1.08	1.37
DO	0.661±0.034	0.0012	0.56	0.74
sqrA	1.28±0.050	0.0025	1.12	1.48
CS	0.78±0.044	0.0020	0.67	0.89
<i>Triatoma carrioni</i>				
Variable	$\bar{x}\pm SD$ [mm]	σ^2 [mm]	Mínimo [mm]	Máximo [mm]
LM	1.857±0.095	0.0091	1.55	2.02
DM	1.045±0.045	0.0020	0.95	1.14
DO	0.585±0.029	0.0008	0.50	0.64
sqrA	1.22±0.054	0.0029	1.08	1.35
CS	0.68±0.036	0.0013	0.58	0.78
<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>				
Variable	$\bar{x}\pm SD$ [mm]	σ^2 [mm]	Mínimo [mm]	Máximo [mm]
LM	1.840±0.090	0.0081	1.67	2.03
DM	0.748±0.039	0.0015	0.67	0.84
DO	0.537±0.034	0.0012	0.46	0.61
sqrA	1.077±0.043	0.0019	0.97	1.19
CS	0.708±0.048	0.0023	0.60	0.81

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo, sqrA: raíz cuadrada de la superficie del huevo, CS: tamaño centroide del opérculo.

Tabla 6. Resumen de las diferencias estadísticas de las variables de tamaño (LM, DM, DO, GS, sqrA, CS) de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

		Variables de Morfometría Tradicionales: LM, DM, DO Y GS															
		LM				DM				DO				GS			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	<i>P. chinai</i>	-				-				-				-			
2	<i>P. howardi</i>	**	-			NS	-			**	-			NS	-		
3	<i>T. carrioni</i>	**	**	-		**	**	-		**	**	-		**	**	-	
4	<i>R. ecuadoriensis</i>	**	**	NS	-	**	**	**	-	**	**	**	-	**	**	**	-

		Variables de Morfometría Geométrica: sqrA y CS								
		sqrA				DM				
		1	2	3	4	1	2	3		
1	<i>P. chinai</i>	-				-				
2	<i>P. howardi</i>	**	-			**	-			
3	<i>T. carrioni</i>	**	**	-		**	**	-		
4	<i>R. ecuadoriensis</i> ⁺⁺	**	**	**	-	-	-	-		

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo, GS: tamaño global, sqrA: raíz cuadrada de la superficie, CS: tamaño centroide del opérculo.

++ Durante el análisis del CS, no se incluyó al opérculo de *R. ecuadoriensis*, debido a que se digitalizó más puntos en el opérculo de esta especie.

La significación estadística de las variables LM, DM y DO se determinó mediante el ANOVA (Anexos 13-15).

La significación de las GS, sqrA y CS se determinó mediante prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

Tabla 7. Distancia de Mahalanobis obtenidas del análisis multivariado de LM, DM y DO de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

	<i>P. chinai</i>	<i>P. howardi</i>	<i>T. carrioni</i>	<i>R. ecuadoriensis</i>
<i>P. chinai</i>	-			
<i>P. howardi</i>	2.53**/2.50**	-		
<i>T. carrioni</i>	4.06**/3.38**	4.92**/4.53**	-	
<i>R. ecuadoriensis</i>	12.98**/11.22**	13.47**/11.98**	8.93**/7.85**	-

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo.

/ separa las distancias de Mahalanobis del análisis “size-in” (izquierda) y “size-out” (derecha).

La significación estadística de las distancias fue determinada mediante prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

Tabla 8. Distancias de Mahalanobis calculadas para las variables de forma del contorno y del opérculo de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

	<i>P. chinai</i>	<i>P. howardi</i>	<i>T. carrioni</i>	<i>R. ecuadoriensis</i> ⁺⁺
<i>P. chinai</i>	-			
<i>P. howardi</i>	4.85**/1.71**	-		
<i>T. carrioni</i>	5.95**/2.03**	7.66**/1.82**	-	
<i>R. ecuadoriensis</i> ⁺⁺	27.43**	27.25**	96.00**	-

/ separa las distancias de Mahalanobis del contorno de los huevos (izquierda) y del opérculo (derecha).

++ Durante el análisis del CS, no se incluyó al opérculo de *R. ecuadoriensis*, debido a que se digitalizó más puntos en el opérculo de esta especie.

La significación estadística de las distancias fue determinada mediante prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

Tabla 9. Media (\bar{x}) y Desviación estándar (SD) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, sqrA, CS) de los huevos de *Panstrongylus chinai* cuyos parentales fueron colectados en los hábitats intradomiciliar y peridomiciliar.

Variable		Intradomicilio	Peridomicilio	Sig.	TOTAL
LM	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	1.90 \pm 0.078	1.887 \pm 0.078	0.64 ^{NS}	1.89 \pm 0.078
	σ^2 [mm]	0.0062	0.0061	0.93 ^{NS}	0.0061
	Mínimo [mm]	1.75	1.74		1.74
	Máximo [mm]	2.04	2.05		2.05
DM	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	1.23 \pm 0.46	1.21 \pm 0.5	0.17 ^{NS}	1.22 \pm 0.48
	σ^2 [mm]	0.0021	0.0025	0.60 ^{NS}	0.0023
	Mínimo [mm]	1.13	1.10		1.10
	Máximo [mm]	1.31	1.29		1.31
DO	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	0.61 \pm 0.034	0.62 \pm 0.028	0.62 ^{NS}	0.61 \pm 0.031
	σ^2 [mm]	0.0012	0.0008	0.46 ^{NS}	0.0010
	Mínimo [mm]	0.55	0.55		0.55
	Máximo [mm]	0.70	0.67		0.70
sqrA	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	1.2 \pm 0.049	1.31 \pm 0.052	0.46 ^{NS}	1.32 \pm 0.050
	σ^2 [mm]	0.0023	0.0027	0.72 ^{NS}	0.0025
	Mínimo [mm]	1.23	1.20		1.20
	Máximo [mm]	1.42	1.41		1.42
CS	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	0.72 \pm 0.049	0.72 \pm 0.034	0.92 ^{NS}	0.72 \pm 0.043
	σ^2 [mm]	0.0025	0.0012	0.13 ^{NS}	0.0019
	Mínimo [mm]	0.63	0.63		0.63
	Máximo [mm]	0.84	0.79		0.84

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo, sqrA: raíz cuadrada de la superficie del huevo, CS: tamaño centroide del opérculo.

La significación estadística de las variables LM, DM y DO se determinó mediante la prueba de t de Student para muestras independientes (Anexo 16).

La significación de sqrA, CS y de las varianzas se determinó mediante prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

Tabla 10. Media (\bar{x}) y Desviación estándar (SD) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, sqrA y CS) de los huevos de *Triatoma carrioni* cuyos parentales fueron colectados en los hábitats intradomiciliar y peridomiciliar.

Variable		Intradomicilio	Peridomicilio	Sig.	TOTAL
LM	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	1.84 \pm 0.114	1.86 \pm 0.075	0.61 ^{NS}	1.88 \pm 0.099
	σ^2 [mm]	0.0129	0.0055	0.09 ^{NS}	0.0092
	Mínimo [mm]	1.55	1.74		1.55
	Máximo [mm]	1.99	2.02		2.02
DM	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	1.04 \pm 0.049	1.05 \pm 0.042	0.85 ^{NS}	1.04 \pm 0.045
	σ^2 [mm]	0.0024	0.0017	0.45 ^{NS}	0.0021
	Mínimo [mm]	0.95	0.95		0.95
	Máximo [mm]	1.12	1.10		1.12
DO	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	0.58 \pm 0.031	0.61 \pm 0.019	0.00**	0.59 \pm 0.029
	σ^2 [mm]	0.0010	0.0003	0.05 ^{NS}	0.0065
	Mínimo [mm]	0.51	0.57		0.51
	Máximo [mm]	0.64	0.64		0.64
sqrA	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	1.22 \pm 0.065	1.22 \pm 0.039	0.88 ^{NS}	1.22 \pm 0.055
	σ^2 [mm]	0.0043	0.0015	0.01*	0.0029
	Mínimo [mm]	1.08	1.14		1.08
	Máximo [mm]	1.34	1.28		1.34
CS	$\bar{x} \pm SD$ [mm]	0.68 \pm 0.039	0.71 \pm 0.024	0.00**	0.69 \pm 0.039
	σ^2 [mm]	0.0015	0.0006	0.07 ^{NS}	0.0011
	Mínimo [mm]	0.59	0.68		0.59
	Máximo [mm]	0.75	0.78		0.78

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo, sqrA: raíz cuadrada de la superficie del huevo, CS: tamaño centroide del opérculo.

La significación estadística de las variables LM, DM y DO se determinó mediante la prueba de t de Student para muestras independientes (Anexo 16).

La significación de sqrA, CS y de las varianzas se determinó mediante prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

Tabla 11. Media (\bar{x}) y Desviación estándar (SD) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, DC, sqrA) de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* cuyos parentales fueron colectados en los tres diferentes hábitats (intradomiciliar, peridomiciliar y silvestre) de las provincias de Loja y Manabí (Continuación...)

Variable	Provincia	Hábitat	$\bar{x}\pm SD$ [mm]	σ^2 [mm]	Mínimo [mm]	Máximo [mm]
LM	Loja	Intradomicilio	1.80±0.076	0.0057	1.67	1.95
		Peridomicilio	1.87±0.078	0.0060	1.68	1.99
		Silvestre	1.79±0.048	0.0023	1.71	1.85
		Total	1.82±0.078	0.0060	1.67	1.99
	Manabí	Peridomicilio	1.83±0.079	0.0063	1.67	1.98
		Silvestre	1.92±0.058	0.0034	1.71	2.00
		Total	1.85±0.083	0.0072	1.67	2.00
		Total	1.84±0.84	0.0066	1.67	2.00
		Total	1.84±0.84	0.0066	1.67	2.00
DM	Loja	Intradomicilio	0.75±0.030	0.0008	0.69	0.80
		Peridomicilio	0.75±0.039	0.0015	0.67	0.83
		Silvestre	0.70±0.025	0.0006	0.66	0.76
		Subtotal	0.74±0.038	0.0015	0.66	0.83
	Manabí	Peridomicilio	0.74±0.036	0.0013	0.67	0.82
		Silvestre	0.77±0.035	0.0013	0.66	0.84
		Subtotal	0.74±0.042	0.0014	0.66	0.84
		Total	0.75±0.039	0.0015	0.66	0.84
	Total	0.75±0.039	0.0015	0.66	0.84	

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo. DC: diámetro del cuello, sqrA: superficie del huevo, CS: tamaño centroide del opérculo.

Tabla 11. Media (\bar{x}) y Desviación estándar (SD) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, DC, sqrA) de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* cuyos parentales fueron colectados en los tres diferentes hábitats (intradomiciliar, peridomiciliar y silvestre) de las provincias Loja y Manabí. (Continuación...)

Variable	Provincia	Hábitat	$\bar{x}\pm SD$ [mm]	σ^2 [mm]	Mínimo [mm]	Máximo [mm]	
DO	Loja	Intradomicilio	0.52±0.017	0.0003	0.47	0.56	
		Peridomicilio	0.51±0.030	0.0009	0.44	0.56	
		Silvestre	0.50±0.006	0.0000	0.49	0.51	
		Total	0.51±0.024	0.0006	0.44	0.56	
	Manabí	Peridomicilio	0.56±0.026	0.0007	0.44	0.61	
		Silvestre	0.57±0.020	0.0004	0.49	0.61	
		Total	0.55±0.038	0.0006	0.44	0.61	
		Total	0.53±0.035	0.0006	0.44	0.61	
		Total		0.53±0.035	0.0006	0.44	0.61
		Total		0.53±0.035	0.0006	0.44	0.61
DC	Loja	Intradomicilio	0.45±0.020	0.0004	0.42	0.49	
		Peridomicilio	0.45±0.029	0.0009	0.39	0.50	
		Silvestre	0.44±0.011	0.0001	0.43	0.46	
		Total	0.45±0.023	0.0005	0.39	0.50	
	Manabí	Peridomicilio	0.47±0.027	0.0007	0.39	0.51	
		Silvestre	0.47±0.022	0.0005	0.43	0.53	
		Total	0.46±0.027	0.0006	0.39	0.53	
		Total	0.46±0.026	0.0006	0.39	0.53	
		Total		0.46±0.026	0.0006	0.39	0.53
		Total		0.46±0.026	0.0006	0.39	0.53

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo. DC: diámetro del cuello, sqrA: superficie del huevo, CS: tamaño centroide del opérculo.

Tabla 11. Media (\bar{x}) y Desviación estándar (SD) de las variables de tamaño (LM, DM, DO, DC, sqrA) de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* cuyos parentales fueron colectados en los tres diferentes hábitats (intradomiciliar, peridomiciliar y silvestre) de las provincias Loja y Manabí. (Continuación...)

Variable	Provincia	Hábitat	$\bar{x}\pm SD$ [mm]	σ^2 [mm]	Mínimo [mm]	Máximo [mm]	
sqrA	Loja	Intradomicilio	1.06±0.034	0.0011	0.98	1.13	
		Peridomicilio	1.08±0.043	0.0019	0.97	1.17	
		Silvestre	1.04±0.022	0.0005	1.00	1.09	
		Total	1.06±0.038	0.0014	0.97	1.17	
	Manabí	Peridomicilio	1.07±0.030	0.0009	1.02	1.14	
		Silvestre	1.12±0.039	0.0015	1.00	1.19	
		Total	1.09±0.043	0.0018	1.00	1.19	
		Total	1.08±0.042	0.0016	0.97	1.19	
	CS	Loja	Intradomicilio	0.69±0.024	0.0006	0.63	0.75
			Peridomicilio	0.66±0.043	0.0018	0.58	0.77
Silvestre			0.66±0.012	0.0002	0.63	0.68	
Total			0.68±0.035	0.0012	0.58	0.77	
Manabí		Peridomicilio	0.73±0.037	0.0014	0.58	0.81	
		Silvestre	0.76±0.027	0.0008	0.63	0.81	
		Total	0.72±0.053	0.0013	0.58	0.81	
		Total	0.74±0.035	0.0013	0.58	0.81	

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo. DC: diámetro del cuello, sqrA: superficie del huevo, CS: tamaño centroide del opérculo.

Tabla 12. Resumen de las diferencias estadísticas de las variables de tamaño (LM, DM, DO, DC, sqrA, CS) comparadas entre provincias (L: Loja, M: Manabí) y hábitats en que fueron colectados los parentales de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis*.

		Variables de Morfometría Tradicional: Análisis univariante																			
		LM					DM					DO					DC				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1	Intradomicilio L	-					-					-					-				
2	Peridomicilio L	*	-				NS	-				*	-				NS	-			
3	Silvestre L	NS	*	-			**	**	-			*	NS	-			NS	NS	-		
4	Peridomicilio M	NS	NS	NS	-		NS	NS	**	-		**	**	**	-		*	**	**	-	
5	Silvestre M	**	*	**	**	-	NS	NS	**	*	-	**	**	**	*	-	*	**	**	NS	-

		Variables de Morfometría Tradicional (GS) y de Morfometría Geométrica (sqrA y CS)															Diferencia entre provincias										
		GS					sqrA					CS					Loja vs. Manabí										
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	LM	DM	DO	GS	sqrA	CS					
1	Intradomicilio L	-					-					-					-					LM	DM	DO	GS	sqrA	CS
2	Peridomicilio L	NS	-				NS	-				**	-				**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
3	Silvestre L	**	*	-			NS	**	-			**	NS	-			**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
4	Peridomicilio M	**	**	**	-		NS	NS	**	-		**	**	**	-		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
5	Silvestre M	**	**	**	**	-	**	**	**	**	-	**	**	**	**	-	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo. DC: diámetro del cuello, GS: tamaño global, sqrA: raíz cuadrada de la superficie del huevo; CS: tamaño centroide.

La significación estadística de las variables LM, DM, DO y DC (morfometría tradicional) se determinó mediante el ANOVA (Anexos 17-18).

La significación estadística de GS, sqrA y CS se calculó mediante prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

Tabla 13. Distancia de Mahalanobis de la conformación del huevo y del opérculo de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* cuyos parentales fueron colectados en los hábitats intradoméstico, peridoméstico y silvestre de las provincias Loja y Manabí.

	Intradomicilio L	Peridomicilio L	Silvestre L	Peridomicilio M	Silvestre M
Intradomicilio L	-				
Peridomicilio L	1.63**/3.03**/1.98**	-			
Silvestre L	1.90**/3.28**/1.94**	1.30**/3.46**/1.62 ^{NS}	-		
Peridomicilio M	1.62**/3.36**/2.15**	2.98**/4.63**/2.21**	2.67**/3.95**/2.96**	-	
Silvestre M	2.09**/3.76**/3.50**	3.30**/5.34**/3.26**	3.26**/5.35**/3.96**	1.03**/2.91**/2.12**	-

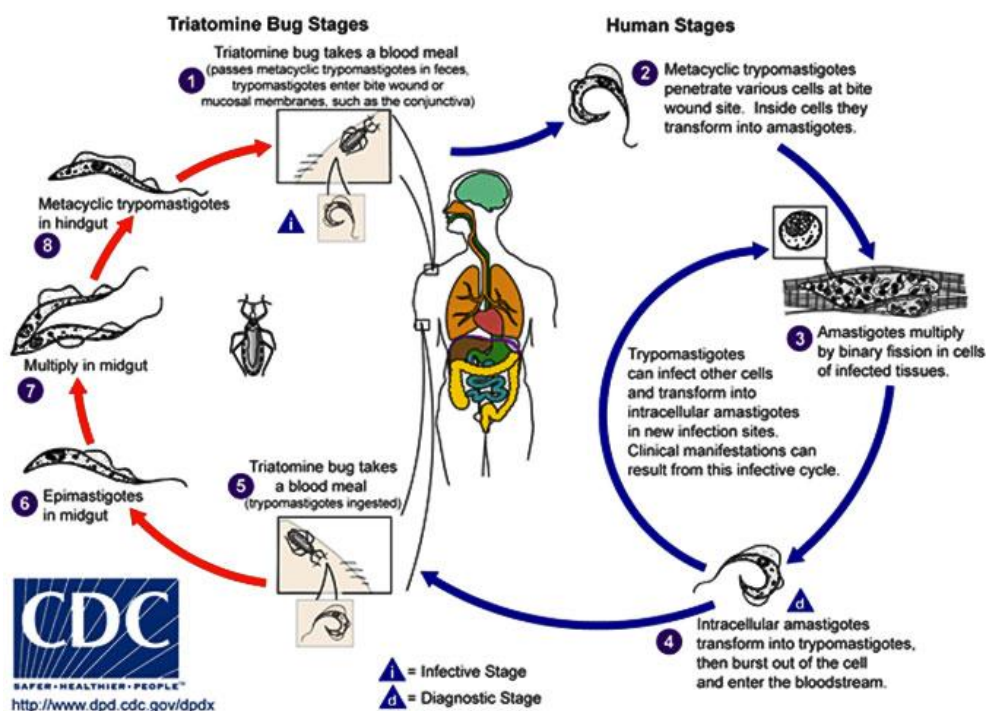
L: Loja, M: Manabí

/ separa las distancias de Mahalanobis del análisis “size-out” de las variables tradicionales (izquierda), del contorno de los huevos (medio) y del opérculo (derecha).

La significación estadística de las distancias fue determinada mediante prueba no-paramétrica de permutaciones (1000 ciclos) corregida con Bonferroni.

10 ANEXOS

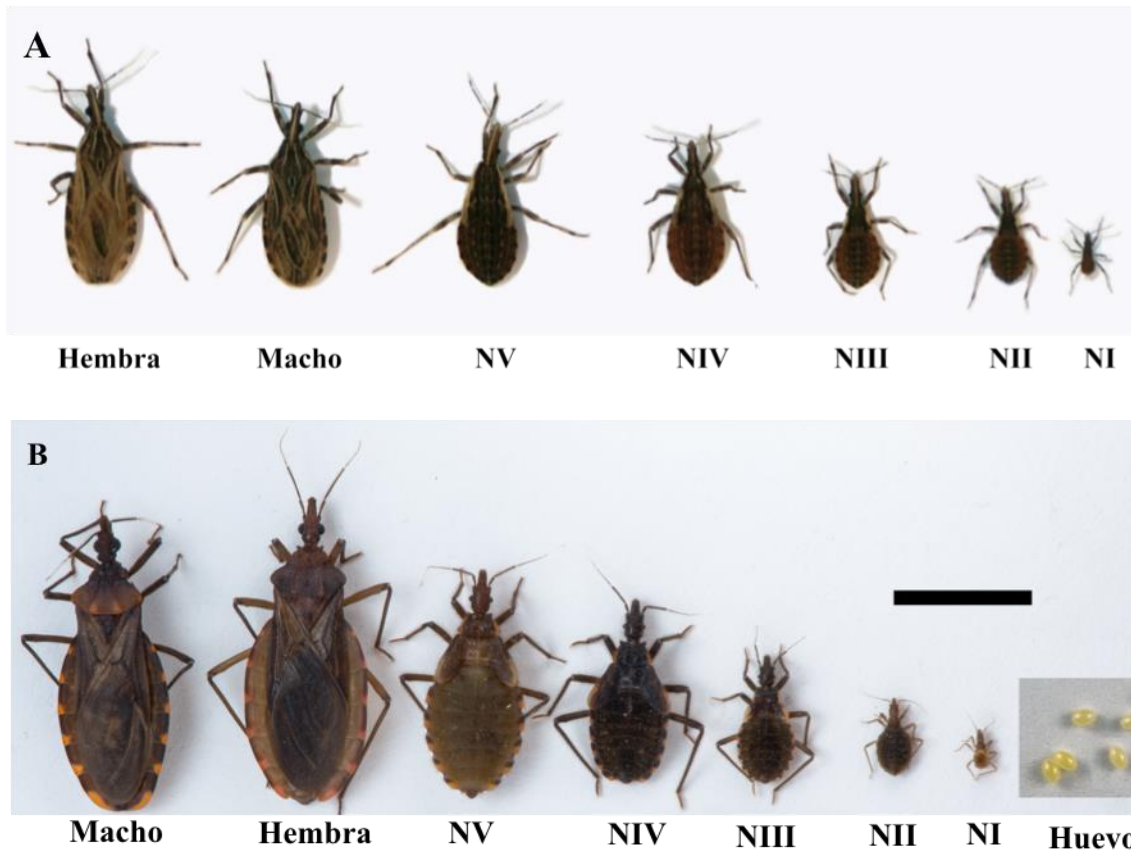
Anexo 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* en el vector (triatomino) y el huésped mamífero (ser humano).



Se observa las distintas transformaciones que sufre el parásito durante su desarrollo en el triatomino y en el mamífero huésped. El triatomino elimina en las heces y orina tripomastigotes metacíclicos sobre la piel del huésped (1). Estos invaden las células del huésped (2) y se transforman en amastigotes (3). Los amastigotes se replican en el citoplasma de las células y se diferencian en tripomastigotes sanguíneos. Estos son liberados de las células infectadas (4), por lo que pueden invadir otra célula (3) o entrar en el sistema circulatorio. En el sistema circulatorio, los tripomastigotes pueden infectar al triatomino (5). El parásito en el intestino medio del vector se diferencia en epimastigote (6) y se multiplica sucesivamente (7). En el intestino posterior del insecto, se diferencia en tripomastigote metacíclico (8). Este es eliminado por el vector en las heces (1), por lo que el ciclo se repite.

CDC, 2016

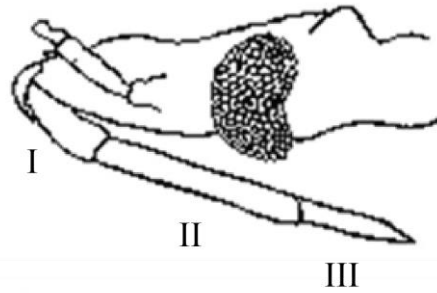
Anexo 3. Estadios de desarrollo de los triatominos.



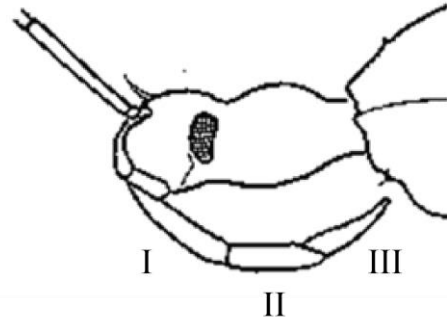
Los triatominos pasan por el estadio huevo y cinco estadios ninfales (NI a NV). Los adultos presentan dimorfismo sexual. Ciclo de vida de (A) *Rhodnius ecuadoriensis* y (B) *Panstrongylus chinai*.

Ana Verónica Andrade en Villacís (2006); Mosquera *et al.*, 2016

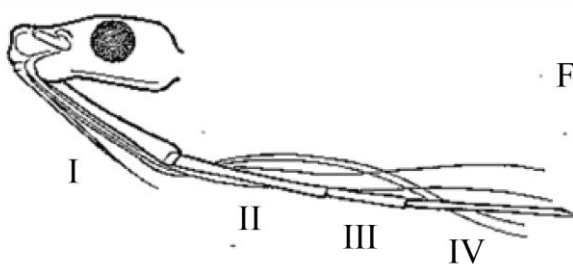
Anexo 4. Diferencias del aparato bucal de distintos hemípteros según el tipo de alimentación al que están adaptados.



Hematófago



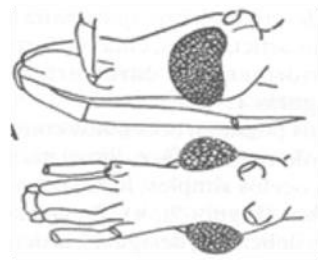
Depredador



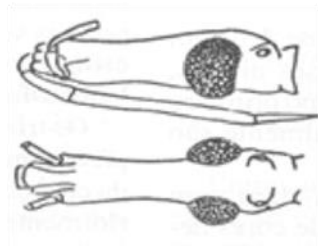
Fitófago

Abad-Franch *et al.*, 2001

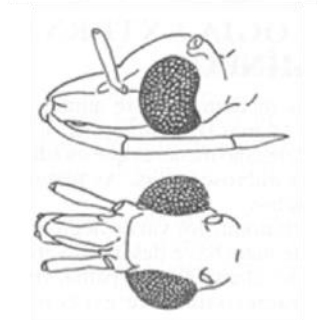
Anexo 5. Comparación de las cabezas de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*.



Rhodnius



Triatoma

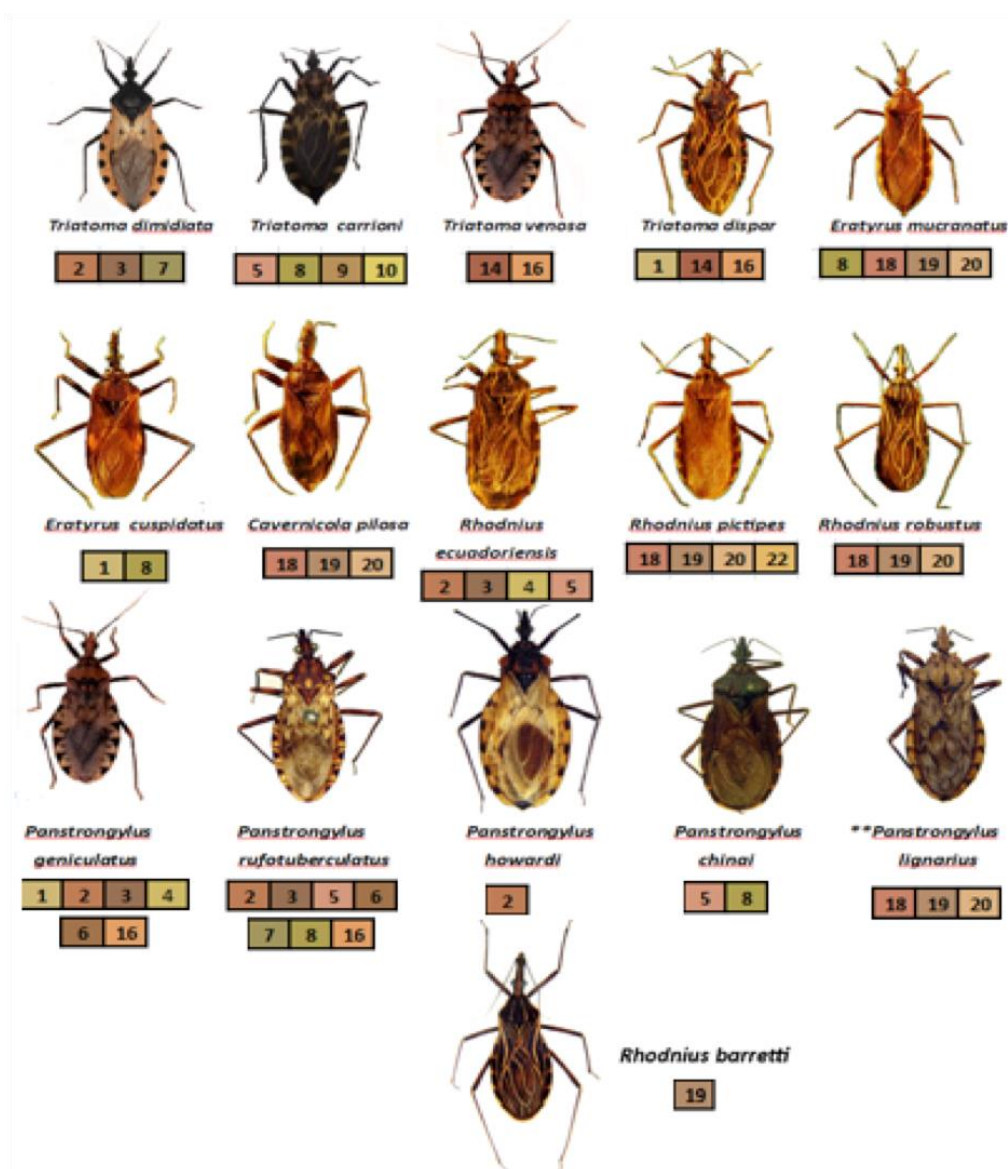


Panstrongylus

Las flechas señalan el lugar de nacimiento de las antenas. Esta característica es fundamental para la diferenciación entre géneros.

Abad-Franch *et al.*, 2001

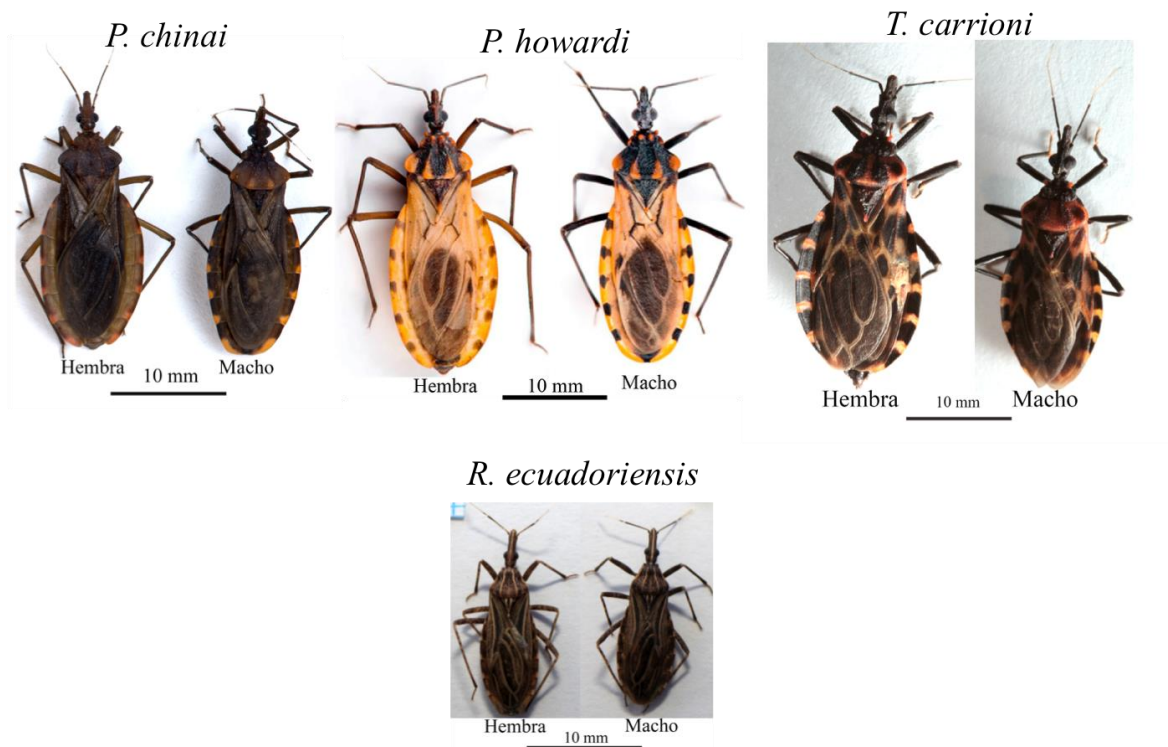
Anexo 6. Especies de triatominos reportados en el Ecuador.



Los números indican las provincias donde cada especie ha sido reportada. Esmeraldas (1), Manabí (2), Guayas (3), Santa. Elena (4), El Oro (5), Santo. Domingo de los Tsáchilas (6), Los Ríos (7), Loja (8), Azuay (9), Cañar (10), Chimborazo (11), Bolívar (12), Tungurahua (13), Cotopaxi (14), Pichincha (15), Imbabura (16), Carchi (17), Sucumbíos (18), Napo (19), Orellana (20), Pastaza (21), Morona Santiago (22), Zamora Chinchipe (23), Galápagos (24).

Padilla, 2016

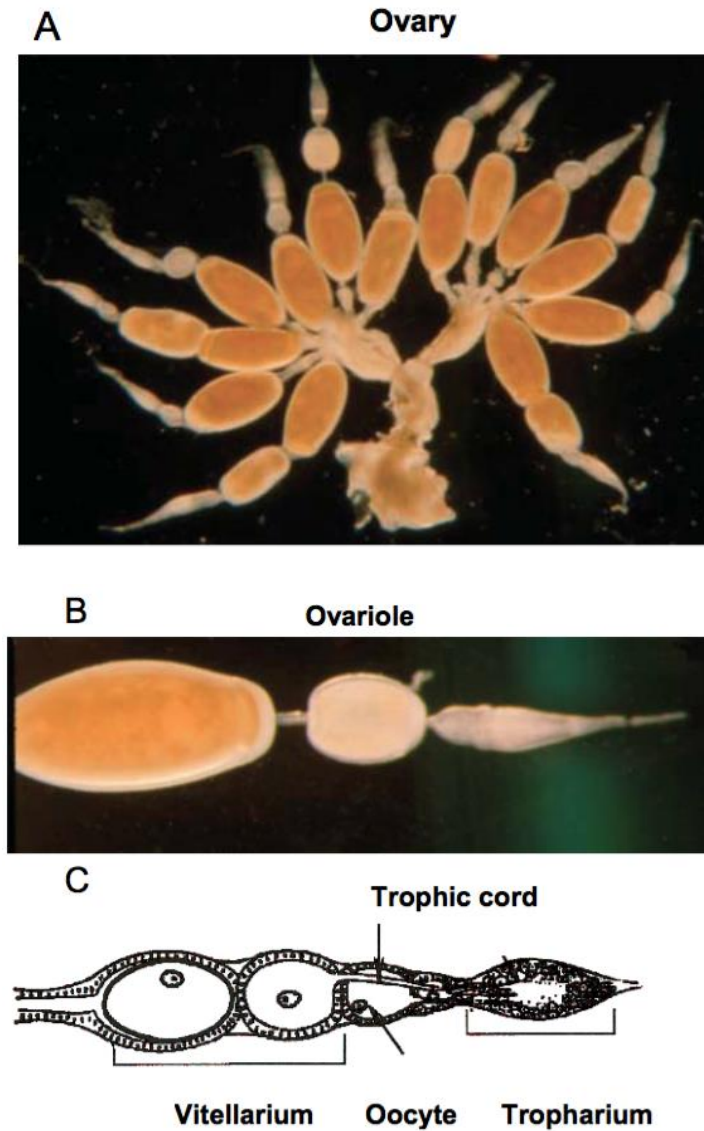
Anexo 7. Morfología del adulto de las especies estudiadas (*Panstrongylus chinai*, *P. howardi*, *T. carrioni*, *R. ecuadoriensis*).



Santillán-Guayasamín (2015); Villacís *et al.*, 2015;

Mosquera *et al.*, 2016; Padilla, 2016

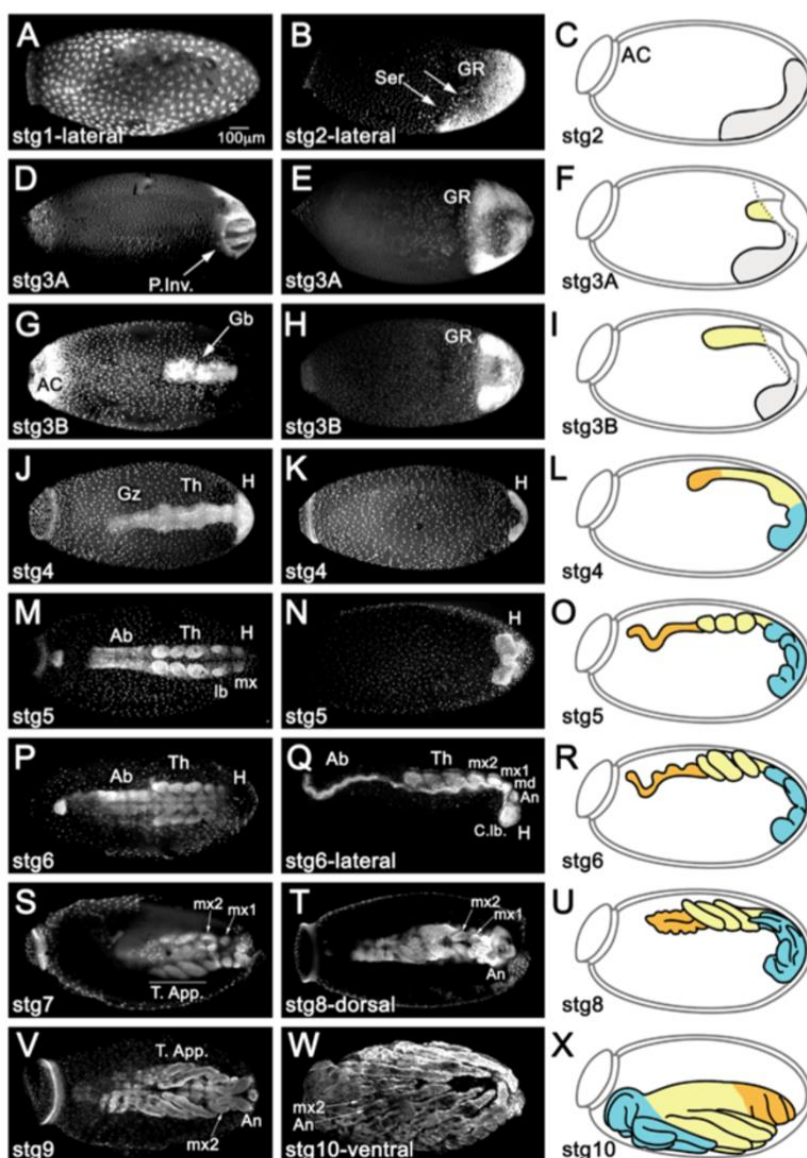
Anexo 8. Ovarios Telotróficos de *Rhodnius prolixus*.



(A) Hemi-ovarios conectados por el oviducto. (B) Ovariole. (C) Esquema del ovariole, donde se señalan sus partes. Cada hembra tiene dos hemi-ovarios formados de siete ovariolos suspendidos en el hemocele.

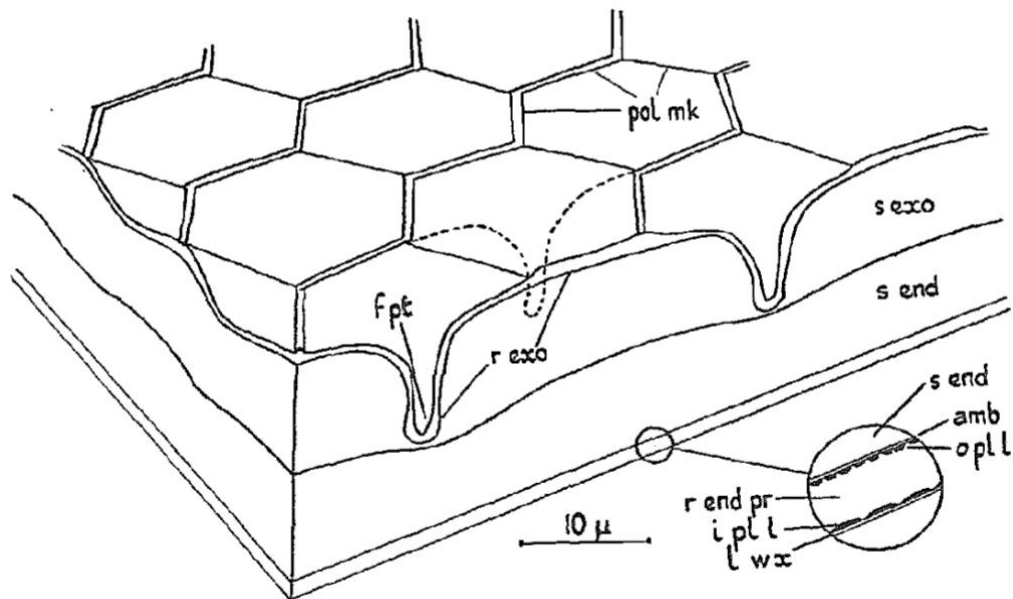
Atella et al., 2005

Anexo 9. Desarrollo embrionario de *Rhodnius prolixus*



(A) Clivaje, núcleos en el periplasma. (B, C) Blastodermo, núcleos en la parte posterior forman el rudimento embrionario (GR). Células que forman la membrana cerosa están en la parte dorso-anterior (Ser). (D-F) Gastrulación, invaginación posterior (P. Inv). (G-I) La banda germinal (Gb) se extiende en dirección céfalo-caudal desde el polo posterior del huevo. (J-L) Segmentación, se visualiza la cabeza (H), el tórax (Th) y la zona de crecimiento (Gz, futura región abdominal). (M-U) El embrión crece, se observa la segmentación en la región abdominal (Ab) y la formación de apéndices torácicos (T.app), maxilares (mx1, mx2) y de las antenas (An). (W-X) Katatrepsis. AC: Anterior cap, md: mandíbula, C.lb.: lóbulos cefálicos.

Anexo 10. Estructura de las envolturas extraembrionarias del huevo de *Rhodnius prolixus*.



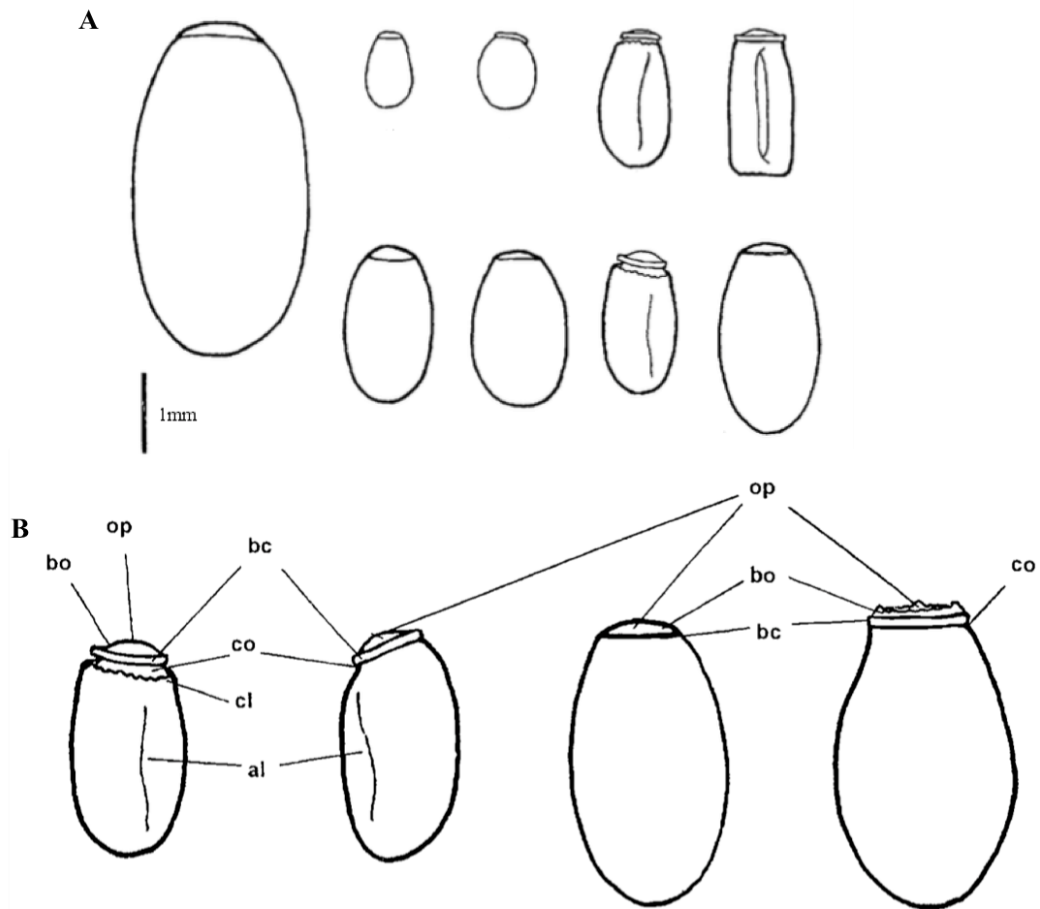
El corion está compuesto por varias capas:

- el exocorion resistente (*rexo*), que en la superficie presenta marcas de polígonos (*pol mk*), cada uno de los cuales tienen un pozo folicular (*fpt*)
- el exocorion suave (*send*)
- el endocorion (*end*) formado por: el endocorion suave (*s end*) y el resistente (*r end*). El *r end* se subdivide en la capa ámbar (*amb*), capa externa de polifenoles (*opll*), capa de proteína resistente (*r end pr*) y capa interna de polifenoles (*ipll*).

Bajo el corion se encuentra la membrana vitelina, que secreta la capa cerosa primaria (*lwl*)

Beament, 1946

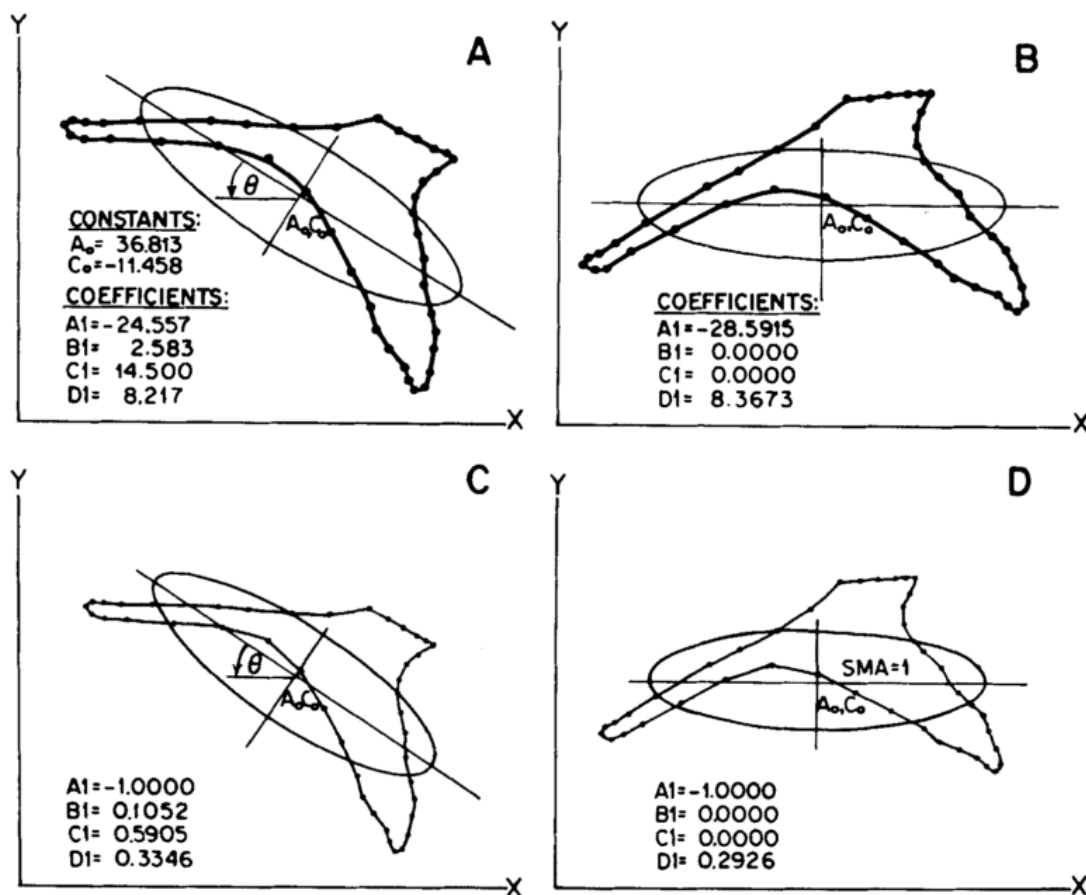
Anexo 11. Huevos de triatominos



(A) Diversidad de formas y tamaños de los huevos triatominos. (B) Esquema que representa las partes de los dos tipos de huevos de los triatominos: huevos con cuello (izquierda) y sin cuello (derecha). **al**: hendidura lateral, **bc**: borde corial, **bo**: borde opercular, **cl**: cuello, **co**: collar, **op**: opérculo.

Barata, 1998

Anexo 12. Ejemplo teórico de la normalización de los coeficientes de Fourier, análisis elíptico de Fourier (EFA)



(A) Figuras digitalizadas sin orientación ni estandarización de tamaño (escalamiento). (B) Figuras orientadas (rotación) sin estandarización de tamaño. (C) Figuras no orientadas con tamaño estandarizado. (D) Figuras orientadas y escaladas.

Lestrel, 1989

Anexo 13. Media global de las variables de morfometría tradicional (LM, DM y DO), usada para determinar el coeficiente de variación (CV) en la comparación interespecífica.

Variable	$\bar{x}\pm SD$ [mm]	Mínimo [mm]	Máximo [mm]
LM	1.845±0.095	1.55	2.1
DM	1.056±0.203	0.67	1.37
DO	0.598±0.056	0.46	0.74

Anexo 14. ANOVA de un factor para establecer las diferencias entre las variables de morfometría tradicional (LM, DM, DO) analizadas de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*.

Variable	Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrados Medios	F	Sig.	CV %
LM	Entre Especies	0.546	3	0.182	24.826	0.00**	4.536
	Dentro de Especies	2.242	306	0.007			
	Total	2.788	309				
DM	Entre Especies	12.046	3	4.015	1 910.393	0.00**	4.235
	Dentro de Especies	0.643	306	0.002			
	Total	12.689	309				
DO	Entre Especies	0.632	3	0.211	198.498	0.00**	5.289
	Dentro de Especies	0.325	306	0.001			
	Total	0.957	309				

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo.

** Variables que presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$).

Coeficiente de variación: $CV = \frac{\sqrt{CM_{dentro\ grupos}}}{\bar{Y}} \times 100$.

\bar{Y} : Media total de cada variable (Anexo 13)

Anexo 15. Diferenciación de los huevos de *Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis* en rangos homogéneos según la significación de las variables tradicionales (LM, DM y DO).

Variables	LM	DM	DO
Especies			
<i>P. chinai</i>	a	a	a
<i>P. howardi</i>	b	a	b
<i>T. carrioni</i>	c	b	c
<i>R. ecuadoriensis</i>	c	c	d

El ANOVA que demuestra la significación de estas variables se detalla en el Anexo 13.

La agrupación de las especies en rangos homogéneos se obtuvo mediante la prueba significativa Honesta de Tuckey (*post hoc*)

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo.

a, b, c, d son los diferentes rangos en que son agrupados las especies.

Anexo 16. Prueba de t de Student para muestras independientes para establecer las diferencias de las variables tradicionales (LM, DM, DO) entre los hábitats intradomiciliar y peridomiciliar donde fueron colectados los parentales de los huevos de *Panstrongylus chinai* y *Triatoma carrioni*.

<i>Panstrongylus chinai</i>				
Variables	N	t	gl	Sig.
LM	58	0.47	56	0.643 ^{NS}
DM	58	1.39	56	0.172 ^{NS}
DO	58	-0.50	56	0.619 ^{NS}
<i>Triatoma carrioni</i>				
Variables	N	t	gl	Sig.
LM	41	-0.52	39	0.608 ^{NS}
DM	41	-0.19	39	0.852 ^{NS}
DO	41	-3.04	39	0.004 ^{**}

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo.

Anexo 17. Prueba de t de Student para muestras independientes para establecer las diferencias de las variables tradicionales (LM, DM, DO, DC) entre las provincias Loja y Manabí donde fueron colectados los parentales de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis*.

Variables	N	t	gl	Sig.
LM	135	-3.41	133	0.001**
DM	135	-2.72	133	0.008**
DO	135	-12.53	133	0.000**
DC	135	-5.66	133	0.000**

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo, DC: diámetro del cuello.

Anexo 18. ANOVA de un factor para establecer las diferencias entre las variables de morfometría tradicional (LM, DM, DO) analizadas de los huevos de *Rhodnius ecuadoriensis* cuyos parentales fueron colectados en los hábitats intradomiciliar y peridomiciliar y silvestre.

Variable	Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrados Medios	F	Sig.	CV
LM	Entre Especies	0.295	4	0.074	14.737	0.000**	3.843
	Dentro de Especies	0.650	130	0.005			
	Total	0.944	134				
DM	Entre Especies	0.056	4	0.014	12.193	0.000**	4.216
	Dentro de Especies	0.149	130	0.001			
	Total	0.205	134				
DO	Entre Especies	0.103	4	0.026	51.252	0.000**	5.967
	Dentro de Especies	0.065	130	0.001			
	Total	0.169	134				
DC	Entre Especies	0.019	4	0.005	8.827	0.000**	6.875
	Dentro de Especies	0.072	130	0.001			
	Total	0.091	134				

LM: longitud máxima, DM: diámetro máximo, DO: diámetro del opérculo.

Coeficiente de variación: $CV = \frac{\sqrt{CM_{dentro\ grupos}}}{\bar{Y}} \times 100$.

\bar{Y} : Media total de cada variable (Tabla 12)

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, María Soledad Santillán Guayasamín, con C.I. 1713499489, autora del trabajo de graduación titulado: "Identificación morfométrica y caracterización de los huevos de cuatro especies de triatomíneos (*Panstrongylus chinai*, *Panstrongylus howardi*, *Triatoma carrioni* y *Rhodnius ecuadoriensis*) en Ecuador, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar al SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior, para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 6 de junio de 2016



María Soledad Santillán Guayasamín

C.I. 1713499489