

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

Análisis preliminar de la estructura genética de poblaciones sinantrópicas de
***Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León) de la provincia de Manabí**

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

SOFIA ISABEL MUÑOZ TOBAR

Quito, 2011

Yo, Dr. Mario J. Grijalva Cobo, certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Sofía Isabel Muñoz Tobar ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas, por tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Quito, 28 de septiembre de 2011

Dr. Mario J. Grijalva Cobo

DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Dr. Mario Grijalva, director de la disertación, por los consejos y apoyo durante la realización de este trabajo. Al Dr. Fernando Abad-Franch, co-director de la tesis, por la ayuda en la planificación y desarrollo de la presente investigación.

A la gente de las comunidades rurales de la provincia de Manabí, por abrirnos las puertas y permitirnos realizar esta investigación. Al personal del Servicio de Erradicación de la Malaria (SNEM), por su apoyo en la colecta de muestras. A David Terán por su apoyo durante la fase de campo.

A los miembros que conforman el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIED), especialmente al Dr. Jaime Costales, Anita Villacís, Esteban Baus, Sofía Ocaña, Alejandra Zurita, Paul Briones y Cesar Yumiseva por sus consejos y apoyo.

Un agradecimiento especial a mi familia, por estar conmigo en que cada paso y por darme ánimo para seguir adelante.

A Andrés Romero por el apoyo incondicional y consejos durante los últimos años.

A José Luis Rivera, Ing. Julio Sánchez y Ana Troya por sus recomendaciones e ideas en el análisis de datos.

A mis amigos, Andrea Zurita, Paola Moscoso, Sisimac Duchicela, Josselyn García, María José Pozo, Gabriela Pozo, Pamela Rivera, José Luis Rivera, Fernanda Latorre, Adriana Argoti, Mauricio Vega, Diego Morales, Diego Páez, Miguel Subía y Sebastián Espinoza por su compañía y apoyo.

Este proyecto fue financiado la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Proyecto ChagasEpiNet y a la Universidad de Ohio.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Abstract	2
3. Introducción	3
3.1. La enfermedad de Chagas	3
3.1.1. Epidemiología y formas de transmisión	3
3.1.2. Etiología y Clínica	4
3.2. Los vectores de la enfermedad de Chagas	6
3.2.1. Triatominae	6
3.2.2. Ciclo de vida y alimentación	7
3.2.3. <i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	8
3.2.4. Reinfestación	9
3.3. Control de la enfermedad	10
3.4. Genética de poblaciones y marcadores moleculares	11
3.4.1. Marcadores moleculares : microsatélites	12
3.4.2. Frecuencias alélicas y Equilibrio Hardy-Weinberg	14
3.4.3. Diversidad genética	15
3.4.4. Estructura poblacional	16
3.5. Justificación	18
3.6. Objetivos	19
3.6.1. General	19
3.6.2. Específicos	19
4. Materiales y Métodos	20
4.1. Fase de campo	20
4.1.1 Área de estudio	20

4.1.2 Recolección de triatominos en el campo	21
4.2. Fase de laboratorio	23
4.2.1 Mantenimiento y procesamiento de triatominos	23
4.2.2 Extracción de ADN	23
4.3. Análisis de microsatélites	24
4.3.1. Transferencia de microsatélites	24
4.3.2. Determinación de alelos	25
4.3.3. Análisis de datos genéticos	26
5. Resultados	31
5.1. Recolección de triatominos e indicadores entomológicos	31
5.2. Transferencia de microsatélites	32
5.3. Diversidad genética	33
5.3.1. Determinación de alelos y frecuencias alélicas	33
5.3.2. Riqueza y diversidad de alelos	34
5.3.3. Heterocigosidad y endogamia	35
5.4. Estructura poblacional	36
5.4.1. Distancias genéticas y aislamiento po distancia	36
5.4.2. Índice de fijación	38
5.4.3. AMOVA y delta de K	39
6. Discusión y Conclusiones	40
6.1. Fase de campo e indicadores entomológicos	41
6.2. Transferencia de microsatélites	43
6.3. Diversida genética y estructura poblacional de <i>R. ecuadoriensis</i> de la provincia de Manabí	45
7. Conclusiones y recomendaciones	49

8. Bibliografía	51
9. Figuras	59
10. TABLAS.....	75
11. ANEXOS.....	94

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 2. Colección de Triatominos en domicilio y peridomicilio.....	61
Figura 3. Colección de Triatominos silvestres	62
Figura 4. Mapa de las localidades en la provincia de Manabí.....	63
Figura 5. Amplificación de los microsatelites L3, L9 y L13.....	64
Figura 6. Amplificación de los microsatelites L25, L43 y L47.....	65
Figura 7. Perfiles de amplificación de los microsatélites de <i>R. pallescens</i> en individuos de <i>R. ecuadoriensis</i> de la provincia de Manabí	66
Figura 8. Perfiles de amplificación de un locus de microsatélites.....	67
Figura 9. Frecuencia de alelos para el microsatélite L13	68
Figura 10. Frecuencia de alelos para el microsatélite L47	69
Figura 11 . PCA utilizando las distancias genéticas (GD).	70
Figura 12. Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS)	71
Figura 13. Correlación de la matriz de distancias genéticas y geográficas (km)	72
Figura 14. Regresión de Distancias Geográficas (km) vs F_{ST}	73
Figura 15. Gráfico del Δ de K para determinar el número de poblaciones de una muestra	74

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Localidades evaluadas en la provincia de Manabí: información geográfica y número de individuos de <i>R. ecuadoriensis</i> analizados por hábitat.....	76
Tabla 2. Información de los microsátélites de <i>Rhodnius pallescens</i>	77
Tabla 3. Número de viviendas infestadas y triatominos en 8 localidades de la provincia de Manabí.....	78
Tabla 4. Indicadores entomológicos para viviendas analizadas en 8 localidades de la provincia de Manabí	79
Tabla 5. Microhábitats silvestres de 8 localidades de la provincia de Manabí	80
Tabla 6. Indicadores entomológicos para microhábitats silvestres para 8 localidades de la provincia de Manabí	81
Tabla 7. Microsátélites de <i>R. pallescens</i> utilizados en poblaciones de <i>R. ecuadoriensis</i> de la provincia de Manabí	82
Tabla 8. Tamaño en pares de bases de los alelos de individuos de <i>R. ecuadoriensis</i> Manabí para las comunidades de Danzarín (DZ), Tablada del Algodón (TO) y Chande- San Francisco (CF) de la provincia de Manabí	83
Tabla 9. Tamaño en pares de bases, de los alelos de individuos de <i>R. ecuadoriensis</i> para las comunidades del norte de Manabí Chita- El Remojo- Río Canoa-Estero Seco (CRES) y El Bejuco (BJ) de la provincia de Manabí.	85
Tabla 10. Frecuencia de alelos para los microsátélites L13 y L47 en individuos <i>R. ecuadoriensis</i> de la provincia de Manabí	86
Tabla 11. Riqueza Alélica (definida como alelos/N)	87
Tabla 12. Test estadísticos de parámetros genéticos y ecológicos, para las poblaciones silvestres y sinantrópicas de la provincia de Manabí	88

Tabla 13. Diversidad Alélica (promedio de alelos por locus)	89
Tabla 14. Equilibrio Hardy- Weinberg por locus	90
Tabla 15. Análisis de similaridad (ANOSIM) utilizando distancias genéticas	91
Tabla 16. Análisis de la Varianza Molecular	92
Tabla 17. Cálculo del Δ de K para todas las muestras.....	93

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN con el kit DNeasy	95
Anexo 2. Individuos silvestres de la comunidad de El Bejuco	96
Anexo 3. Individuos sinantrópicos de la comunidad de El Bejuco	99
Anexo 4. Individuos silvestres de la comunidad Danzarín	102
Anexo 5. Individuos sinantrópicos de la comunidad de Danzarín	106
Anexo 6. Individuos silvestres de la comunidad Tablada del Algodón	109
Anexo 7. Individuos sinantrópicos de la comunidad Tablada del Algodón	113
Anexo 8. Individuos silvestres de las comunidades de Chande y San Francisco	116
Anexo 9. Individuos sinantrópicos de las comunidades de Chande - San Francisco ...	119
Anexo 10. Individuos silvestres de las comunidades de Chita- Río Canoa- Estero Seco	122
Anexo 11. Análisis de la estructura poblacional usando el programa Arlequín.....	125

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas (ECh) es una infección parasítica causada por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*, que se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta la Argentina. *Rhodnius ecuadoriensis*, el vector más importante en la transmisión de la ECh en el Ecuador, se encuentra tanto en microhábitats artificiales como silvestres. El presente estudio se llevó a cabo en 8 comunidades de la provincia de Manabí, con el objetivo de evaluar la aplicabilidad de microsatélites diseñados para *Rhodnius pallescens* en el análisis de genética de poblaciones de *R. ecuadoriensis*, y así determinar si existe o no estructuración genética entre poblaciones sinantrópicas y silvestres de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí. Se evaluaron seis microsatélites, pero sólo dos marcadores resultaron polimórficos, dos fueron difíciles de interpretar y dos fueron marcadores monomórficos. Los microsatélites polimórficos, L13 y L47, no mostraron diferenciación significativa entre los ecotopos sinantrópicos y silvestres ni entre localidades ($F_{ST} = 0.08$; $p = 0.05$). Esto sugiere que las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Manabí presentan un alto flujo génico que les permite mantener la conectividad entre poblaciones y conformar una sola metapoblación. Esto es consistente con los resultados de estudios morfológicos con individuos de esta especie recolectados en el cantón Portoviejo y de estudios realizados en *Rhodnius prolixus* de Venezuela, donde no se encontró estructuración poblacional. Los resultados obtenidos marcan una pauta para el desarrollo de microsatélites específicos para *R. ecuadoriensis*, lo que permitirá complementar el presente estudio y ampliar el análisis de la dinámica poblacional de este vector.

Palabras claves: enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, *Rhodnius ecuadoriensis*, genética de poblaciones, estructuración genética, microsatélites.

2. ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a parasitic infection caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. The disease is distributed from southern United States to Argentina. *Rhodnius ecuadoriensis*, the most important CD vector in Ecuador, occurs in both artificial and sylvatic habitats. This study was conducted in 8 communities in the province of Manabí, aiming to assess the applicability of microsatellites designed for *Rhodnius pallescens* to determine whether there is genetic differentiation among synanthropic and wild populations of *R. ecuadoriensis*. We evaluated six microsatellites, but only two markers were polymorphic in *R. ecuadoriensis*, two were difficult to read and the other two were monomorphic markers. Polymorphic microsatellites L13 and L47 showed no significant differences between synanthropic and sylvatic populations or among localities ($F_{ST} = 0.08$; $p = 0.05$). This suggests high rates of gene flow among *R. ecuadoriensis* populations in Manabí, which probably represent a single metapopulation. This lack of population genetic structuring is consistent with morphological analyses of *R. ecuadoriensis* specimens from Manabí and data from *R. prolixus* in Venezuela. The results presented here open the way for the development of specific microsatellites for *R. ecuadoriensis*, and therefore for the detailed study of the population dynamics of this local CD vector.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, *Rhodnius ecuadoriensis*, population genetics, genetic structure, microsatellites.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y FORMAS DE TRANSMISIÓN

La Enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis americana es una enfermedad producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y transmitida principalmente a través de las heces de insectos vectores pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae (WHO, 2002). Esta enfermedad fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, quien describió la enfermedad humana, el parásito y el vector (Rodríguez y Pinto, 2009).

La transmisión vectorial constituye la principal forma de transmisión, aunque la ECh también puede ser adquirida a través de transfusiones sanguíneas, por vía oral, por transmisión congénita durante el embarazo o el parto y mediante trasplantes de órganos de pacientes portadores de la enfermedad (WHO, 2002; Teixeira *et al.*, 2006).

La transmisión vectorial de la ECh es exclusiva del continente americano, donde se encuentra presente desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina. La ECh afecta a entre 8 y 11 millones de personas (WHO, 2002; CDC, 2011). En el Ecuador, la enfermedad es endémica en la Amazonia, la Costa y las regiones subtropicales de los Andes. Se estima que alrededor de 230.000 personas están infectadas con el parásito (PAHO, 2006).

3.1.2. ETIOLOGÍA Y CLÍNICA

3.1.2.1. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un parásito hemoflagelado de la familia Trypanosomatidae, agente causal de la ECh. Se encuentra presente en casi toda Latinoamérica, donde mamíferos silvestres y domésticos sirven como reservorio del parásito (Roberts y Janovy, 2005).

Los tripanosomátidos cambian su morfología dependiendo de la fase del ciclo de vida, que transcurre en el intestino del insecto vector y los tejidos del hospedero parasitado (Figura 1). Su ciclo de vida involucra cuatro formas morfológicas básicas: (i) Epimastigote: forma replicativa del parásito presente en el intestino medio del vector; (ii) Trypomastigote metacíclico: es una forma no replicativa presente en la porción posterior del intestino del vector. Esta forma es infectiva y se encuentra en las heces del triatomino, ingresa al torrente sanguíneo de su hospedero a través de heridas o membranas mucosas. (iii) Trypomastigote sanguíneo: forma extracelular y no replicativa presente en la sangre periférica de los hospederos mamíferos, *T. cruzi* parasita una gran variedad de células nucleadas. Dentro de la célula se transforma en (iv) Amastigote: formas intracelulares de replicación, localizados en células de tejidos de los hospederos mamíferos. Altas cantidades de amastigotes forman un pseudoquiste, donde se originan formas intermedias y trypomastigotes que escapan de la célula hacia el torrente sanguíneo para infectar otras células del hospedero (Figura 1) (Tyler y Engman, 2001; Roberts y Janovy, 2005; CDC, 2011).

En el Ecuador se estima que la prevalencia de la infección con *T. cruzi* es de 1,4%. En la región de la Costa esta alcanza el 2%, mientras que en la Sierra es de 0,7% y en la Amazonia 1,2% (Abad-Franch y Aguilar, 2003).

3.1.2.2. CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

La ECh se desarrolla en dos fases, una aguda y una crónica. La fase aguda se inicia cuando el parásito ingresa en el organismo a través de heridas, membranas mucosas o conjuntiva, y se caracteriza por la presencia del parásito en la sangre (Teixeira *et al.*, 2006). Esta fase tiene una duración de 6 a 8 semanas y, cuando es sintomática, se evidencia por la aparición de fiebre, dolor de cabeza, malestar general, signo de Romaña (edema bipalpebral unilateral) y anormalidades cardíacas (WHO, 2002). El diagnóstico clínico de esta fase es difícil dado que el 95% de los casos son asintomáticos (Teixeira *et al.*, 2006).

La fase crónica de la enfermedad se inicia con una caída del nivel de parasitemia a niveles no detectables. Esta fase se manifiesta de tres formas: indeterminada, cardíaca y digestiva. La forma crónica indeterminada es asintomática, mientras que las principales manifestaciones de la forma cardíaca son insuficiencia cardíaca, cardiomegalia, determinadas arritmias y accidentes tromboembólicos. Estas lesiones se agravan progresivamente y están asociadas con una alta mortalidad. La forma digestiva afecta principalmente al colon y al esófago (WHO, 2002). La enfermedad posee un gran impacto social y económico, relacionado con la pérdida de productividad laboral, sobre todo en la fase crónica, altos gastos de atención a los pacientes crónicos, y mortalidad específica (Dias *et al.*, 2002; de Oliveira, 2009).

3.2. LOS VECTORES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.2.1. TRIATOMINAE

Los insectos vectores de la ECh pertenecen a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Dentro de este grupo existen 5 tribus: Alberproseniini, Cavernicolini, Rhodniini, Bolboderini y Triatomini. En el continente americano existen 15 géneros y más de 140 especies de triatominos, muchas de las cuales son portadoras del protozooario flagelado *T. cruzi* (Galvão, 2003; Marquardt *et al.*, 2005; Schofield y Galvão, 2009).

Dentro de la tribu Triatomini y Rhodniini se encuentran los principales géneros y especies de importancia en salud pública (Marquardt *et al.*, 2005). Los principales vectores de la ECh en Latinoamérica pertenecen al género *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (CDC, 2011).

En el Ecuador se han registrado 16 especies de triatominos. Los principales vectores de la ECh en el Ecuador pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*. En las provincias costeras de Guayas, Manabí y El Oro, el principal vector es *Triatoma dimidiata*, seguido por *Rhodnius ecuadoriensis* (Aguilar *et al.*, 1999; Yadón *et al.*, 2006).

Los vectores de la ECh, también conocidos como triatominos o (en el Ecuador) chinchorros, son insectos hematófagos, de coloración oscura y bandas amarillas, rojas o naranjas en el conexivo y patas. Los triatominos poseen pronoto largo y escutelo triangular que separa en su base a los dos hemiólitros (Lent y Wygodzinsky, 1979; Schofield, 1994).

La cabeza es subcilíndrica o subcónica con una constricción en la parte posterior similar a un cuello, y posee una probóscide corta compuesta por tres segmentos en forma de estilete, lo cual le permite penetrar en tejidos blandos como la piel de vertebrados (Carcavallo *et al.*, 1999; Marquardt *et al.*, 2005; Triplehorn y Jonhson, 2005).

3.2.2. CICLO DE VIDA Y ALIMENTACIÓN

Los triatominos, para completar su ciclo biológico, requieren de 3 meses a 2 años, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales (Marquardt *et al.*, 2005). Tanto el macho como la hembra son hematófagos, y requieren de sangre para nutrirse y para la producción de huevos. La hembra pone, dos semanas después de la cópula, huevos ovoides, de color blanco o rosado que eclosionan después de 10 a 40 días, dependiendo de la temperatura (Schofield, 1994; Marquardt *et al.*, 2005). Los triatominos pasan por cinco estadios ninfales que pueden diferenciarse por el tamaño de la cápsula cefálica y el ancho de las patas (Schofield, 1994).

Los Triatominae se alimentan de la sangre de vertebrados silvestres o domésticos, como gallinas, palomas, cuyes u otros animales; algunas especies pueden también alimentarse de la hemolinfa de otros invertebrados (Carcavallo *et al.*, 1998; Lehane, 2005). El calor y CO₂ generado por los hospederos sirven como señales de orientación, y son captados a través de órganos sensoriales antenales, que cumplen un rol fundamental durante el proceso de alimentación (Schofield, 1994).

3.2.3. *Rhodnius ecuadoriensis*

Rhodnius ecuadoriensis es uno de los vectores más importantes de la ECh en el Ecuador (Aguilar *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2001; Grijalva *et al.*, 2009; 2011). Está presente en las provincias del centro y sur de la región de los Andes y su distribución se extiende hasta la región de la Costa y el norte del Perú. Esta especie se encuentra tanto en ambientes artificiales (domésticos y peridomésticos) como silvestres; las poblaciones silvestres parecen estar asociadas a una especie endémica de palma, *Phytelephas aequatorialis*, en la costa central y las estribaciones occidentales de los Andes (Abad-Franch *et al.*, 2001; Villacís *et al.*, 2008; Suárez *et al.*, 2010).

Los individuos de esta especie se caracterizan por ser de color café claro y poseer manchas oscuras con forma de rayas pequeñas e irregulares en el cuerpo y apéndices. El tamaño del macho está entre los 12.5 y 13.5 mm, mientras que la hembra mide aproximadamente 14.5 mm (Lent y Wygodzinsky, 1979). Su ciclo de vida, bajo condiciones de laboratorio, oscila entre los 190 ± 20 días para los individuos de Manabí, y 181 ± 6 para los individuos de Loja (Villacís *et al.*, 2008). Las colonias de *R. ecuadoriensis* suelen estar asociadas a nidos de gallinas y otras aves, madrigueras de ratones, ardillas y marsupiales, cuyeras y árboles huecos (Lent y Wygodzinsky, 1979; Abad-Franch *et al.*, 2002; Grijalva *et al.*, 2005; 2011).

Las condiciones ambientales pueden influir en los caracteres morfológicos de los triatominos (Schofield *et al.*, 1999). En el caso de *R. ecuadoriensis*, se ha observado que el tamaño de los individuos, la geometría de los hemiólitros y el fenotipo de las antenas podrían variar dependiendo de la región geográfica o de otros factores ambientales, tal vez

como consecuencia de la adaptación a ambientes domésticos y peridomésticos (Villacís *et al.*, 2008; 2010). El análisis fenotípico de antenas y alas de poblaciones de la provincia Manabí muestra que las poblaciones sinantrópicas (asociadas ecológicamente al hombre) y las silvestres son similares; sin embargo, las diferencias entre ambas poblaciones son importantes en la provincia de Loja (di Castri, 1990; Villacís *et al.*, 2010).

R. ecuadoriensis actúa como vector primario o secundario. La especie se encuentra en altas densidades poblacionales en ambientes artificiales de las provincias de Loja y Manabí, donde los animales domésticos son un factor importante en los procesos de infestación y reinfestación (Grijalva *et al.*, 2005; 2011; Villacís *et al.*, 2008). Este triatomino es el vector secundario en algunas provincias costeras y está presente tanto en ambientes silvestres y en domiciliarios cuando el vector primario ha sido erradicado, como en la provincia de Manabí donde *Triatoma dimidiata* se reporta como vector primario de la ECh (WHO, 2002; Yadón *et al.*, 2006).

3.2.4. REINFESTACIÓN

Algunos vectores de la ECh pueden colonizar ambientes artificiales (peridomicilio e intradomicilio) (Schofield *et al.*, 1999). El control de estas poblaciones de vectores por medio de la aplicación de insecticidas de acción residual en los domicilios es muy eficiente (Schofield, 1994). Sin embargo, es frecuente que las viviendas sean reinfestadas una vez que desaparece el efecto residual del insecticida. Se ha observado que después de la aplicación de insecticidas residuales, las estructuras cercanas/anexas al domicilio (el ‘peridomicilio’) son las primeras en que la infestación reaparece, por disponibilidad de refugios y hospederos (Cécere *et al.*, 2003; 2004; Grijalva *et al.*, 2011). La reinfestación

puede deberse a la existencia de focos residuales o preexistentes de vectores que escapan al rociado o a la llegada de triatominos desde otros lugares, sea por transporte pasivo o por dispersión activa (Gürtler, 1999b; Cécere *et al.*, 2006). La prevalencia y densidad de triatominos en áreas domiciliarias se encuentra asociada con el tipo de materiales de construcción utilizados y con la disponibilidad de refugios y hospederos (Gürtler, 1999b; Cécere *et al.*, 2003; 2004).

Los estudios de infestación/reinfestación permiten clarificar la dinámica poblacional de los vectores de la ECh. Ya sea a través de la utilización de marcadores moleculares o morfometría geométrica, es posible realizar inferencias acerca del origen de la población reinfestante (nueva o residual) y el grado de conectividad con relación a otras poblaciones (Abad-Franch y Monteiro, 2005).

3.3. CONTROL DE LA ENFERMEDAD

La prevención de la ECh depende principalmente de control del insecto vector (Lent y Wygodzinsky, 1979), responsable de la inmensa mayoría de casos de contagio (Cook y Zumla, 2009). Las medidas de control de la ECh en los países Andinos se encuentran enfocadas al rociamiento con insecticidas piretroides residuales y al control de calidad de los hemoderivados (Marquardt *et al.*, 2005; Guhl, 2007). El control vectorial ha reducido la incidencia de la ECh en áreas de alta prevalencia (Abad-Franch *et al.*, 2011). Uno de los principales retos que enfrentan los países con campañas de control vectorial es la presencia de focos residuales, presentes en el peridomicilio y áreas silvestres cercanas a las viviendas que permiten la recolonización después de la aplicación del insecticida (Marquardt *et al.*, 2005).

El rociamiento con piretroides ha demostrado ser el método más efectivo en la eliminación de focos de infestación domiciliar; el control vectorial a largo plazo requiere, sin embargo, sistemas de vigilancia longitudinal cuya eficiencia aumenta de forma notable cuando se emplean estrategias participativas (Abad-Franch *et al.*, 2011).

En el Ecuador se han realizado en los últimos años programas focales de rociamiento con insecticidas residuales para el control de la transmisión vectorial, en conjunto con investigación entomológica y epidemiológica, control en los bancos de sangre y atención a personas portadoras de la ECh (PAHO, 2006). Sin embargo, la ausencia de medidas preventivas en muchas zonas con transmisión activa determinó que alrededor de 4400 personas adquiriesen la ECh cada año (Yadón *et al.*, 2006).

3.4. GENÉTICA DE POBLACIONES Y MARCADORES MOLECULARES

El uso de marcadores moleculares ha abierto nuevas posibilidades para el estudio de las dinámicas ecológicas y evolutivas de especies y poblaciones de organismos. Estos marcadores permiten cuantificar la diversidad genética, inferir el movimiento de individuos entre poblaciones o localidades, cuantificar el nivel de endogamia de una especie, caracterizar nuevas especies y estudiar los patrones históricos de dispersión de las mismas (Freeland, 2005). Se han desarrollado varios tipos de marcadores moleculares para detectar y caracterizar variaciones en la secuencia del ADN, incluyendo RFLPs (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción), minisatélites, microsátélites, RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), ISSR (Repetición de Secuencia Intergénica Simple), IRAP (Polimorfismo Amplificado entre Retrotransposones) o AFLP (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) (Schlötterer, 2004).

Los vectores transmisores de la ECh presentan alta plasticidad fenotípica (Lent y Wygodzinsky, 1979; Dujardin *et al.*, 2009), influenciada por factores ecológicos asociados a la adaptación a nuevos nichos, como la transición de un ambiente selvático al domiciliario, el cual genera cambios morfológicos rápidos (Dujardin *et al.*, 2009; Schofield *et al.*, 1999; Villacís *et al.*, 2010). Los marcadores moleculares permiten caracterizar e identificar poblaciones de vectores con el fin de definir lugares de control de la ECh, al trazar la colonización del vector desde poblaciones silvestres y peridomiciliares (puntos de infestación / reinfestación) (Abad-Franch y Monteiro, 2005; Harry *et al.*, 2008). En el presente estudio se escogió un panel de 6 microsatélites para estudiar la variabilidad y estructuración genética de poblaciones sinantrópicas y silvestres de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí.

3.4.1. MARCADORES MOLECULARES: MICROSATÉLITES

Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN distribuidas a lo largo del genoma nuclear que se caracterizan por su alta variabilidad y pueden, por tanto, ser utilizados como marcadores moleculares (Ellegren, 2004). Estos marcadores son neutrales y se encuentran en zonas no codificantes del ADN, como secuencias intergénicas e intrones (Ellegren, 2004). Un microsatélite tiene una longitud de 1-6 pares de bases y N repeticiones. El número de microsatélites por genoma se encuentra correlacionado positivamente con el tamaño del genoma (Ellegren, 2004). Estos marcadores neutrales constituyen, en la actualidad, una herramienta ampliamente utilizada en estudios de genética de poblaciones, y permiten el análisis de eventos tales como migración, flujo génico y análisis de parentesco (Selkoe y Toonen, 2006).

3.4.1.1. MICROSATÉLITES DE LA TRIBU RHODNIINI

Harry *et al.* (1998) desarrollaron microsatélites para la especie *R. pallescens* con el objetivo de analizar la estructura genética de poblaciones sinantrópicas y silvestres y estudiar los procesos de recolonización. Estos microsatélites fueron probados en otras especies del género *Rhodnius*, incluyendo *R. ecuadoriensis*, con resultados positivos y la amplificación de seis de diez microsatélites elaborados, sin más detalles relacionados a la genética de poblaciones de esta especie (Harry *et al.*, 1998; 2008).

El uso de microsatélites permitió analizar las relaciones genéticas entre poblaciones de *R. prolixus* y *R. robustus* de Venezuela (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Con estos estudios se comprobó la existencia de flujo génico entre las poblaciones domésticas, peridomésticas y silvestres de *R. prolixus* de la misma localidad; sin embargo, cuando se compararon 33 poblaciones geográficamente alejadas (entre 100 -200 km aproximadamente), los resultados sugirieron que existe aislamiento y deriva génica entre poblaciones pertenecientes a diferentes departamentos de Venezuela (Lara, Cojedes y Trujillo) (Fitzpatrick *et al.*, 2008; 2009).

Los antecedentes descritos acerca de las poblaciones de *Rhodnius* de Colombia y, en especial, Venezuela, nos llevan a preguntarnos si la reinfestación de viviendas por *R. ecuadoriensis* en la Costa ecuatoriana está determinada por dinámicas comparables. En particular, este proyecto examinará las relaciones entre poblaciones silvestres y sinantrópicas de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí, utilizando un panel de microsatélites y las herramientas analíticas de la genética de poblaciones.

3.4.2. FRECUENCIAS ALÉLICAS Y EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

Un alelo representa una de las variantes de un gen o secuencia que ocupa la misma posición o locus en cromosomas homólogos (Smith y Smith, 2005). La diversidad alélica (el número promedio de alelos por locus) es una medida utilizada para cuantificar la diversidad genética dentro de una población. (Freeland, 2005). Las mutaciones, alteraciones en la secuencia de uno o más nucleótidos, generan variabilidad en el pool genético (Smith y Smith, 2005). Aunque la riqueza alélica (el número total de alelos observado en una población) está influenciada por el tamaño de la muestra (en un mayor número de muestras habrá un mayor número de alelos), la cuantificación del número de alelos únicos en una población dada ayuda a reducir el sesgo en las estimaciones de riqueza alélica (Kalinowsky, 2004). Se conoce que poblaciones de *R. prolixus* de Venezuela presentaron una baja diversidad alélica (9 alelos en 33 poblaciones), por lo que es importante conocer el estatus sobre la diversidad alélica de la especie en estudio (Fitzpatrick *et al.*, 2008).

El estado de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), basado en principios de la herencia mendeliana, predice que las frecuencias alélicas en una población no cambian en sucesivas generaciones (Smith y Smith, 2005; Hamilton, 2009) siempre que (i) no exista selección natural, migración ni mutación y (ii) el apareamiento sea aleatorio. Considerando que las frecuencias de los genotipos se encuentran en función de la frecuencia de los alelos (Wigginton, 2005), las frecuencias de los genotipos (para un locus con dos alelos) de una población en HWE siguen la relación $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, donde p^2 representa la frecuencia de genotipos homocigotos para el alelo dominante (AA), q^2 la frecuencia de genotipos

homocigotos para el alelo recesivo (aa) y $2pq$ la frecuencia de genotipos heterocigotos (Aa) (Freeland, 2005; Hamilton, 2009).

Desviaciones de las frecuencias esperadas bajo el HWE en una población son, por tanto, indicativas de eventos como apareamiento no aleatorio (endogamia u otra forma de selección de parejas), presiones selectivas o mutaciones en el locus de interés, fragmentación de la población en subunidades de pequeño tamaño o migración de individuos entre poblaciones (Wigginton, 2005; Frankham *et al.*, 2002). La desviación de la HWE fue observada en otras especies de triatomíneos por un déficit de heterocigotos (Fitzpatrick *et al.*, 2008). También se debe tener en cuenta que en ocasiones, las frecuencias de los alelos de un locus cambian simplemente porque las frecuencias alélicas de otro locus cercano, al cual el primero está “ligado”, cambian (por ejemplo, porque se encuentran bajo selección natural); este fenómeno, conocido como “desequilibrio de ligación” (DL; *linkage disequilibrium* en inglés), se produce generalmente por la proximidad física de los loci ligados en el cromosoma, aunque puede aparecer también en poblaciones con alto grado de endogamia (Hamilton, 2009; Beebe y Rowe, 2008). En genética de poblaciones, el DL (la asociación no aleatoria de los alelos en dos o más loci) se utiliza como una medida del grado de recombinación (Hamilton, 2009).

3.4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética en de una población dada puede medirse en términos de: (i) heterocigosidad esperada (H_e), que es la fracción de heterocigotos esperada en una población en HWE; al comparar este valor con la heterocigosidad observada (H_o) en la población, se puede determinar si ésta se encuentra en equilibrio o presenta deficiencia o

exceso de heterocigotos; (ii) riqueza y diversidad alélicas (respectivamente, el número de alelos y el promedio de alelos por locus en la población estudiada); (iii) el número o proporción de loci polimórficos (loci con más de un alelo) (Freeland, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2008); y (iv) índice de endogamia (F_{IS}), que permite inferir acerca de la diversidad en términos comparativos: subpoblaciones más endogámicas son menos diversas (tienen, en promedio, relativamente menos heterocigotos) (Freeland, 2005).

3.4.4. ESTRUCTURA POBLACIONAL

Existen varias maneras de cuantificar el grado de estructuración/ diferenciación de un conjunto de poblaciones y subpoblaciones. En general, se utilizan índices que miden el nivel de flujo génico, divergencia y asociación (Freeland, 2005; Hamilton, 2009).

F_{ST} es un índice que mide la diferenciación genética entre dos subpoblaciones permitiendo evaluar la existencia e intensidad de flujo génico entre ellas. F_{ST} toma valores entre 0 (panmixia) y 1 (máxima divergencia genética con fijación de alelos en cada subpoblación) (Freeland, 2005). Individuos de la especie *R. prolixus* presentaron valores bajos de este índice ($F_{ST} = 0.04 - 0.02$), con excepción de pocas localidades que exhiben una mayor diferenciación (Fitzpatrick *et al.*, 2008).

F_{IS} es un coeficiente de endogamia utilizado para cuantificar la heterocigosidad en una población. Este coeficiente varía entre 0 (población completamente exogámica en que 50% de los individuos son homocigotos y 50% heterocigotos [$AA + aa = 50\%$, $Aa = 50\%$]) y 1 (población con 100% de endogamia en la que todos los individuos son homocigotos [$AA + aa = 100\%$]) (Freeland, 2005). Estudios realizados en la subfamilia Triatominae

han mostrado una gran variabilidad con respecto a este índice, probando que *T. infestans* y *R. prolixus* presentan poblaciones exogámicas, y por otro lado algunas poblaciones de *T. infestans* poseen altos niveles de endogamia (Marcet *et al.*, 2006; Fitzpatrick *et al.*, 2008).

El Análisis de la Variancia Molecular o AMOVA es un ANOVA anidado que permite analizar la partición de la diversidad genética en diferentes niveles jerárquicos de división poblacional (Sánchez-Otero, 2007): continentes, regiones geográficas, poblaciones dentro de una región e individuos dentro de una población (Freeland, 2005). En poblaciones altamente estructuradas, la mayor parte de la variabilidad genética se encuentra entre las subpoblaciones, que están genéticamente muy diferenciadas; en poblaciones panmícticas, la mayor variabilidad se encuentra entre los individuos dentro de las subpoblaciones, con bajo nivel de diferenciación genética entre estas últimas. Con relación a individuos del género *Rhodnius*, poblaciones de *R. prolixus* de Venezuela mostraron una mayor variabilidad dentro de poblaciones (Fitzpatrick *et al.*, 2008).

En genética de poblaciones, la prueba de Mantel se utiliza con frecuencia para estimar el grado de correlación entre los valores de F_{ST} (que representa en grado de aislamiento/diferenciación genética entre pares de poblaciones) y las distancias geográficas que separan pares de poblaciones (Fitzpatrick, 2008). Esta prueba permite examinar la hipótesis de que poblaciones más distantes entre sí tienen, simplemente por efecto de la separación geográfica, menor probabilidad de ser genéticamente homogéneas porque la probabilidad de intercambio de migrantes (flujo génico) disminuye con la distancia. El efecto de aislamiento por distancia se observó en algunas poblaciones de *R. prolixus* de Venezuela, por lo que nos preguntamos si *R. ecuadoriensis* tiene el mismo patrón de aislamiento.

3.5. JUSTIFICACIÓN

Rhodnius ecuadoriensis es uno de los vectores más importantes en la transmisión de la ECh en el Ecuador (Aguilar *et al.*, 1999; Abad-Franch *et al.*, 2001; Villacís *et al.*, 2008). Siendo la transmisión vectorial una de las principales formas de contagio de la ECh, los estudios acerca de los vectores de la ECh son de gran importancia para diseñar estrategias eficientes de control y prevención (Cécere *et al.*, 2004; 2006; Guhl, 2007).

La presente investigación permitirá ampliar el conocimiento sobre uno de los principales vectores de la ECh en el Ecuador, *R. ecuadoriensis*. Para ello (a) se evaluará la utilización de microsatélites diseñados para *Rhodnius pallescens* en poblaciones de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí y (b) se analizará la diversidad y estructuración genética de poblaciones con características ecológicas distintivas (silvestres *vs.* sinantrópicas).

Estos estudios permitirán conocer la dinámica de poblaciones del vector, abriendo la posibilidad de caracterizar de forma objetiva los procesos de infestación y reinfestación de viviendas por el mismo. Este conocimiento, a su vez, servirá para fortalecer la planificación de estrategias de control vectorial más efectivas para las zonas donde *R. ecuadoriensis* es responsable de la ECh.

3.6. OBJETIVOS

3.6.1. GENERAL:

- Evaluar, utilizando microsatélites, la diversidad y las relaciones entre poblaciones silvestres y sinantrópicas de *Rhodnius ecuadoriensis* de la provincia de Manabí.

3.6.2. ESPECÍFICOS:

- Evaluar la aplicabilidad de microsatélites diseñados para *Rhodnius pallescens* para el estudio de la genética de poblaciones de *R. ecuadoriensis*.
- Cuantificar la variación intraespecífica de poblaciones silvestres y sinantrópicas de *R. ecuadoriensis*, evaluando si las preferencias ecológicas de cada población están asociadas con los patrones de heterogeneidad genética.
- Determinar el grado de estructuración genética de las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Manabí, enfatizando el estudio de las relaciones entre poblaciones silvestres y sinantrópicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. FASE DE CAMPO

4.1.1 ÁREA DE ESTUDIO

La presente investigación se enfocó en la genética poblacional de *Rhodnius ecuadoriensis* de la provincia de Manabí, donde la ECh es endémica (Grijalva *et al.*, 2011). Se sabe, a través de datos epidemiológicos e históricos, que esta es una zona de alta prevalencia de la enfermedad. Se estima, de un total de 1.186.025 habitantes, 17.790 están infectados por *T. cruzi*, lo cual correspondería una prevalencia de 1,2% de la población (Aguilar *et al.*, 1999; Yadón *et al.*, 2006). Esto determina que la provincia de Manabí sea considerada como área prioritaria para el control vectorial (Yadón *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2010).

Manabí, una provincia de la costa central del Ecuador, limita al norte con la provincia de Esmeraldas, al sur con la provincia del Guayas, al este con las provincias del Guayas, Los Ríos y Sto. Domingo de los Tsáchilas, y al oeste con el océano Pacífico. Posee una superficie de 18.878 km², que representa el 7% del territorio nacional. Su relieve varía desde los 0 a 500 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m)., tiene un clima variable, que oscila entre subtropical seco a tropical húmedo. La precipitación anual varía entre 400-1800 mm, la temperatura media anual es de 25°C, y puede llegar hasta los de 36°C, se encuentra influenciada por dos corrientes oceánicas, la corriente cálida del Niño y la corriente fría de Humboldt. Presenta una estación invernal marcada, durante los meses de

diciembre a mayo (Gobernación de Manabí, 2009; Gobierno provincial de Manabí, 2010; INAMHI, 2011).

4.1.2 RECOLECCIÓN DE TRIATOMINOS EN EL CAMPO

Para la recolección de individuos de la especie *R. ecuadoriensis* se contó con la colaboración del Programa Nacional de Chagas (PNCHa), con quien se realizaron búsquedas activas de vectores, 1 hora/hombre, dentro de los domicilios y en las áreas peridomiciliares (nidos de gallinas, cercados de piñuela y palmas) (Grijalva *et al.*, 2005) (Figura 2). Previo al ingreso de la vivienda se obtuvo un consentimiento informado de cada jefe de familia en cumplimiento de las normas de los comités de ética institucional de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y la Universidad de Ohio (OU). Para la recolección de triatomos silvestres se realizaron búsquedas manuales en nidos de mamíferos y aves, en áreas silvestres cercanas a los domicilios (Figura 3) (Suárez *et al.*, 2010).

La recolección de triatomos se realizó en junio-agosto y octubre-diciembre de 2009, y de enero a marzo de 2010. De un total de 30 localidades visitadas, ocho fueron consideradas para la investigación por el número de triatomos domiciliarios y peridomiciliares recolectados (Figura 4). Para este estudio, las comunidades se organizaron en 5 grupos geográficos; se analizó un total de treinta individuos silvestres y treinta individuos sinantrópicos por grupo (Tabla 1).

Las comunidades analizadas fueron: Mariscal Sucre y Chade del cantón Jipijapa; El Bejuco del cantón Portoviejo, Danzarín del cantón Rocafuerte, Tablada del Algodón del

cantón Junín y, las comunidades de Chita, Rio Canoa y Estero Seco del cantón San Vicente, localizadas en el norte de la provincia de Manabí (Figura 4). Según la clasificación de Sierra *et al.* (1999), las comunidades de Danzarín y El Bejuco corresponden a Bosque semidecuido de tierras bajas, caracterizado por la presencia de especies espinosas y vegetación arbórea dispersa. Mariscal Sucre y Chande se clasifican como Bosque Siempreverde de la Cordillera de la Costa, que se encuentra entre los Bosques Semidecuidos Piemontanos y los Bosques de Neblina de la Costa, entre 300- 450 msnm, y posee especies herbáceas y arbóreas. La comunidad de la Tablada del Algodón se encuentra clasificada como Bosque Siempreverde Piemontano, caracterizado por el alto número de especies arbóreas. Las comunidades de Rio Canoa, Estero Seco y Chita se encuentran dentro de Bosque Siempreverde de Tierras Bajas de la Costa, caracterizado por la presencia de especies arbóreas y epífitas (Sierra *et al.*, 1999). En las localidades del cantón San Vicente (Grupo 5), se encontraron individuos únicamente en el ecotopo silvestre. Estos se tomaron en cuenta para el análisis, con el fin de contrastar con individuos de comunidades localizadas al sur de la provincia.

La información obtenida a través de búsquedas de triatominos en áreas sinantrópicas y silvestres, se utilizó para el calcular los siguientes indicadores entomológicos: 1) Índice de Infestación, 2) Índice de Densidad, 3) Índice de Colonización; y, 4) Índice de Hacinamiento. El Índice de Infestación es el porcentaje de casas/microhábitats infestados por los vectores. El Índice de Densidad es el número de triatominos capturados dividido por el total de casas/microhábitats examinados. El Índice de Hacinamiento es el número de triatominos capturados dividido por el total de casa/microhábitats infestados. Finalmente, el Índice de Colonización es el porcentaje de casas/microhábitats infestados en los que se capturan estadios inmaduros (WHO, 2002).

4.2. FASE DE LABORATORIO

4.2.1 MANTENIMIENTO Y PROCESAMIENTO DE TRIATOMINOS

Los triatominos colectados fueron trasladados al Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la PUCE, donde fueron contabilizados e identificados según la clave de Lent y Wyzodzinsky y (1979) y Carcavallo *et al.*, 1997. Los insectos vivos fueron mantenidos en una incubadora a temperatura media de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa $75\pm 15\%$ y fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad.

Los especímenes colectados en el campo fueron fraccionados (patas, alas, antenas y cuerpo) para su estudio. Las muestras fueron preservadas en alcohol al 70-100% (patas, alas y cuerpo) y glicerol (antenas).

4.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Las patas de los especímenes de *R. ecuadoriensis*, se utilizaron para la extracción de ADN, según el protocolo de extracción del kit DNeasy® para sangre y tejido (QIAGEN, 2006) (Anexo 1). La presencia de ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, en TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X a voltaje variable (80-100 V). Los geles se tiñeron con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) y se visualizaron en el transiluminador Bio Doc-It® Imaging System (UVP, Upland, CA, USA). La concentración y calidad de las muestras de ADN fue determinada en el espectrofotómetro NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

4.3. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

4.3.1. TRANSFERENCIA DE MICROSATÉLITES

Para el análisis de la estructura genética se utilizaron muestras de ADN de 270 individuos de la especie *R. ecuadoriensis*, provenientes de áreas silvestres y ambientes humanos la provincia de Manabí (Tabla 1). Como marcadores moleculares se utilizaron 6 pares de cebadores para microsatélites diseñados por Harry *et al.* (1998), desarrollados para *Rhodnius pallescens* (L3, L9, L13, L25, L43 y L47) (Tabla 2). Se utilizaron estos marcadores moleculares por varias razones, dentro del género *Rhodnius* solamente se han desarrollado microsatélites para dos especies, *R. pallescens* y en la especie *R. prolixus*. Se escogió este grupo de marcadores por pertenecer a una especie del mismo clado y porque fueron probados previamente en la especie *R. ecuadoriensis*, mientras que los marcadores desarrollados por *R. prolixus* tuvieron mayor dificultad en la amplificación en individuos de *R. ecuadoriensis* (Harry *et al.*, 1998; Fitzpatrick *et al.*, 2008).

Para la transferencia de microsatélites a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se uso el kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega) 1X, que contiene la enzima GoTaq® en solución con el tampón de reacción pH 8,5, más 200µM dATP, 200µM dGTP, 200µM dCTP, 200µM dTTP y 1,5 mM MgCl₂. A esta cantidad de MgCl₂ se adicionó 6.4 µl de MgCl₂ 25mM, 0,4 pM de cada cebador marcado y 10 ng/µl de ADN. El volumen final de reacción fue de 25 µl.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100® (MJ Research, Ramsey, MN, US). Luego de la estandarización de cada microsatélite, se escogió el

programa con un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. Para la extensión final se sometió a las muestras a 72°C por 5 minutos.

En el caso de la amplificación de los microsatélites L13 y L43, se realizó un PCR anidado, para lo cual se utilizó como molde el producto del primer PCR, siguiendo el protocolo anteriormente descrito, con la diferencia de que para el PCR anidado no se adicionó MgCl₂. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 2% en TAE 1X para confirmar la presencia del producto amplificado.

4.3.2. DETERMINACIÓN DE ALELOS

Para determinar los alelos presentes en los loci L13 y L47 se utilizó la técnica conocida como genotipado. Los fragmentos fueron analizados por electroforesis capilar en un ABI 3130xl (Applied Biosystems, Forest City, CA, US) frente a una escalera de tamaños estándar G500 LIZ (Applied Biosystems), en el Centro de Genómica y Secuenciamiento de la Universidad de Utah. Los datos obtenidos en la electroforesis capilar se enviaron en formato .fsa, y la determinación de los alelos se realizó en el programa Peak Scanner™ Software v1.0, donde se efectuó una lectura manual de cada muestra para verificar la autenticidad de los alelos frente a errores o artefactos producto de la corrida.

4.3.3. ANÁLISIS DE DATOS GENÉTICOS

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados en el presente estudio (cuantificar la diversidad genética intrapoblacional y evaluar las relaciones entre poblaciones silvestres y sinantrópicas de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí) se calcularon varios índices estadísticos basados en las frecuencias alélicas y la heterocigosidad de cada población (Freeland, 2005).

4.3.4.1. DIVERSIDAD GENÉTICA

4.3.4.1.1. RIQUEZA Y DIVERSIDAD DE ALELOS

La riqueza alélica fue estimada como el número de alelos por individuo (para los loci considerados) en cada población y en el conjunto de poblaciones. La diversidad alélica (A) se calculó por medio del programa FSTAT versión 2.932. Este índice representa el número de alelos por locus en la población y en cada subpoblación (Freeland, 2005). También se tomó en cuenta el número de alelos privados (alelos únicos para cada población), alelos efectivos (ae) y número de migrantes por generación (Nm). La riqueza y diversidad de alelos fue evaluada para cuantificar la variación intraespecífica de poblaciones silvestres y sinantrópicas de Manabí.

4.3.4.1.2. HETEROCIGOSIDAD Y ENDOGAMIA

La heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad observada (H_o) son índices que permiten cuantificar la diversidad genética dentro de una población (Freeland, 2005). La

He es una medida de diversidad genética que refleja el nivel de heterocigosidad esperada en una población en equilibrio de Hardy-Weinberg. Este índice fue comparado con la heterocigosidad observada (H_o) en cada población (Freeland, 2005). Estos índices fueron calculados y comparados (usando pruebas de χ^2 con corrección de Bonferroni) usando el programa ARLEQUIN v.3.1. (Excoffier *et al.*, 2005). Estos dos índices nos permiten inferir acerca de variabilidad de las poblaciones de *R. ecuadoriensis* en Manabí.

El coeficiente de endogamia (F_{IS}), permite cuantificar la heterocigosidad de una población. Este coeficiente se utilizó para medir la diferencia entre la media de heterocigotos sobre las subdivisiones o estratos de la población. Este coeficiente varía entre cero (alelos se distribuyen aleatoriamente) y uno (homocigotos). El índice que fue calculado a través del programa ARLEQUÍN v.3.1 para comprobar si existe flujo génico entre localidades.

4.3.4.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL

4.3.4.2.1. FRECUENCIAS ALÉLICAS

A partir de la lectura manual de alelos se calcularon las frecuencias alélicas para cada locus en el programa GenAIEx 6.41.

4.3.4.2.2. DISTANCIAS GENÉTICAS Y AISLAMIENTO POR DISTANCIA

La matriz de distancias genéticas (D_{AS}) permite medir, utilizando las frecuencias alélicas, el grado de similaridad entre pares de poblaciones. El valor de las distancias

genéticas varía de cero (poblaciones idénticas) a infinito (poblaciones que no comparten ningún alelo para los loci considerados) (Freeland, 2005). Con la matriz generada por el programa GenAIEx 6.41 se realizaron dos análisis estadísticos para explorar la posible existencia de estructuración genética: Análisis de Componentes Principales (PCA), Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) y el Análisis de Similitud (ANOSIM), para observar si existe estructuración en poblaciones del vector.

La prueba de Mantel es una regresión de una matriz sobre otra; en genética de poblaciones, se utiliza para explorar la posibilidad de que las distancias genéticas que separan pares de poblaciones sean una función simple de las distancias geográficas que separan esos pares de poblaciones (un fenómeno conocido como aislamiento por distancia) (Sokal, 1979; Urban, 2003). Esta prueba se llevó a cabo en el programa GenAIEx 6.41, con las matrices de distancias genéticas y geográficas; la significación estadística de las correlaciones fue evaluada utilizando 9.999 permutaciones (Fitzpatrick, 2008; Peakall *et al.*, 2006). Adicionalmente, se complementó el análisis con una regresión lineal entre los valores del F_{ST} y la distancia en kilómetros entre comunidades. Ambos análisis permiten observar si existe una correlación entre distancias geográficas y genéticas.

4.3.4.2.3. ÍNDICE DE FIJACIÓN

El índice de fijación (F_{ST}) es una medida de subdivisión o diferenciación genética entre poblaciones. El aumento de la heterocigosidad ocurre a medida que una población se subdivide (desde $F_{ST} = 0$ en poblaciones sin subdivisiones hasta $F_{ST} = 1$ en una población totalmente estructurada o subdivida). El F_{ST} se calcula a través de la siguiente ecuación: $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$, donde H_T representa la heterocigosidad esperada del total de la

población y H_S la heterocigosidad esperada de una subpoblación en equilibrio de Hardy-Weinberg. Poblaciones con valores entre 0 y 0,05 presentan poca diferenciación genética, mientras que valores entre 0,05 y 0,25 muestran una diferenciación genética moderada y valores $>0,25$ indican un alto nivel de diferenciación genética. Para determinar el valor de F_{ST} se utilizó el programa ARLEQUIN v.3.1 (Excoffier *et al.*, 2005); la significación estadística de F_{ST} en relación con la hipótesis nula ($F_{ST} = 0$) se evaluó por medio de 1000 permutaciones. Este análisis se realizó a diferentes niveles: 1) loci 2) ecotopos silvestres y sinantrópico y 3) localidad para determinar si existe algún tipo de estructuración genéticas entre poblaciones de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí.

4.3.4.2.4. AMOVA Y DELTA DE K (ΔK)

El Análisis de la Varianza Molecular o AMOVA es un ANOVA anidado. Permite analizar la partición de la diversidad en diferentes niveles jerárquicos como poblaciones y subpoblaciones (Sánchez-Otero, 2007). Este análisis fue realizado usando el programa ARLEQUIN v.3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), para determinar en que si existe mayor variabilidad dentro de cada grupo o entre grupos.

Con el programa Structure 2.2 se determinó el número más probable de poblaciones presentes en el conjunto de la muestra (K). Este programa utiliza un algoritmo bayesiano que permite identificar grupos genéticamente homogéneos basado en genotipos de múltiples loci (Evanno *et al.*, 2005). Structure 2.2 estima el número más probable de poblaciones por medio de iteraciones con diferente número de K (en nuestro caso, $K = 1 - 9$). Utilizando la verosimilitud de las observaciones para cada K, el programa deriva un

valor de ΔK para cada población; el K más probable corresponde al que maximiza el valor de ΔK .

5. RESULTADOS

5.1. RECOLECCIÓN DE TRIATOMINOS E INDICADORES ENTOMOLÓGICOS

La fase de campo de esta investigación contempló el reconocimiento de un total de 407 casas pertenecientes a 8 localidades de la provincia de Manabí, de las cuales 49 estuvieron infestadas con triatomos (Tabla 3). Se recolectó un total de 1356 triatomos entre ninfas y adultos; la cantidad de ninfas superó al número de adultos en todas las localidades (Tabla 3). Los indicadores entomológicos demuestran que la localidad de el Bejuco posee la mayor tasa de infestación 25%, seguida de Danzarín presenta la mayor Tasa de Infestación y de Densidad de triatomos de las ocho localidades analizadas. Danzarín muestra un Índice de Infestación de 19.4% y un Índice de Densidad de 37.8, seguida Tablada del Algodón (Tabla 4). La localidad de San Francisco presentó el mayor Índice de Hacinamiento, seguida de Danzarín y Tablada del Algodón (Tabla 4). En cuanto al Índice de Colonización, todas las localidades presentaron un alto porcentaje de colonización, principalmente Danzarín, Tablada del Algodón, San Francisco, Chita y Río Canoa, que exhibieron una colonización del 100% (Tabla 4).

En el estrato silvestre se analizaron 561 muestras en 16 microhábitats, principalmente nidos de aves, ratón y ardilla; 161 lugares de colecta presentaron triatomos (Tabla 5). En las búsquedas silvestres se colectó un total de 2665 triatomos entre ninfas y adultos; la proporción de ninfas, al igual que en el estrato sinantrópico, fue mayor que la de adultos (Tabla 5). Las localidades de Danzarín, Tablada del Algodón, Chande y San Francisco presentaron el mayor porcentaje de infestación, entre 44% y 52% (Tabla 6), mientras que la localidad de Chande presentó el mayor Índice de Densidad y

Hacinamiento (Tabla 6). En el ecotopo silvestre todas las localidades presentaron un alto Índice de Colonización, entre 85% y 100%, con excepción de la localidad de Chita (Tabla 6).

En las ocho localidades analizadas, tanto en el estrato silvestre como en el sinantrópico, la especie *R. ecuadoriensis* fue encontrada con mayor frecuencia, aunque también se observó la presencia de especies como *Panstrongylus howardi* (N = 79) y *Panstrongylus rufotuberculatus* (N = 62), en menor proporción.

5.2. TRANSFERENCIA DE MICROSATÉLITES

Para la estandarización de los microsatélites (Tabla 2), se utilizó como base el protocolo descrito por Harry *et al.* (1998). Después de variar las condiciones de la PCR, aumentando la cantidad de cebador, $CaCl_2$ y número de ciclos se logró establecer un protocolo para la amplificación de muestras de *R. ecuadoriensis*. Se analizó un total de 270 individuos, sinantrópicos y silvestres, pertenecientes a ocho localidades de la provincia de Manabí (Anexos 2-10). Se logró transferir estos microsatélites a individuos de la especie *R. ecuadoriensis*; su amplificación fue comprobada a través de geles de agarosa (Figura 5 y 6) antes del envío de muestras para su genotipaje.

Se realizó un análisis preliminar de todos los alelos para cada microsatélite en un total de 30 individuos para determinar el grado de polimorfismo de estos marcadores (Figura 7). La lectura de electroforesis capilar mostró que solamente dos de los seis microsatélites presentan alelos polimórficos. Los microsatélites L9 y L25 son marcadores monomórficos para la población analizada: L9 presentó un producto de PCR de 270 pb,

mientras que L25 presentó un producto de 174 pb. Los microsatélites L3 y L43 mostraron una gran variedad de alelos y dificultad en su lectura por la cantidad de alelos. Se observaron alelos entre 78 y 89 pb para el locus L3, y para el locus L43 los alelos oscilaron desde 149 pb hasta 170 pb (Tabla 7, Figura 8).

Los microsatélites L13 y L47 fueron los marcadores que mostraron polimorfismos consistentes y, por tanto, interpretables sin ambigüedad. L13 mostró tamaños de alelos entre 101 y 142 pb, con un total de 16 alelos, mientras que L47 presentó alelos entre 111 y 121 pb, con un total de 9 alelos (Tabla 7, Figura 8).

5.3. DIVERSIDAD GENÉTICA

5.3.1. DETERMINACIÓN DE ALELOS Y FRECUENCIAS ALÉLICAS

El análisis de la estructura poblacional de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí, se realizó con los marcadores polimórficos, L13 y L47. Se utilizaron 270 individuos, y se obtuvo un set de datos de 708 alelos para los 2 loci (Tabla 8 y 9); se excluyeron los datos de 152 individuos que no presentaron producto de PCR al realizar el genotipaje.

A partir de los datos obtenidos de la lectura manual de alelos (Tabla 8 y 9) se calcularon las frecuencias alélicas para cada locus (Tabla 10). Para el locus L13, el alelo con mayor frecuencia fue el de 117 pb (Figura 9), mientras que en el locus L47 existen dos alelos predominantes, con 119 pb y 115 pb (Figura 10). Para el microsatélite L13 todas las localidades presentaron alelos únicos con excepción de la localidad Chande-San Francisco

y la localidad de Tablada del Algodón presentó el mayor número de alelos únicos. En el caso del microsatélite L47, solamente las localidades de Chande-San Francisco y los individuos silvestres del norte de Manabí (CRES) presentaron alelos únicos. La distribución de alelos varió dependiendo del microsatélite, L13 presentó una mayor variabilidad en el tamaño de los alelos (desde 101 pb hasta 142 pb) y L47 presentó una distribución de alelos más restringida desde (111 pb hasta 121 pb). Ambos marcadores comparten alelos en común.

5.3.2. RIQUEZA Y DIVERSIDAD DE ALELOS

A través de la riqueza alélica, que fue definida como alelos/N , observamos que los individuos silvestres de la provincia de Manabí presentan una mayor riqueza alélica con excepción de los individuos del estrato sinantrópico de la localidad de Tablada del Algodón (Tabla 11). Los individuos del norte de Manabí (CRES) presentaron la mayor riqueza alélica al analizar individualmente el microsatélite L13 (0.36), en el caso de L47 los individuos del estrato sinantrópico del Bejuco presentaron la mayor diversidad (Tabla 11). Adicionalmente, se cuantificó la riqueza alélica (A_r) de los loci en toda la muestra haciendo uso del programa FSTAT 2.932, se determinó la presencia de una alta diversidad ($A_r = 3.096$) (Tabla 12).

La diversidad alélica de las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Manabí nos muestra que tanto el microsatélite L13 y como L47 poseen en promedio 4 de alelos por locus (Tabla 13). Al analizar el número de alelos por estrato observamos que los individuos silvestres de la comunidad del bejuco presentaron el menor número de alelos por locus,

mientras que los individuos de la localidad de Tablada del Algodón poseen el mayor número de alelos por locus tanto para el estrato sinantrópico como el silvestre (Tabla 13).

La diversidad genética intrapoblacional fue evaluada contabilizando el número de alelos privados. Los individuos de *R. ecuadoriensis* de la de Manabí se presentaron un total de 12 alelos privados para los 2 loci analizados (Tabla 7). Éstos se encontraron en baja frecuencia dentro de las poblaciones estudiadas (Tabla 10). Para el loci L13 se registraron 10 alelos privados, de un total de 16 alelos. La mayor cantidad de alelos privados se encontraron en individuos de Tablada del Algodón (4 alelos), seguida del Bejuco (3 alelos) e individuos silvestres del norte de Manabí (CRES) (2 alelos). Para el loci L47 solamente se detectaron 2 alelos privados, de un total de 9 alelos. Estos estuvieron presentes en individuos silvestres del norte de Manabí (CRES).

El análisis de estructura genética de las poblaciones de *R. ecuadoriensis* se complementó con el cálculo del número efectivo de alelos ($a_e = 2.044$ alelos), y del número de migrantes por generación ($N_m = 3.25$ individuos). Estos últimos permiten mantener conectividad entre poblaciones, según los requerimientos teóricos (Tabla 12).

5.3.3. HETEROCIGOSIDAD Y ENDOGAMIA

Los datos sugieren que las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de Manabí no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($H_o = 0,346 \pm 0.038$; $H_E = 0.465 \pm 0.04$, $p = 0.00$). Al analizar ambos loci se encontraron diferencias significativas entre la heterocigosidad esperada y observada, lo cual indica que existe un déficit de individuos heterocigotos en las poblaciones analizadas (Tabla 12).

El análisis independiente de cada locus demostró que el locus L13 se encuentra en HWE en todas las comunidades de la provincia de Manabí (Tabla 14), con excepción de la comunidad de Tablada del Algodón, mientras que el locus L47 presenta diferencias altamente significativas entre la heterocigosidad esperada y observada ($H_O = 0.268$ $H_E = 0.618$, $p = 0.00$) (Tabla 14).

Otro índice utilizado para cuantificar la heterocigosidad de la población fue el índice de endogamia (F_{IS}). Este índice presentó un valor de 0.36 sobre todos los loci, lo cual indica que existe cierto grado de diferenciación genética entre los individuos de las localidades estudiadas (Tabla 12). Las localidades que presentaron un mayor déficit heterocigotos fueron las localidades de Chande y San Francisco, tanto en el estrato sinantrópico como en el silvestre, con un F_{IS} de 0.6 para los individuos sinantrópicos y 0.5 para los individuos silvestres.

5.4. ESTRUCTURA POBLACIONAL

La determinación del grado de conectividad entre los individuos silvestres y sinantrópicos se obtuvo con varios índices estadísticos, basados en el número de heterocigotos y frecuencias alélicas para cada locus.

5.4.1. DISTANCIAS GENÉTICAS Y AISLAMIENTO POR DISTANCIA

A partir de la matriz de distancias genéticas (D_{AS}) generada por el programa GenAIEx 6.41 se realizaron tres análisis estadísticos. El Análisis de Componentes Principales (PCA) (Figura 10) no sugiere ningún tipo de agrupación geográfica o entre

estratos ecológicos (silvestre/ sinantrópico). Este análisis fue complementado con un Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS), cuyos resultados sugieren que no existe una separación entre individuos silvestres y sinantrópicos. Además se observó una mayor estructuración al agrupar los individuos por localidades. Sin embargo aunque esta prueba presenta un alto nivel de estrés (0.999) (Figura 11). A través del análisis de similitud (ANOSIM) observamos diferencias altamente significativas al comparar los individuos del norte de Manabí (CRES) frente a las comunidades del el Bejuco, Danzarín y Tablada del Algodón. Asimismo se encontraron diferencias significativas entre Tablada del Algodón y Chande-San Francisco (Tabla 15).

A través del NMDS y PCA no se observa una diferenciación entre individuos del nortes de Manabí (CRES) y el resto de localidades, sin embargo las representaciones gráficas no se ajustan a los resultados del ANOSIM. Se puede apreciar diferenciación entre grupos principalmente al comparar los individuos silvestres del norte de Manabí frente a otras comunidades. Estos resultados sugieren que existe cierto nivel de flujo génico entre las localidades y ecotopos estudiados. Esta tendencia debería ser evaluada aumentando el número de localidades, especialmente del norte de Manabí para observar si existen diferencias entre individuos del norte y del sur.

El grado de correlación entre la matriz de distancias genéticas (D_{AS}) y la matriz de distancias geográficas fue medido con la prueba de Mantel (Urban, 2003). No se observó aislamiento genético por distancia ($R = 0,125$) entre los individuos de las diferentes localidades analizadas. El R es muy bajo, sugiriendo que no existe una correlación fuerte entre las matrices de distancias genéticas y geográficas; el valor de P es bajo (0,004), pero probablemente carece de significado biológico (Figura 13). Esta última observación es

reforzada por la correlación débil y negativa entre las distancias geográficas y los valores de F_{ST} ($p = 0.365$) (Figura 14).

5.4.2. INDICE DE FIJACIÓN

La falta de estructuración poblacional de *R. ecuadoriensis* en Manabí se confirmó utilizando el índice de fijación (F_{ST}). El valor de F_{ST} para todos los loci fue de 0.08 (Tabla 12), demostrando que existe poca diferenciación genética entre individuos de la provincia de Manabí.

Asimismo, los valores de F_{ST} mostraron poca diferenciación genética entre localidades ($F_{ST} = 0.00 - 0.06$). El mayor valor de F_{ST} fue obtenido al comparar la comunidad de El Bejuco con las comunidades de Chande-San Francisco ($F_{ST} = 0.056$) e individuos del norte de Manabí (CRES) ($F_{ST} = 0.05$).

Al comparar poblaciones de ecotopos silvestres y sinantrópicos dentro de cada comunidad, los valores del F_{ST} sugieren poca diferenciación genética. La mayor diferencia se encontró al comparar individuos de la comunidad El Bejuco en el estrato sinantrópico (BJD), frente al estrato sinantrópico de las comunidades de Tablada del Algodón (TOD) y Chande-San Francisco (CFD), donde existe una mayor diferenciación pero no es significativa (Anexo 11).

5.4.3. AMOVA Y DELTA DE K

Para investigar la partición de la varianza molecular entre grupos y subgrupos, se utilizó AMOVA (Freeland, 2009). Los resultados muestran que, para las poblaciones y loci analizados, un altísimo porcentaje de la variación genética (91,16%) se encuentra entre los individuos dentro las poblaciones; sólo un 8,6% de la varianza se encuentra entre poblaciones dentro de grupos (Tabla 16).

Para estimar el número más probable de poblaciones (K) presentes en la provincia de Manabí, se cálculo ΔK , con 20 iteraciones y un número de poblaciones a priori entre 1 y 9. del valor más probable de K fue 1, sugiriendo que no existe estructuración genética entre los individuos de las diferentes comunidades y ecotopos (silvestre/sinantrópico) (Tabla 17) los individuos probablemente conforman una sola población, como sugieren también los valores de F_{ST} (Tabla 12, Figura 15).

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una infección parasítica calificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad desatendida. Se encuentra relacionada con altos niveles de pobreza, y agravada por la limitación del acceso a recursos y cuidado médico de las personas afectadas. Las campañas de control vectorial con insecticidas residuales y el tamizaje de las donaciones de sangre son las principales estrategias de control de esta enfermedad (WHO, 2002).

Tomando en cuenta que la transmisión vectorial es la principal forma de adquirirla (Cook y Zumla, 2009), es imprescindible conocer la distribución, dinámica y estructura poblacional de sus vectores, a fin de desarrollar de estrategias efectivas de control. En Ecuador se han efectuado estudios epidemiológicos en zonas endémicas y con alta prevalencia, como las provincias de Guayas, Manabí, Loja, Napo y Sucumbíos (Grijalva *et al.*, 2003; 2005; Black *et al.*, 2007); en términos de ecología y control de vectores, han sido de particular importancia los estudios de microdistribución vectorial en zonas silvestres y peridomiciliares (Suárez *et al.*, 2010), el estudio del ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación (Villacís *et al.*, 2008), el análisis de la variación morfométrica de poblaciones silvestres y sinantrópicas asociada a procesos de domiciliación (Villacís *et al.*, 2010), el estudio de la variación espacio-temporal de poblaciones (Grijalva, datos no publicados) o la descripción de potenciales reservorios de *T. cruzi* en el peridomicilio y domicilio en zonas rurales del Ecuador (Pinto *et al.*, 2006).

El presente estudio tuvo como objetivo principal esclarecer la dinámica del principal vector local, analizando poblaciones sinantrópicas y silvestres de la provincia de

Manabí. La seroprevalencia reportada en la provincia (1.2%, ~17.790 personas infectadas) (Yadón *et al.*, 2006; Black *et al.*, 2009), y registros históricos (Aguilar *et al.*, 1999), indican que esta provincia es una zona de alto endemismo para la ECh. Por este motivo, debe ser considerada como un área prioritaria para el control de la transmisión vectorial.

Los antecedentes descritos acerca de las poblaciones de *Rhodnius* de Colombia y, en especial, Venezuela, nos llevan a preguntarnos si la reinfestación de viviendas por *Rhodnius ecuadoriensis* en la Costa ecuatoriana está determinada por dinámicas comparables. La dinámica de reinfestación en áreas rurales es heterogénea, y está sujeta a múltiples factores, incluyendo agentes climáticos, degradación del insecticida o disponibilidad de refugios y hospederos, entre otros (Cecéré *et al.*, 2006; Gürtler, 1999b). Una manera para evaluar hipótesis relacionadas con el proceso de reinfestación es analizar la estructura genética de las poblaciones del vector, comparando poblaciones sinantrópicas (intradomicilio y peridomicilio) versus poblaciones silvestres. En este trabajo combinamos estudios de campo extensivos con una caracterización genética original utilizando microsatélites.

6.1. FASE DE CAMPO E INDICADORES ENTOMOLÓGICOS

Durante la fase de campo, observamos patrones relacionados con el número y ocurrencia de triatomíneos en todas las comunidades visitadas. Estudios previos determinaron que las poblaciones silvestres y peridomiciliares de *R. ecuadoriensis* en la provincia de Manabí son las más comunes (Villacís *et al.*, 2010). Este patrón fue consistente durante el muestro, en el estrato sinantrópico la presencia de individuos fue menos frecuente, con relación al estrato silvestre. En las búsquedas domiciliarias (domicilio

y peridomicilio), el mayor número de triatominos fue encontrado en el peridomicilio, especialmente en nidos de gallinas. La mayor parte de individuos silvestres se encontraron en nidos de ardilla y nido de ratón, presentes en vegetación adyacente a la comunidad.

El Bejuco exhibe el mayor Índice de Infestación, donde el 25% de casas examinadas muestran presencia de triatominos, seguida de la localidad del Danzarín (19.4%), además presenta el mayor Índice de Densidad (37.8). El Índice de Hacinamiento en esta comunidad Danzarín fue alto (37.8), superado únicamente por la localidad San Francisco - cantón Jipijapa (70.0). Las ocho localidades analizadas para determinar el Índice de Colonización, mostraron un porcentaje alto, lo cual revela el establecimiento de colonias de triatominos en el estrato sinantrópico, expresado por la presencia de ninfas en las casas infestadas. La información que arroja este índice constituye una alarma que debe ser tomada en cuenta para la vigilancia entomológica y control vectorial a nivel local. Al comparar los índices entomológicos sinantrópicos de Loja y Manabí, observamos que la provincia de Loja posee una mayor tasa de infestación (45%), colonización (100%), densidad (17.5) y hacinamiento (38.8) que la provincia de Manabí (Grijalva *et al.*, 2005; Grijalva *et al.* datos no publicados). Sin embargo Manabí presenta un alto índice de colonización (87,8%) y hacinamiento (27.7) en el estrato sinantrópico, lo cual sugiere un claro establecimiento de colonias del vector. .

En uno y otro ecotopo (silvestre / sinantrópico), se encontraron adultos y ninfas, la proporción de ninfas sobre adultos se muestra mayor en todas las localidades. Se cree que estas poblaciones se encuentran establecidas y con reproducción activa, agregadas cerca de sus fuentes alimenticias corroborando estudios el análisis de microdistribución de vectores en una comunidad del cantón Portoviejo de la provincia de Manabí (Suárez-Dávalos *et al.*,

2010). La agregación de los vectores representa un riesgo para los pobladores de las comunidades ya que los animales sinantrópicos actúan como fuente alimenticia del vector, aumentando la probabilidad de infestación y reinfestación domiciliar.

Triatoma dimidiata era considerado el principal vector de la ECh en el Ecuador, se había reportado como vector primario en la provincia de Manabí (Yadón *et al.*, 2006, Abad-Franch *et al.*, 2001). A pesar de esto, en ninguna de las comunidades visitadas se encontró esta especie. La especie *R. ecuadoriensis* fue encontrada en mayor número y frecuencia, lo cual indica que esta podría constituir el principal vector de la ECh en la provincia de Manabí (Grijalva *et al.*, 2011).

6.2. TRANSFERENCIA DE MICROSATÉLITES

La aplicación de marcadores moleculares en estudios ecológicos de vectores de la ECh nos proveen de información acerca de la diversidad genética de las poblaciones de vectores, su estructura poblacional y capacidad de dispersión de los vectores con el fin de aplicar estrategias de control efectivas (Monteiro *et al.*, 2001, Abad-Franch y Monteiro, 2005). Para el presente estudio, se escogieron 6 pares de cebadores de microsatélites para evaluar la diversidad y relaciones entre poblaciones silvestres y sinantrópicas de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí.

La se logró obtener producto de PCR para cada microsatélite. Al realizar la lectura manual en los espectrofluorogramas, cada marcador presentó un patrón de alelos particular y de diferente complejidad, lo que permitió determinar la utilidad de estos marcadores. Sin embargo, solamente dos marcadores, los microsatélites L13 y L47, presentaron un patrón

definido de alelos. Los demás fueron monomórficos (L9 y L25) o presentaron dificultad en la lectura (L3 y L43).

La dificultad de la lectura se relacionó con la presencia de picos ambiguos en los espectrofluorogramas individuales. Estos picos se deben a la amplificación de productos no específicos, lo cual evidencia una falta de especificidad de los cebadores utilizados (Dieffenbach, 1993) y al uso de una temperatura de anillamiento baja (50°C).

En general, los microsatélites utilizados no presentaron la tasa de polimorfismo esperada para evaluar poblaciones de *R. ecuadoriensis*. A pesar de esto, el análisis de dos microsatélites polimórficos permitió explorar los patrones de diversidad y estratificación poblacional de *R. ecuadoriensis* en Manabí. Aunque no existe un número determinado de marcadores moleculares para analizar poblaciones biológicas, resulta claro que el uso de sólo dos loci limita la interpretación de nuestros resultados, que deberán ser confirmados con un panel más amplio de microsatélites específicos para *R. ecuadoriensis*, quizás en combinación con otros marcadores (AFLPS, por ejemplo). Asimismo, la expansión del área de estudio a escalas geográficas más amplias probablemente permitirá observar una mayor estructuración genética, por ejemplo entre poblaciones alejadas geográficamente (sur del Ecuador o del norte del Perú). Nuestros resultados, a pesar de todo, constituyen un primer paso en este sentido, proporcionando la base necesaria para posteriores análisis.

6.3. DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *R. ecuadoriensis* DE LA PROVINCIA DE MANABÍ

La complejidad de la dinámica de transmisión vectorial de la ECh es un desafío para los programas de control. En la provincia de Manabí la dinámica vectorial es compleja (Yadón *et al.*, 2006; Suárez-Dávalos *et al.*, 2010). Nuestros resultados sugieren que no existe estructuración poblacional significativa entre individuos de *R. ecuadoriensis* del área de estudio ($F_{ST} = 0,08$, $P = 0,05$; $K = 1$); esto es consistente con los resultados de estudios morfológicos que muestran que las poblaciones peridomiciliares y silvestres no son significativamente diferentes (Villacís *et al.*, 2010). La mayor variabilidad genética se registró a nivel intrapoblacional ($A_r = 3,096$; Alelos privados = 12), lo cual supera a la diversidad alélica encontrada en poblaciones de *R. prolixus* de Venezuela que presentó 9 alelos en 33 poblaciones (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Al analizar las poblaciones a través de la riqueza alélica (alelos/N) los individuos silvestres mostraron una mayor riqueza frente poblaciones domésticas y peridomésticas de la Manabí; con excepción de las poblaciones sinantrópicas de Tablada del Algodón (TOD) que presentan mayor riqueza alélica frente a las poblaciones silvestres (TOS). Las poblaciones silvestres del norte de Manabí (CRES) mostraron la mayor riqueza alélica para ambos loci, mientras que las poblaciones Danzarín presentaron la menor riqueza alélica. Con referencia a la diversidad alélica, ambos marcadores presentaron un promedio de 4 alelos por locus. Se encontraron la mayor cantidad de alelos en las individuos pertenecientes a CRES, TOD y TOS frente al resto de localidades analizadas. De forma general, los análisis de estructuración genética sugieren que el flujo génico entre las poblaciones sinantrópicas y silvestres es suficiente para contrarrestar los mecanismos que pudiesen originar diferenciación genética. Las poblaciones silvestres y sinantrópicas conforman una sola población efectiva, lo que indica

que existe dispersión activa de los vectores entre ambos ecotopos y que las barreras geográficas existentes no impiden el flujo génico entre poblaciones.

La misma falta de estructuración poblacional entre ecotopos y localidades se observó en poblaciones de *Rhodnius prolixus* en Venezuela, al utilizar un panel de 10 microsatélites (Fitzpatrick *et al.*, 2008). Estos resultados indican similar comportamiento de los vectores, tomando en cuenta que *R. prolixus* es una especie principalmente silvestre en el área de estudio.

Para mantener la homogeneidad de poblaciones distanciadas espacialmente, se necesita al menos 1 migrante por generación (Wang, 2004). Los vectores de la ECh tienen dos mecanismos de dispersión, la dispersión activa y la dispersión pasiva. La dispersión pasiva se encuentra relacionada con los hábitos de su hospedero vertebrado. La dispersión activa se da por vuelo o caminata de los triatominos, y existen varios factores que pueden influenciarla: el bajo estatus nutricional, densidades poblacionales altas, señales químicas producidas por las hembras y la destrucción del hábitat promueven la dispersión activa con el establecimiento de nuevos hábitats (Schofield *et al.*, 1999; Zacharías *et al.* 2010; Abrahan *et al.*, 2011). Nuestros análisis sugieren que las poblaciones estudiadas intercambian ~3 migrantes por generación (Tabla 12), lo que sería suficiente para mantener la conectividad y homogeneizar el pool génico.

Otro factor que afecta al establecimiento de poblaciones sinantrópicas es el tipo de vivienda (Black *et al.*, 2007). Tradicionalmente, las casas en la provincia de Manabí son elaboradas a partir de caña guadua y techos de zinc u hojas de palma. Con excepción de los techos elaborados con hojas de palma, este tipo de vivienda no provee de lugares para el

establecimiento de colonias, al poseer una alta exposición a la luz solar y aireación. Para que exista una diferenciación genética entre las poblaciones sinantrópicas y silvestres, se necesita de un establecimiento prolongado del insecto en el domicilio con aislamiento de las poblaciones silvestres. Este proceso ha sido reportado en otras especies de triatominos (Schofield *et al.*, 1999; Pérez de las Rosas *et al.*, 2007; Dujardin *et al.*, 2009). Las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí son predominantemente peridomiciliares, lo que, de acuerdo con los resultados presentados, favorecería la conectividad con las silvestres.

Estas observaciones sugieren que el control vectorial enfrentará dificultades importantes en la provincia de Manabí, donde las poblaciones peridomésticas y silvestres de *R. ecuadoriensis* son, probablemente, una sola entidad. Esto convierte al peridomicilio en la principal fuente de infestación y reinfestación de viviendas por vectores procedentes del medio silvestre. Los programas de control de la ECh, basados en la aplicación intradomiciliar y peridomiciliar de deltametrina, difícilmente podrán prevenir nuevas infestaciones provenientes del área silvestre (Suarez-Davalos *et al.*, 2010; Grijalva *et al.*, 2011).

Medidas para prevenir la presencia del vector como educación y vigilancia entomológica son de suma importancia para controlar reinfestación de las casas. Este es un proceso a largo plazo, que requiere un trabajo extensivo en el campo, complementario a sistemas de vigilancia para la detección de focos de infestación y reinfestación (Abad-Franch *et al.*, 2009). En cualquier caso, la inversión necesaria para implementar y mantener programas longitudinales de control y vigilancia vectorial es mucho menor que el

costo de la atención a las personas infectadas, especialmente pacientes crónicos asintomáticos (Abad-Franch y Aguilar, 2003).

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La reinfestación de viviendas por *R. ecuadoriensis* en Manabí probablemente sigue el eje silvestre-peridomicilio-domicilio. Por tanto, la vigilancia entomológica continua será un elemento clave del control de la enfermedad a largo plazo. Será necesario, por tanto, estudiar en detalle los procesos de reinfestación a lo largo del eje mencionado.

Las poblaciones de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí probablemente constituyen una única metapoblación homogénea. Aunque será necesario confirmar esta observación con más datos (muestreo geográfico y nuevos loci), esto indica que las acciones de control vectorial deberán extenderse por toda el área de distribución natural de este vector: acciones aisladas sobre una subpoblación tienen pocas probabilidades de ser efectivas a mediano plazo.

Nuestros resultados abren la posibilidad de profundizar en el estudio de la genética de poblaciones del principal vector de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. La ampliación del número de microsatélites utilizados y el diseño de cebadores específicos para *R. ecuadoriensis* permitirán responder de forma más robusta a las preguntas acerca del rol de esta especie en la dinámica de transmisión de la ECh en el Ecuador.

Finalmente, los resultados de este estudio, tanto en su fase de campo como en la de laboratorio, muestran la necesidad urgente de fortalecer los programas de control vectorial en zonas de alta prevalencia de la ECh en el Ecuador. La vigilancia entomológica y la educación de la población en riesgo, así como la formación y fortalecimiento de unidades

de vigilancia que apoyen al control sistemático en colaboración con la comunidad, serán elementos clave de este esfuerzo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Franch, F., A. Paucar C., C. Carpio C., C.A. Cuba Cuba, H.M. Aguilar V., M. Miles. 2001. Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96(5): 611-620.
- Abad-Franch, F., H.M. Aguilar, A. Paucar C., E.S. Lorosa. F. Noireau. 2002. Observations on the Domestic Ecology of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97(2): 199-202.
- Abad-Franch, F. y H.M. Aguilar V. 2003. Control de la Enfermedad de Chagas en Ecuador. OMS/OPS – Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- Abad-Franch, F. y F.A. Monteiro. 2003. Control of Chagas Disease in Ecuador. Pan American Health Organization – Ministry of Health of Ecuador, Quito, Ecuador, 146 pp.
- Abad-Franch, F., F.A. Monteiro. 2005. Molecular research and the control of Chagas disease vectors. *An Acad Bras Cienc*. 77(3): 437-454.
- Abad-Franch, F., F.A. Monteiro, N. Jaramillo O., R. Gurgel-Gonçalves, F.B. Stehling Dias, L. Diotaiuti. 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: 159-177.
- Abad-Franch, F., G. Ferraz, C. Campos, F.S. Palomeque, M.J. Grijalva, H.M. Aguilar, M.A. Miles. 2010. Modeling Disease Vector Occurrence when Detection Is Imperfect: Infestation of Amazonian Palm Trees by Triatomine Bugs at Three Spatial Scales. 4(3): e620.
- Abad-Franch, F., M.C. Vegas, M.S. Rolo, W.S. Santos, A. Rojas de Arias. 2011. Community Participation in Chagas Disease Vector Surveillance: Systematic Review. *PLoS Neg Trop Dis*. 5(6): e1207.

- Abraham, L.B., D.E. Gorla, S.S. Catalá. 2011. Dispersal of *Triatoma infestans* and other Triatominae species in the arid Chaco of Argentina – Flying, walking or passive carriage? The importance of walking females. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 106(2): 232-239.
- Aguilar, H.M., F. Abad-Franch, J. Racines V., A. Paucar. 1999. Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94: 387-393.
- Beebe, T. y G. Rowe. 2008. *An introduction to Molecular Ecology*. Second Edition. Oxford University Press. New York. USA.
- Black, C.L., S. Ocaña, D.K. Riener, J.A. Costales, M.S. Lascano, S. Dávila, L. Arcos-Terán, J.R. Seed, M.J. Grijalva. 2007. Household risk factor for *Trypanosoma cruzi* seropositivity in two geographic regions of Ecuador. *J. Parasitol*. 93(1): 12-16.
- Black, C.L., S. Ocaña, D.K. Riener, J.A. Costales, M.S. Lascano, L. Arcos-Terán, J.S. Preisser, J.R. Seed, M.J. Grijalva. 2009. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in rural Ecuador and clustering of seropositivity within households. *Am J Trop Med Hyg*. 8(6): 1035-1040.
- Carcavallo, R.U., I. Galíndez-Girón, I. Jurberg, H. Lent. 1998. *Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas*. Volumen 1. Editora Fio Cruz. Rio de Janeiro.
- CDC. 2011. American Trypanosomiasis [en línea]
<<http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>> [Consultado: septiembre, 2009].
- Cécere, M.C., D.M. Canale, R.E. Gütlér. 2003. Effects of refuge availability on the population dynamics of *Triatoma infestans* in central Argentina. *J Appl Ecol*. 40: 742–756.
- Cécere, M.C., G.M. Vasquez-Prokopec, R.E. Gütlér, U. Kitron. 2004. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in rural community in northwestern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 71(6): 803–810.
- Cécere, M.C., G.M. Vasquez-Prokopec, R.E. Gütlér, U. Kitron. 2006. Reinfestation sources for Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, Argentina. *Eme Inf Dis*. 12(7): 1096- 1102.

- Cook, G.C. y A.I. Zumla. 2009. Manson's Tropical Diseases. Twenty-second edition. Saunder's Ltda. UK.
- De Oliveira, W. 2009. All-around care for patients with Chagas disease: a challenge for the XXI century. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(1): 181-186.
- Dias, J.C.P., A.C. Silveira, J.C. Schofield. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 97(5): 603-612.
- Di Castri, F., A.F. Hansen y M. Debussche. 1990. Biological Invasions of Europe and the Mediterranean Basin. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Netherlands.
- Dieffenbach, C.W., T.M. Lowe, G.S. Dveksler. 1993. General concepts for PCR primer design. Genome Res. 3: S30-S37.
- Dujardin, J.P., J. Costa, D. Bustamante, N. Jaramillo, S. Catalá. 2009. Deciphering morphology in Triatominae: The evolutionary signals. Acta Trópica. 110: 101-111.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat Rev Genet. 5: 435-445.
- Evanno, G . S. Regnaut, J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE : a simulation study. Mol Ecol. 14: 2611-2620.
- Excoffier L. y H.E.L. Lischer. 2005. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol Ecol Resour. 10: 564-567.
- Freeland, J. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex. England.
- Frankham, R., J.D. Ballou, D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press.
- Fitzpatrick, S., M.D. Feliciangeli, M.J. Sanchez-Martin, F.A. Monteiro, M.A. Miles. 2008. Molecular genetics reveal that silvatic *Rhodnius prolixus* do colonise rural houses. PLoS Neg Trop Dis. 2(4): e210.

- Fitzpatrick, S., P.C. Watts, M.D. Feliciangeli, M.A. Miles, S.J. Kemp. 2009. A panel of ten microsatellite loci for the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Infect Genet Evol.* 9(2): 206-209.
- Galvão, C., R. Carcavallo, D. Silva Rocha, J. Jurberg. 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa.* 202: 1-36.
- Grijalva, M.J., L. Escalante, R.A. Paredes, J.A. Costales, A. Padilla, E.C. Rowland, H.M. Aguilar y J. Racines. 2003 . Seroprevalence and Risk Factors for *Trypanosoma cruzi* Infection in the Amazon Region of Ecuador. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69: 380-385.
- Grijalva, M.J., F.S. Palomeque-Rodríguez, J.A. Costales, S. Dávila. L. Arcos-Terán. 2005. High household infestation rates by synanthropic vectors of Chagas disease in southern Ecuador. *J Med Entomol.* 42(1):68-74.
- Grijalva, M.J., A.G. Villacís, S. Ocaña-Mayorga, C.A. Yumiseva, E.G. Baus. 2011. Limitations of selective deltamethrin application for triatomine control in central coastal Ecuador. *Parasites and Vectors.* 4(20): 1-10.
- Gobernación de la provincia de Manabí. 2009. Manabí [en línea]
<<http://www.gobernacionmanabi.gob.ec/manabi.php>> [Consultado: mayo 2011].
- Gobierno provincial de Manabí. 2011. Manabí [en línea] <<http://www.manabi.gob.ec/>>
[Consultado: mayo 2011].
- Guhl, F. 2007. Chagas disease in andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102 (1): 29-37.
- Gürtler, R.E., M.C. Cécere, D.M. Canale, M.B. Castañera, R. Chuit, J.E. Cohen. 1999a. Monitoring house reinfestation by vectors of Chagas disease: a comparative trial of detection methods during a four-year follow-up. *Acta Trop.* 72: 213–234.
- Gürtler, R.E. 1999b. Monitoreo poblacional de T. infestans durante la fase de vigilancia en una comunidad rural del noroeste argentino. *Medicina.* 59(2): 47-54.

- Hammilton, M.B. 2009. Population Genetics. Wiley-Blackwell. West Sussex. UK.
- Harry, M., G. Poyet, C.A. Romaña, M. Solignac. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the blood sucking bug *Rhodnius pallescens* (Heteroptera, Reduviidae). *Mol Ecol.* 7: 1771-1788.
- Harry, M., C.L. Roose, D. Vautrin, F. Noireau, C.A. Romaña, M. Solignac. . 2008. Microsatellite markers from the Chagas disease vector, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae), and their applicability to *Rhodnius* species. *Infect Genet Evol.* (8): 381-385.
- INAMHI. 2011. Desarrollo Agrícola de la provincial de Manabí [en línea]
<<http://www.inamhi.gov.ec/foroclima/Exposiciones%20II%20Foro%20Climatico%20Nacional%20pdf/1%20LA%20AGRICULTURA%20EN%20LA%20PROVINCIA%20DE%20MANABI%20-%20FEDERICO%20DIAZ%20-%20ESPAM.pdf>> [Consultado: julio 2010].
- Kalinowski, S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics.* 5: 539–543.
- Lehane, M.J. 2005. Biology of blood-sucking insects. Harper Collins Academic. London. UK. 288 pp.
- Lent, H. y P. Wygodzinsky. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas Disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History.* 163: article 3. New York. US.
- Marcet, P.L., T. Lehmann, G. Groner, R.E. Gürtler, U. Kitron, E.M. Dotson. 2006. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) *Infect Genet Evol.* 6(1): 32–37.

- Marquardt, W.C., B.C. Kondratieff, C.G. Moore, J.E. Freier, H.H. Hagedorn, W.C. Black IV, A.A. James, J. Hemingway, S. Higgs. 2005. *Biology of Disease Vectors*. Second edition. Elsevier Academic Press. London, UK.
- Monteiro, F.A. A.A. Escalanteand, C.B. Beard. 2001. Molecular tools and triatomine systematics: a public health perspective. *Trends Parasitol.* 17(7): 345-347.
- PAHO – Pan American Health Organization. 2006. Reporte Técnico – Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Americas. OPS/HDMCD/ 425-06. Montevideo. 28 pp.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes.* 6: 288-295.
- Pérez de la Rosas, A.R., B.L Segura, B.A. García. 2007. Microsatellite analysis of genetic structure in natural *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) populations from Argentina: its implication in assessing the effectiveness of Chagas' disease vector control programmes. *Mol Ecol.* 16: 1401 -1412.
- Pinto, C.M., S. Ocaña-Mayorga, M.S. Lascano. M.J. Grijalva. 2006. Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. *J. Parasitol.* 92(6): 1251–1255.
- Qiagen. 2006. DNeasy® Blood & Tissue Handbook. Austin. Texas. US.
- Roberts, L. S., y Janovy, J. 2005. Gerald D. Schmidt and Larry S. Robert's Foundations of Parasitology, 7th edition. McGraw-Hill, New York, USA.
- Rodrigues Coura, J. y J.C. Pinto Dias. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 (1):31-40.
- Sánchez-Otero, J. 2007. *Introducción al Diseño Experimental.* s/e. Ecuador.
- Schofield, C.J. 1994. *Triatominae: biología y control.* ZENECA Public Health. West Sussex, UK.
- Schofield, C.J., L. Diotaiuti, J.P. Dujardin. 1999. The process of domestication in Triatominae. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94(1): 375-378.

- Schofield, C.J. y C. Galvão. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*. 110: 88-100.
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers- just a matter of fashion? *Nat Rev Genet*. 5: 63-69.
- Selkoe, K.A. y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett*. 9: 615–629.
- Sierra, R., C. Cerón, W. Palacios y R. Valencia. 1999. Mapa de vegetación del Ecuador continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF, Wild Life Conservation and EcoCiencia. Quito. Ecuador.
- Smith, L.R., T.M. Smith. 2005. *Ecología*. Cuarta edición. Pearson Educación S.A. Madrid. España.
- Sokal, R.R. 1979. *Systematic Zoology*. Testing statistical significance of geographic variation patterns. 28(2): 227-232.
- Suárez-Dávalos, M.V., O. Dangles, A.G. Villacís, M.J. Grijalva. 2010. Microdistribution of sylvatic triatomine populations in central-coastal Ecuador. *J Med Entomol*. 47(1): 80-88.
- Teixeira, A.R.L, N. Nitz, M.C. Guimaro, C. Gomes, C.A. Santos-Buch. 2006. Chagas Disease. *Postgrad Med J*. 82: 788-798.
- Triplehorn, C.A. y N.F. Johnson. 2005. *Borror's and DeLong's introduction to the study of insects*. 7th edition. Thomson Brooks/ Cole. USA.
- Tyler, K.M. y D.M. Engman. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*. 31: 472-481.
- Urban, D.L. 2003. *Spatial Analysis in Ecology* [en línea] <<http://www.nceas.ucsb.edu/files/scicomp/Dloads/SpatialAnalysisEcologists/SpatialEcologyMantelTest.pdf>> [Consultado: abril 2010].

- Villacís, A.G., L. Arcos-Terán, M.J. Grijalva. 2008. Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo Cruz. 103(7): 690-695.
- Villacís, A.G., M.J. Grijalva, S.S. Catalá. 2010. Phenotypic variability of *Rhodnius ecuadoriensis* populations at the Ecuadorian Central and Southern Andean Region. J Med Entomol. 47(6):1034-1043.
- Wang, J. 2004. Application of one-migrant per generation rule to conservation and management. Conserv Biol. 18(2): 332-343.
- Wigginton, J.E., D.J. Cutler, G.R. Abecasis. 2005. A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. Am J Hum Genet. 76:887–883.
- WHO Expert Committee on the Control of Chagas Disease. 2002. Control of Chagas disease. Second Report: 1-109.
- Yadón., Z.E., R.E. Gürtler, F. Tobar, A.C. Medici. 2006. La descentralización en el sector salud y el control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. Descentralización y Gestión del Control de las Enfermedades Transmisibles en América Latina. OPS, Buenos Aires. Argentina.
- Zacharias, C.A., G.B. Pontes, M.G. Lorenzo, G. Manrique. 2010. Flight Initiation by Male *Rhodnius prolixus* is Promoted by Female Odors. J Chem Ecol. 36:449–451.

9. FIGURAS

Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*

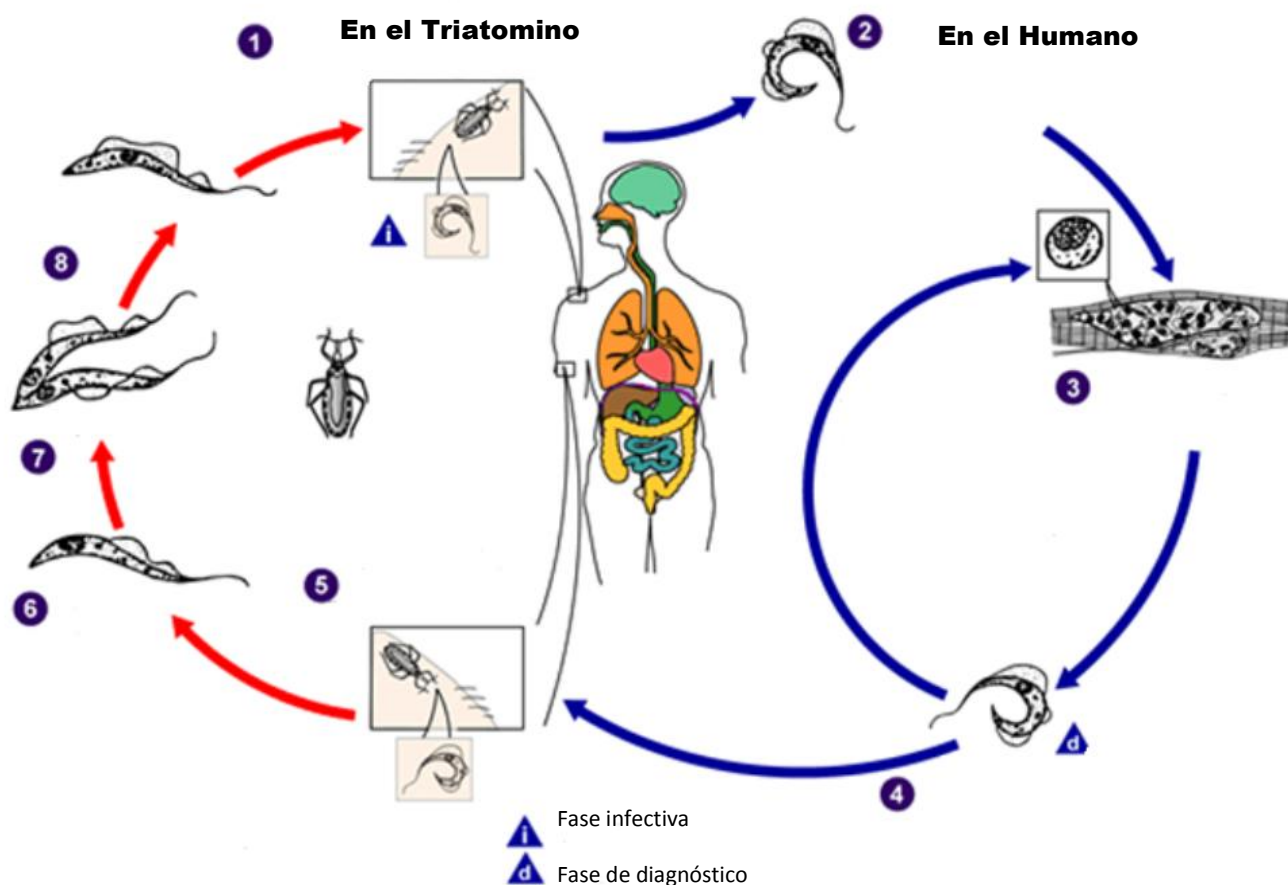


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (modificado de CDC [http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm])

1. Los triatominos son insectos hematófagos, transmiten al parásito *T. cruzi* a través de sus heces, en el estadio de trypomastigote metacíclico. Este ingresa al cuerpo a través de heridas o a través de membranas mucosas.
2. Los trypomastigotes penetran las células circundantes a la herida, donde se transforman en amastigotes.
3. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria en los tejidos infectados.
4. Los amastigotes intracelulares se transforman en trypomastigotes y salen hacia el torrente sanguíneo. Los trypomastigotes pueden infectar otras células y transformarse en amastigotes en nuevos sitios de infección. Por lo que las manifestaciones clínicas pueden ser resultado de este ciclo infeccioso.
5. El triatómino se alimenta de sangre adquiriendo el parásito.
6. Se desarrollan como epimastigotes en el intestino medio.
7. Se multiplica el parásito en el intestino medio.
8. Estos se transforman en trypomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatómino.



Figura 2. Colección de Triatominos en domicilio y peridomicilio Este proceso se inicia con un consentimiento informado y una encuesta entomológica, seguida de una búsqueda minuciosa dentro del domicilio y en áreas peridomiciliares. En el caso de encontrar Triatominos vivos la casa pasa a ser rociada con insectisida. Fotos: a) Consentimiento informado e encuesta entomológica, b) Búsqueda intradomiciliar c) y d) Acumulación de material en el peridomicilio e) Rociamiento.



Figura 3. Colección de Triatominos silvestres. Este proceso de inicia con la búsqueda de nidos de aves y mamíferos en la vegetación aledaña a las casas de la comunidad, seguida por una búsqueda manual de Triatominos. Fotos: a) Búsqueda de nidos de aves o mamíferos b) Nido de ardilla c) Búsqueda manual de Triatominos en nido.

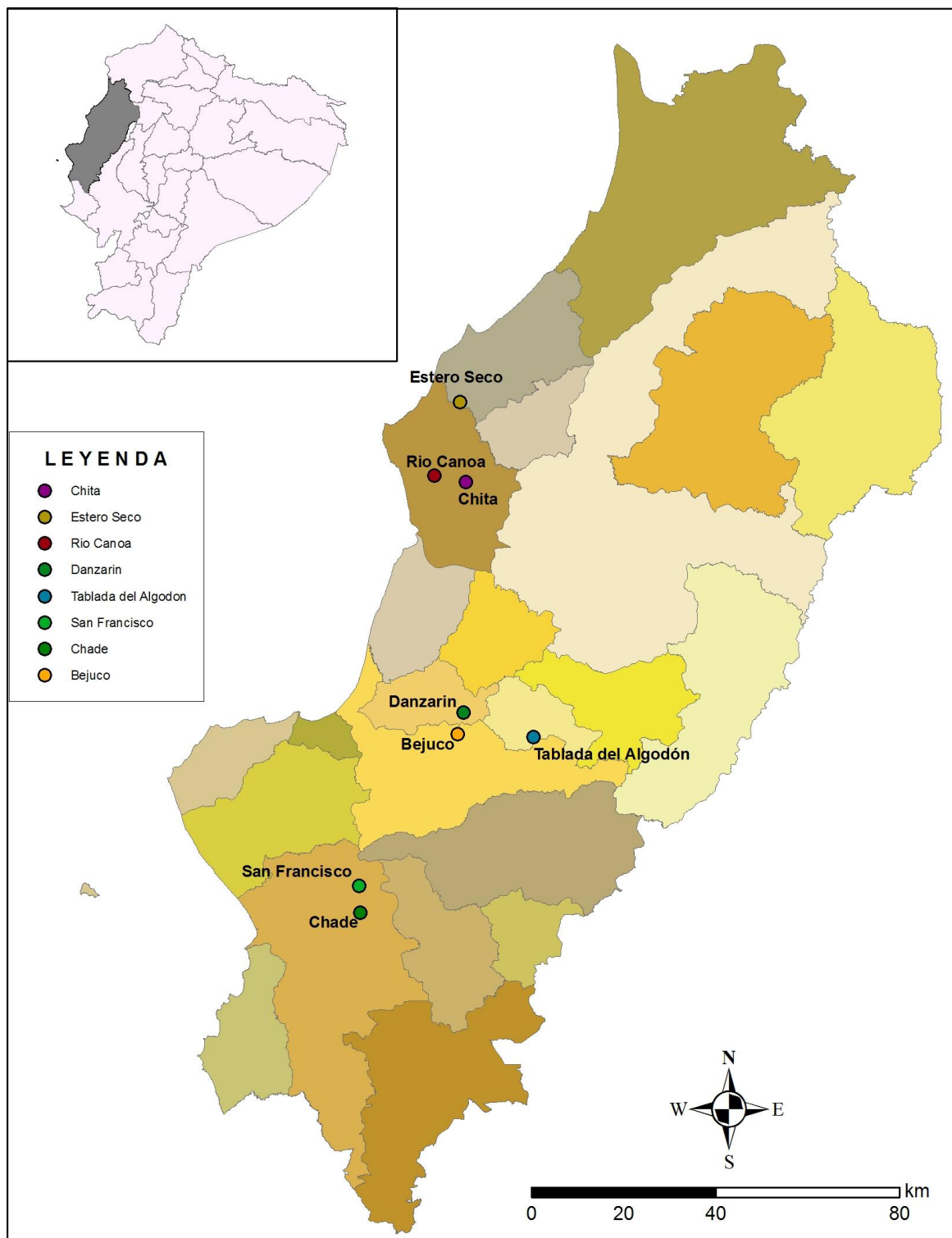


Figura 4. Mapa de las localidades escogidas para este estudio en la provincia de Manabí El mapa muestra la ubicación de 8 comunidades, en 5 cantones, donde se colectaron los triatomíneos para el estudio. Mapa: C. Yumiseva (CIEI).

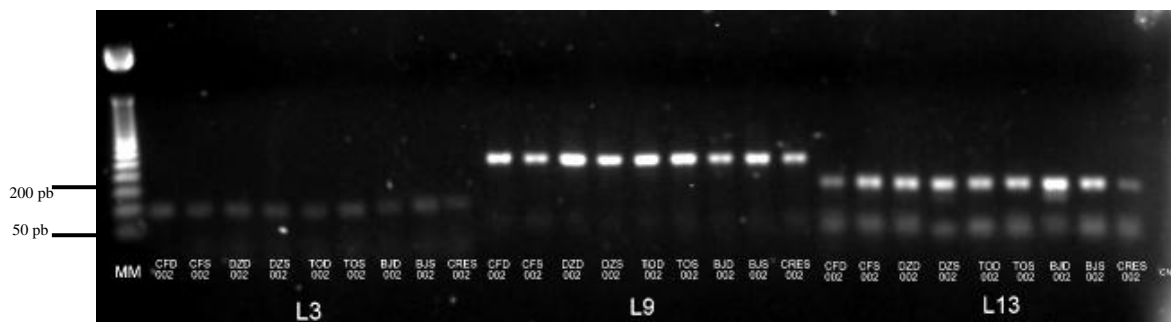


Figura 5. Amplificación de los microsatelites L3, L9 y L13 para individuos silvestres y sinantrópicos de *R. ecuadoriensis*, de las comunidades de Chande- San Francisco(CF), Danzarín (DZ), Tablada del Algodón (TO), El Bejuco (BJ) y triatominos silvestres del norte de Manabí (CRES). MM, marcador de peso molecular; CFD002, (*R. ecuadoriensis*, doméstico); CFS002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres); DZD002, (*R. ecuadoriensis*, doméstico); DZS002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres); TOD002, (*R. ecuadoriensis*, doméstico); TOS002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres), BJD002, (*R. ecuadoriensis*, doméstico); BJS002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres); CRES002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres).

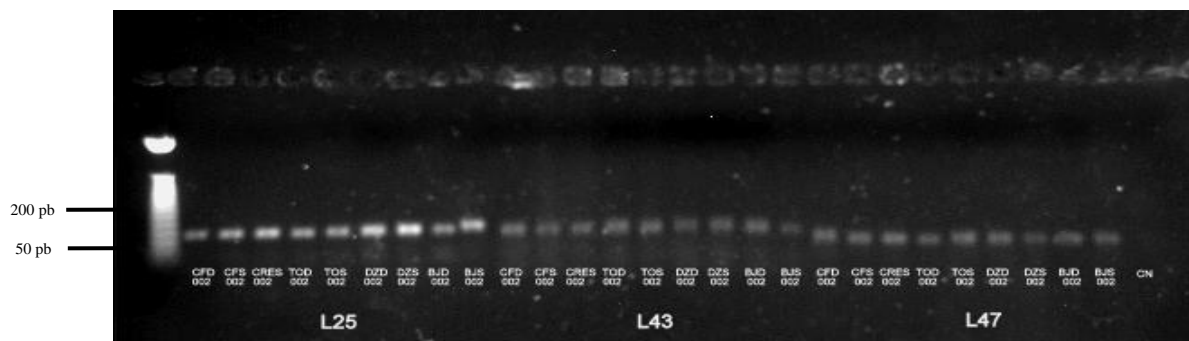


Figura 6. Amplificación de los microsatelites L25, L43 y L47 para individuos silvestres y sinantrópicos de *R. ecuadoriensis*, de las comunidades de Chande- San Francisco(CF), Danzarín (DZ), Tablada del Algodón (TO), El Bejuco (BJ) y triatomos silvestres del norte de Manabí (CRES). MM, marcador de peso molecular; CFD002, (*R. ecuadoriensis*, doméstico); CFS002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres); DZD002, (*R. ecuadoriensis*, doméstico); DZS002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres); TOD002, (*R. ecuadoriensis*, doméstico); TOS002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres), BJD002, (*R. ecuadoriensis*, doméstico); BJS002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres); CRES002, (*R. ecuadoriensis*, silvestres).

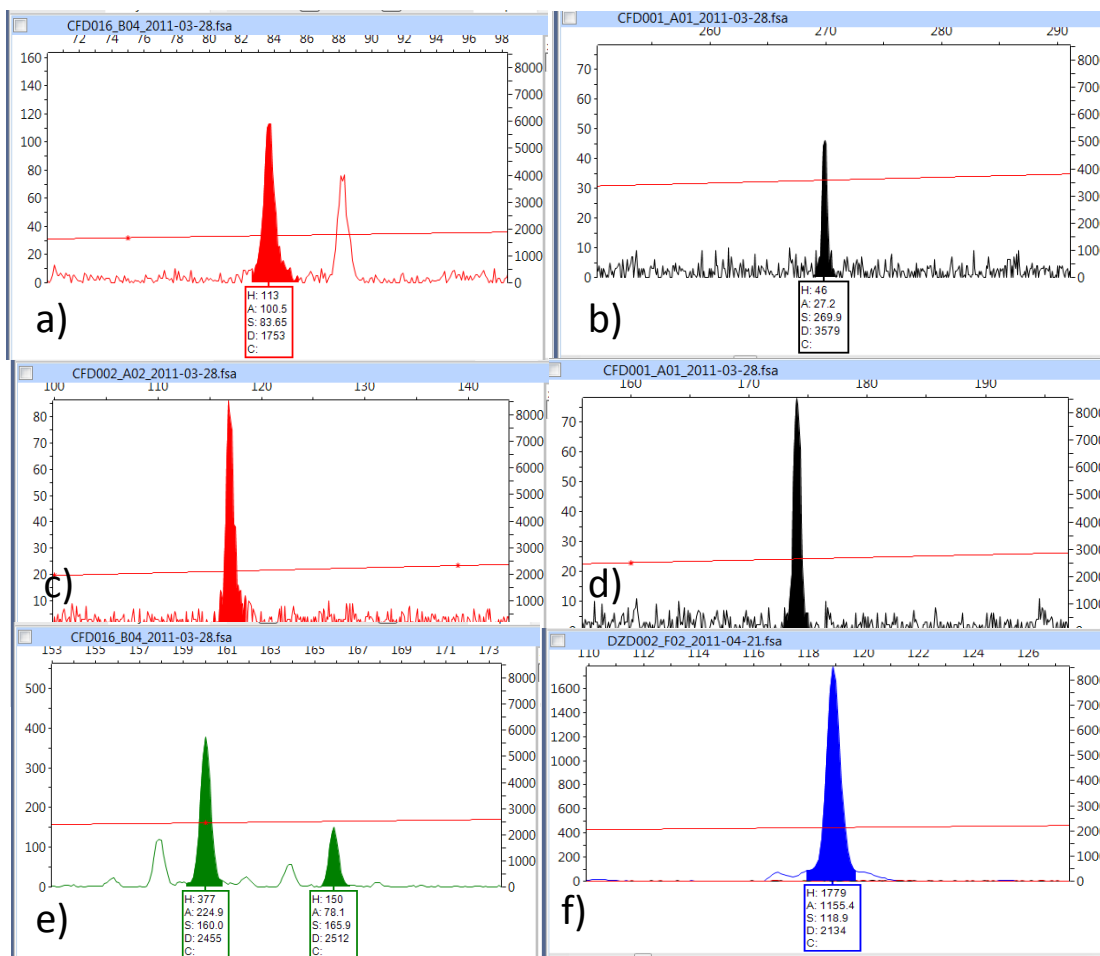


Figura 7. Perfiles de amplificación de los microsatélites de *R. pallescens* en individuos de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí: a) microsatélite L3, b) microsatélite L9, c) microsatélite L13; d) microsatélite L25, e) microsatélite L43 y d) microsatélite L47.

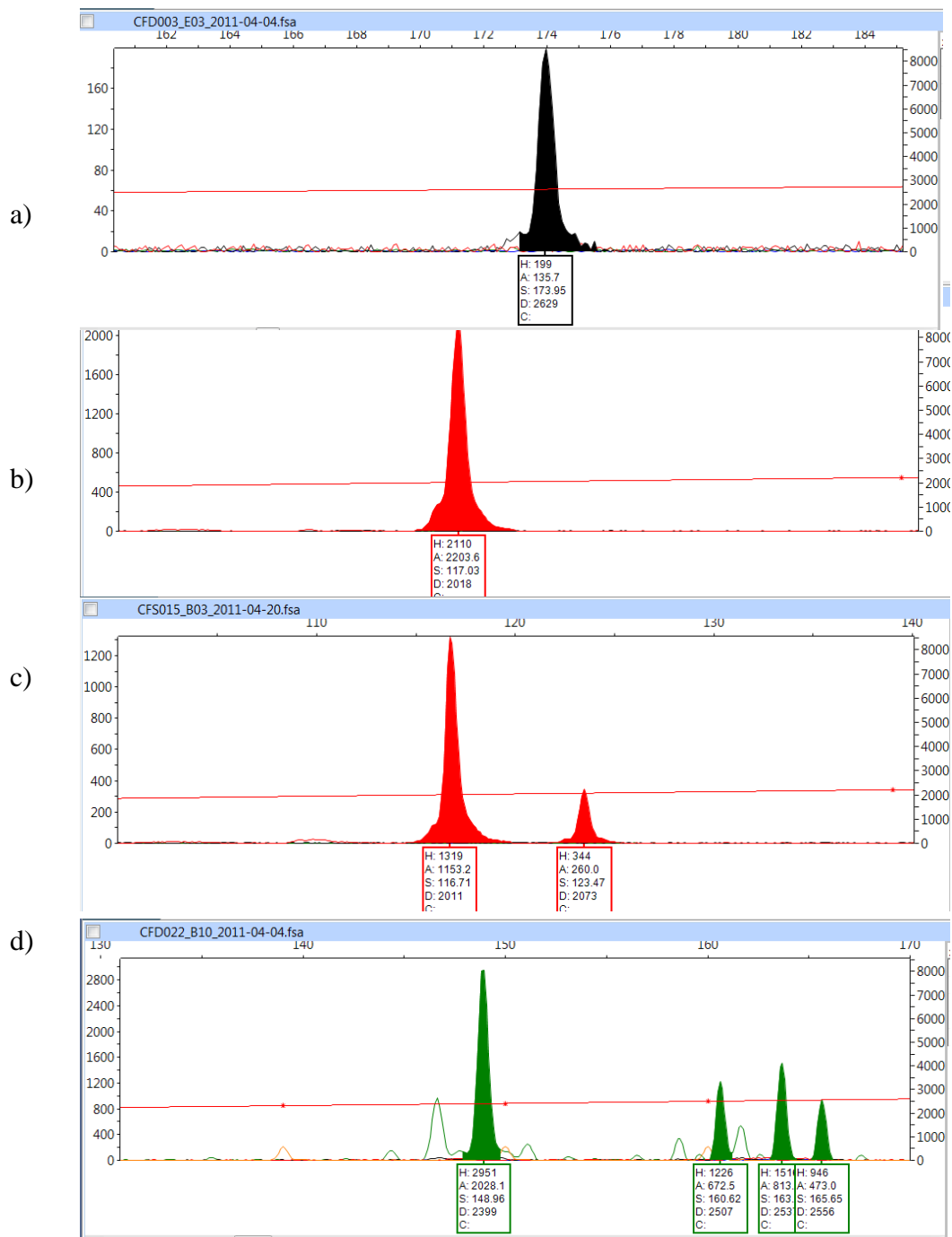


Figura 8. Perfiles de amplificación de un locus de microsatélites Espectrofluorogramas para determinar el tamaño de los alelos. La figura a corresponde al microsatélite monomórfico L25; las figuras b y c corresponden al microsatélite polimórfico L13, b) homocigoto y c) heterocigoto. La figura d) pertenece al microsatélite L43, el cual tuvo dificultad en la lectura por la presencia de picos ambiguos en el espectrofluorograma.

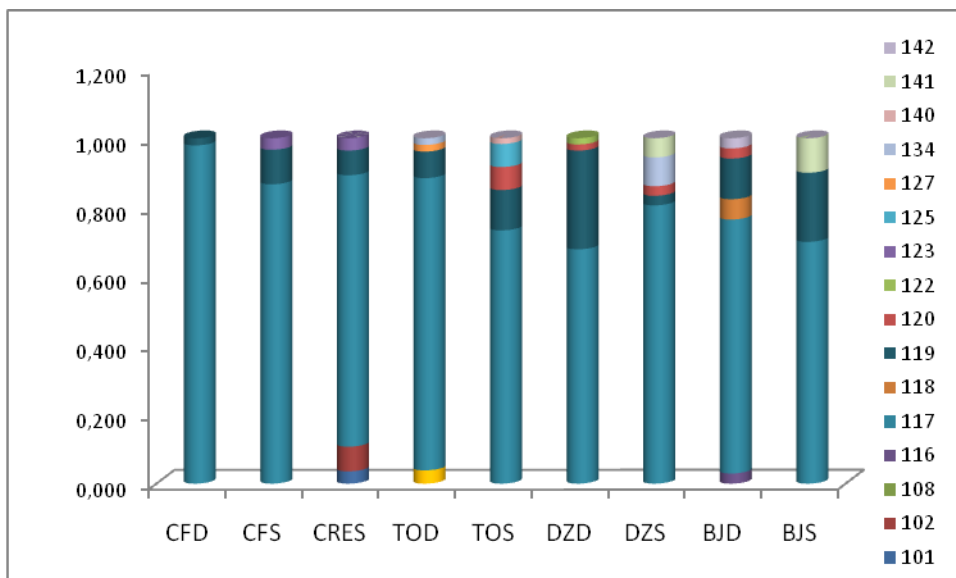


Figura 9. Frecuencia de alelos para el microsatélite L13: CFD (Chande-San Francisco sinantrópico); CFS (Chande-San Francisco silvestre); CRES (individuos silvestres del norte de Manabí); TOD (Tablada del Algodón sinantrópico); TOS (Tablada del Algodón silvestre); DZD (Danzarín sinantrópico); DZS (Danzarín silvestre); BJD (Bejuco sinantrópico) y BJS (Bejuco silvestres). Se registró un total de 16 alelos para el locus L13; el alelo con mayor frecuencia fue el alelo con 117 pb.

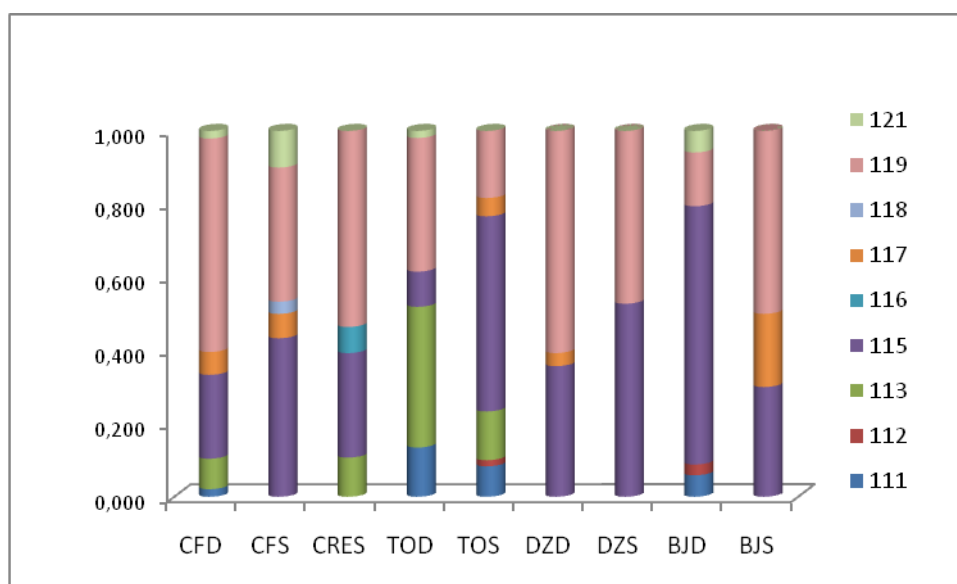


Figura 10. Frecuencia de alelos para el microsatélite L47: CFD (Chande-San Francisco sinantrópico); CFS (Chande-San Francisco silvestre); CRES (individuos silvestres del norte de Manabí); TOD (Tablada del Algodón sinantrópico); TOS (Tablada del Algodón silvestre); DZD (Danzarín sinantrópico); DZS (Danzarín silvestre); BJD (Bejuco sinantrópico) y BJS (Bejuco silvestres). Se registró un total de 9 alelos para el locus L47; los alelos con mayor frecuencia fueron los alelos con 119 pb y 115 pb.

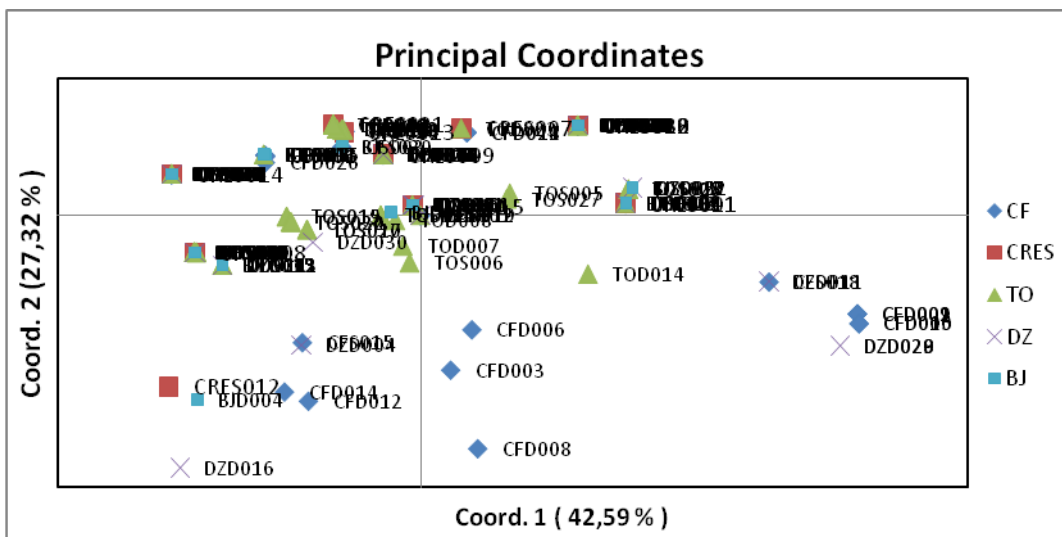


Figura 11 . PCA utilizando las distancias genéticas (GD). Cada punto en el plano indica los individuos perteneciente a las localidades analizadas. A través de este análisis no se observa una división entre individuos sinantrópicos o silvestres, ni por localidades. El porcentaje de variación del tercer eje explica el 15.48 %.

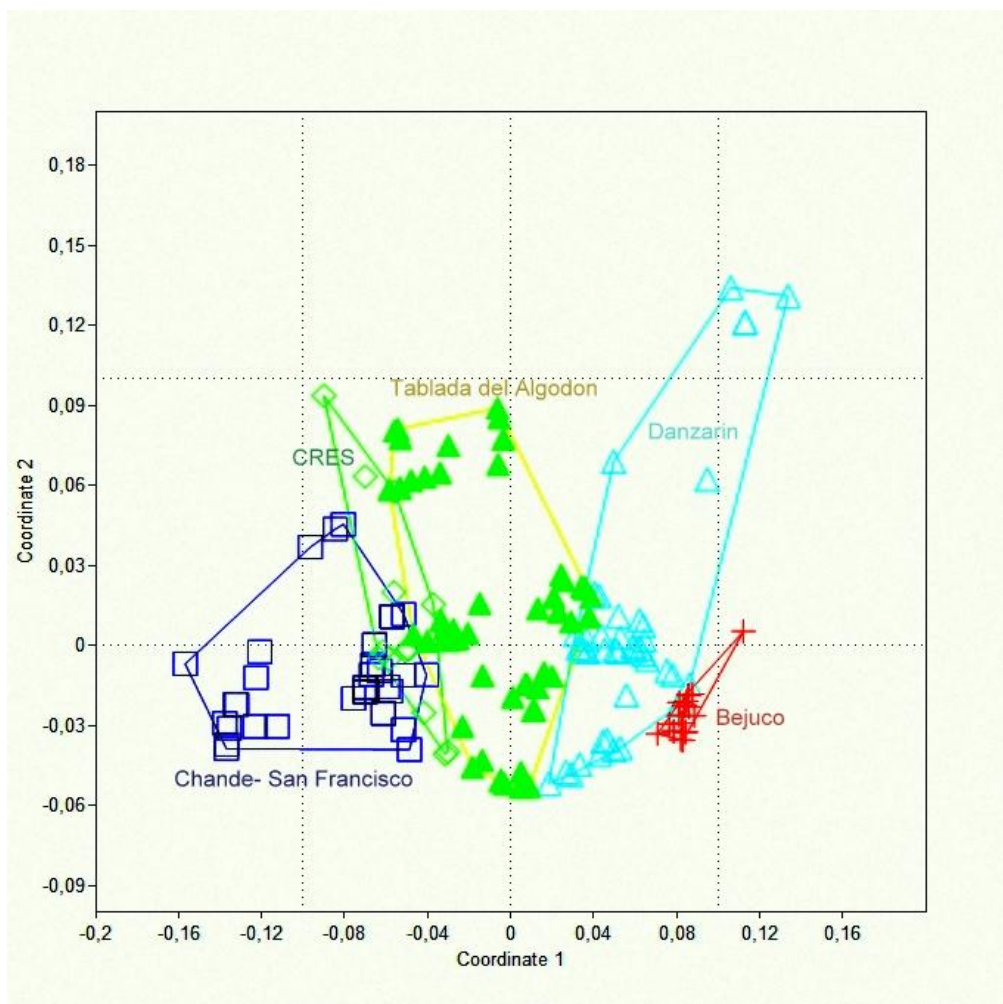


Figura 12. Análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS). Este análisis se realizó en complementación al Análisis de componentes principales, se observa agrupación de los individuos por comunidad (estrés = 0.99).

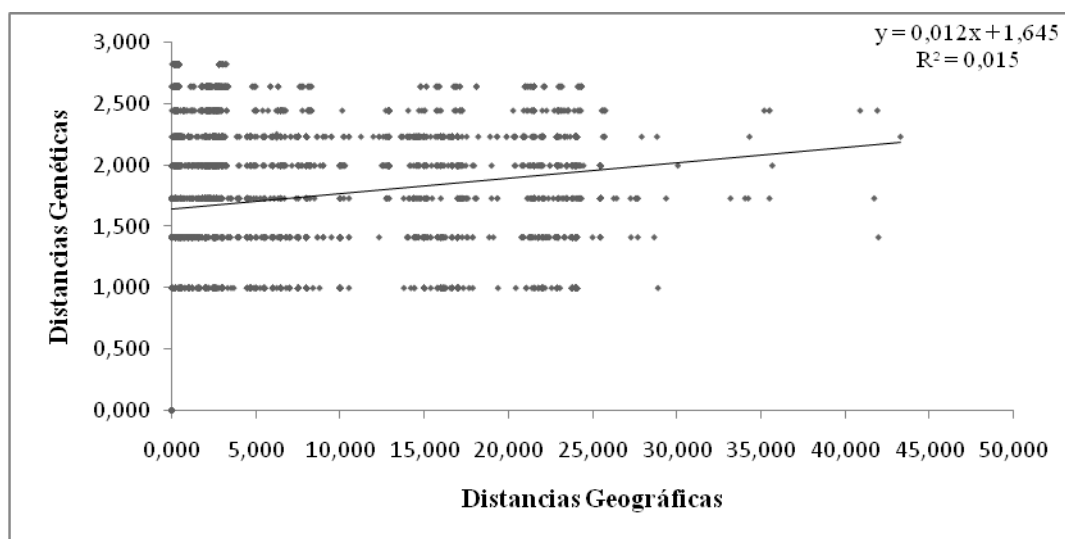


Figura 13. Correlación de la matriz de distancias genéticas (DAS) y geográficas (km). Se observa una correlación altamente significativa entre las dos matrices analizadas ($R_{xy} = 0.125$, $p = 0.004$).

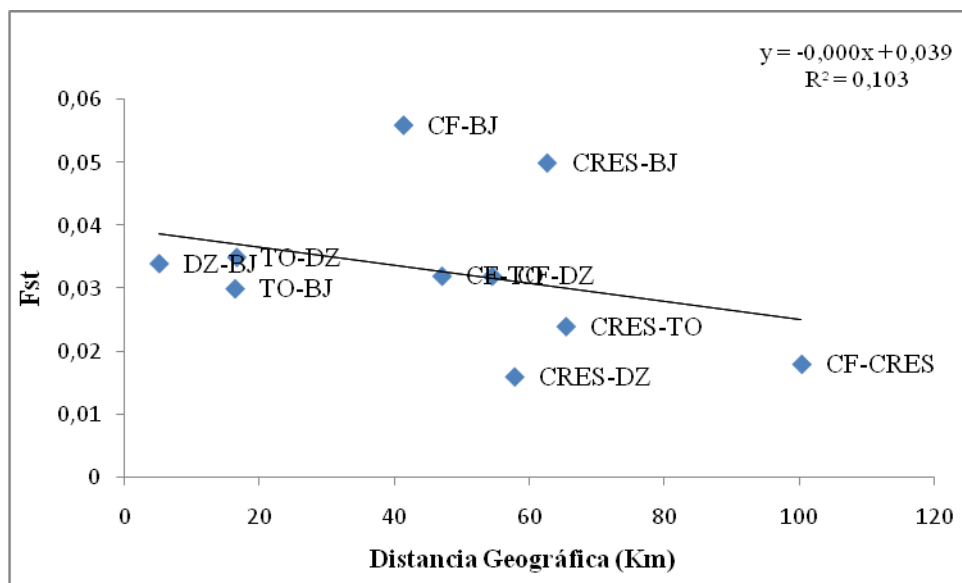


Figura 14. Regresión de Distancias Geográficas (km) vs F_{ST} . No se observa una correlación fuerte entre el índice de fijación F_{ST} y las distancias geográficas medida en km ($p = 0.365$).

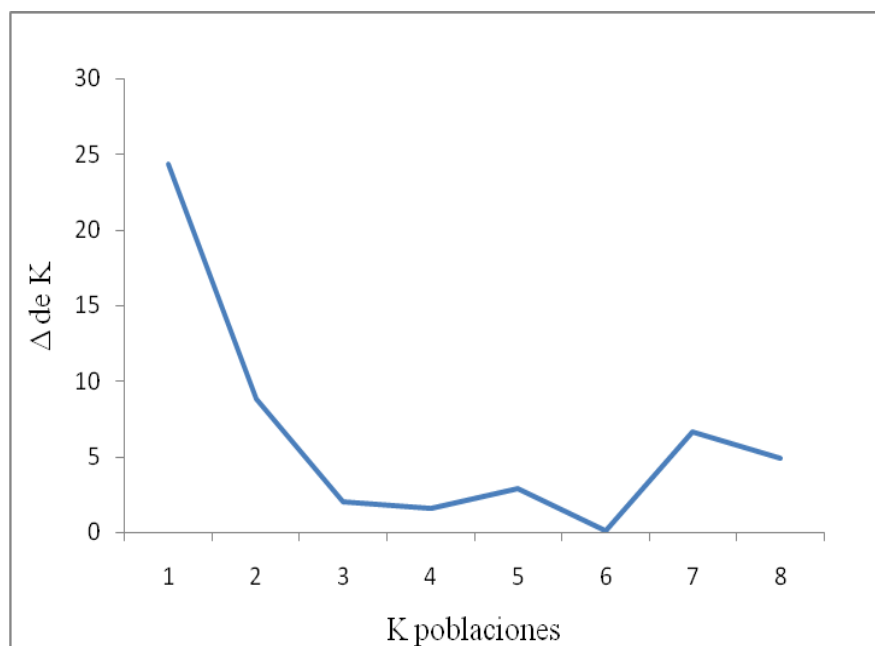


Figura 15. Gráfico del Δ de K para determinar el número de poblaciones de una muestra En poblaciones de *R. ecuadoriensis* en la provincia de Manabí se determinó que el número de poblaciones existentes es de $K = 1$.

10. TABLAS

Tabla 1. Localidades evaluadas en la provincia de Manabí: información geográfica y número de individuos de *R. ecuadoriensis* analizados por hábitat

Grupo	Comunidad	Cantón	Código	Longitud	Latitud	Altitud (m)	Individuos silvestres	Individuos sinantrópicos	Total de Individuos Analizados
1	El Bejuco	Portoviejo	BJ	-80.3446	-0.9721	65 – 400	30	30	60
2	Danzarín	Rocafuerte	DZ	-80.3345	-0.929731	114 – 170	30	30	60
3	Tablada del Algodón	Junín	TO	-80.1987	-0.977511	398 – 466	30	30	60
4	Chande San Francisco	Jipijapa	CF	-80.5323 -80.5393	-1.320328 -1.268361	305 - 482 446	30	30	60
5	Chita Río Canoa Estero Seco	San Vicente	CRES	-80.331 -80.3915 -80.3414	-0.480568 -0.467885 -0.323871	78 -150 27 - 197 84 - 240	30	-	30
TOTAL									270

Tabla 2. Información de los microsatélites de *Rhodnius pallescens*

Locus	Secuencias de los Primer (5' -3')	Orden de arreglo	Tamaño del producto de PCR (bp) en <i>R. pallescens</i>	Flourocromo	Número de alelos para <i>R. pallescens</i>
L3	F: AAGGGAGAAAGGCCTGAG R:TCGTGACATCCTTTGTGTAAG	(CA) ₈ N ₁₀ (CA) ₂	88-113	PET	11
L9	F: GGATGAAAAACCCAAGGA R:GCATTCAACTAATATCTCTTTAATT T	(TA) ₄ T(GT) ₉	277-297	NED	8
L13	F: CCGGTCAGGGAAACATCA R: GCCCTTGAAACTTACTTATCAGTT	(GT) ₉	166- 175	PET	6
L25	F: CGTGCGGTGCAACTACTC R: GGAGTTATTAATGAAAGTTTCGTG	A ₁₀ (GA) ₆	161-166	NED	5
L43	F: ACAGGTTGTACAGCGCGTC R:CATGTTCCGTCACGTAGGC	(GT) ₃ N ₈ (CT) ₂ (GT) ₁₃	114-135	VIC	8
L47	F: TGATTGAGAAAGTGTATGTTCGT R: TGTGCAAGTCAGCACGTC	(GT) ₅ N ₂ (GT) ₂ N ₂ (GT) ₇ N ₂ (GT) ₄	120-124	FAM	2

Tabla 3. Número de viviendas infestadas y triatominos en 8 localidades de la provincia de Manabí

Grupo	Localidad	Siglas	# Casas Infestadas	# Casas Examinadas	# de Casas Totales	# Numero de Casas con Ninfas	# de Triatominos	# de Ninfas	# de Adultos
1	Bejuco	BJ	22	86	119	19	536	423	113
2	Danzarín	DZ	6	31	49	6	227	197	30
3	Tablada del Algodón	TO	7	38	53	7	194	154	40
4	Chande	CD	6	59	106	4	153	135	18
4	San Francisco	SF	3	80	104	3	210	191	19
5	Chita	CI	1	42	58	1	1	1	0
5	Rio Canoa	RC	2	45	57	2	7	7	0
5	Estero Seco	ET	2	26	31	1	28	22	6
TOTAL			49	407	577	43	1356	1130	226

Tabla 4. Indicadores entomológicos para viviendas analizadas en 8 localidades de la provincia de Manabí

Grupo	Localidad	Siglas	Índice de Infestación %	Índice de Densidad	Índice de Hacinamiento	Índice de Colonización %
1	Bejuco	BJ	25.6	6.2	24,4	86.4
2	Danzarín	DZ	19.4	37.8	37.8	100
3	Tablada del Algodón	TO	18.4	5.1	27.7	100
4	Chande	CD	10.2	2.6	25.5	66.7
4	San Francisco	SF	3.8	2.6	70.0	100
5	Chita	CI	2.4	0	1.0	100
5	Río Canoa	RC	4.4	0.2	3.5	100
5	Estero Seco	ET	7.7	1.1	14.0	50
Total			12	3.3	27.7	87.8

Índice Infestación = número de casa infestadas / número de casas/ microhábitats examinados x 100

Índice de Densidad = número de triatominos capturados / número de casas/microhábitats examinados

Índice de Hacinamiento = número de triatominos capturados/ total de casas/ microhábitats examinados

Índice de Colonización = Número de casas con ninfas / número de casas/ microhábitats examinados x 100

Tabla 5. Microhábitats silvestres de 8 localidades de la provincia de Manabí

Grupo	Localidad	Siglas	# de microhábitat infestados	# de microhábitat	# microhábitats con ninfas	# de Triatominos colectados	# de Ninfas	# de Adultos
1	Bejuco	BJ	33	251	32	467	396	71
2	Danzarín	DZ	18	34	16	134	116	18
3	Tablada del Algodón	TO	29	64	26	364	302	62
4	Chande	CD	20	45	19	801	762	39
4	San Francisco	SF	51	116	46	837	757	80
5	Chita	CI	2	10	0	4	0	4
5	Rio Canoa	RC	7	29	6	32	23	9
5	Estero Seco	ET	1	12	1	26	14	12
TOTAL			161	561	146	2665	2370	295

Tabla 6. Indicadores entomológicos para microhábitats silvestres para 8 localidades de la provincia de Manabí

Grupo	Localidad	Siglas	Índice de Infestación %	Índice de Densidad	Índice de Hacinamiento	Índice de Colonización %
1	Bejuco	BJ	13.1	1.9	14.2	97.0
2	Danzarín	DZ	52.9	3.9	7.4	88.9
3	Tablada del Algodón	TO	45.3	5.7	12.6	89.7
4	Chande	CD	44.4	17.8	40.1	95.0
4	San Francisco	SF	44.0	7.2	16.4	90.2
5	Chita	CI	20.0	0.4	2.0	-
5	Rio Canoa	RC	24.1	1.1	4.6	85.7
5	Estero Seco	ET	8.3	2.2	26.0	100
	Total		28.7	4.75	16.6	90.7

Tabla 7. Microsatélites de *R. pallescens* utilizados en poblaciones de *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí

Locus	Tamaño del producto de PCR (pb)	No. de Alelos	No. de Alelos privados	Categoría
L3	78-86	4	-	Difícil de leer
L9	269	1	-	Monomórfico
L13	101-142	16	2	Polimórfico
L25	174	1	-	Monomórfico
L43	149-170	9	-	Difícil de leer
L47	111-121	9	10	Polimórfico

Tabla 8. Tamaño en pares de bases de los alelos de individuos de *R. ecuadoriensis* Manabí para las comunidades de Danzarín (DZ), Tablada del Algodón (TO) y Chande- San Francisco (CF) de la provincia de Manabí

Código muestra	Loci analizados				Código muestra	Loci analizados				Código muestra	Loci analizados			
	L13	L13	L47	L47		L13	L13	L47	L47		L13	L13	L47	L47
DZD001	117	119	115	115	TOD001	117	117	113	113	CFD001	117	117	119	119
DZD002	117	119	119	119	TOD003	117	117	113	113	CFD002	117	117	119	119
DZD003	117	122	115	115	TOD004	117	119	119	119	CFD003	117	117	113	113
DZD004	117	119	115	117	TOD005	117	117	115	119	CFD005	117	117	119	119
DZD006	117	117	119	119	TOD007	117	119	111	111	CFD006	117	117	115	119
DZD007	117	117	119	119	TOD008	117	119	111	113	CFD008	117	117	117	117
DZD008	117	117	115	119	TOD009	117	117	111	113	CFD009	117	117	119	119
DZD009	117	119	119	119	TOD010	117	117	113	113	CFD010	117	117	119	119
DZD010	117	117	115	115	TOD011	117	117	119	119	CFD011	117	119	119	119
DZD011	117	117	119	119	TOD014	108	108	113	119	CFD012	117	117	111	115
DZD012	117	119	115	115	TOD015	117	119	113	113	CFD014	117	117	115	115
DZD013	117	117	119	119	TOD016	117	127	115	119	CFD015	117	117	115	121
DZD015	117	117	119	119	TOD017	117	134	113	113	CFD016	117	117	113	113
DZD016	119	119	115	115	TOD018	117	117	113	121	CFD017	117	117	115	119
DZD017	117	117	119	119	TOD020	117	117	119	119	CFD018	117	117	119	119
DZD018	117	117	115	119	TOD021	117	117	113	113	CFD021	117	117	119	119
DZD019	117	119	115	119	TOD022	117	117	115	119	CFD024	117	117	115	115
DZD020	119	119	119	119	TOD023	117	117	113	119	CFD025	117	117	115	115
DZD021	117	119	115	115	TOD024	117	117	115	119	CFD026	117	117	115	117
DZD022	117	120	119	119	TOD025	117	117	119	119	CFD027	117	117	119	119
DZD023	117	117	119	119	TOD030	117	117	111	111	CFD028	117	117	119	119
DZD024	117	117	115	115	TOD031	117	117	119	119	CFD029	117	117	119	119
DZD025	117	117	115	119	TOD032	117	117	115	119	CFD030	117	117	119	119
DZD027	117	117	119	119	TOD033	117	117	113	113	CFD031	117	117	119	119
DZD028	119	119	119	119	TOD034	117	117	119	119	CFS001	117	119	115	119
DZD029	119	119	119	119	TOD042	117	117	111	113	CFS002	117	119	119	119

DZD030	117	119	115	117	TOS001	117	117	119	119	CFS003	117	117	115	121
DZD031	117	117	119	119	TOS002	117	119	115	115	CFS005	117	117	119	119
DZS001	117	117	115	119	TOS003	117	117	111	115	CFS007	117	117	119	119
DZS002	117	134	115	119	TOS004	117	117	115	115	CFS009	117	117	115	115
DZS003	117	117	115	115	TOS005	117	120	112	119	CFS013	117	117	115	115
DZS007	117	117	119	119	TOS006	117	119	117	117	CFS014	117	117	115	115
DZS010	117	134	119	119	TOS007	117	117	119	119	CFS015	117	123	115	118
DZS011	117	141	115	119	TOS008	117	125	115	115	CFS017	117	117	121	121
DZS015	117	119	115	115	TOS009	117	117	115	119	CFS025	117	117	119	119
DZS017	117	134	119	119	TOS010	117	117	115	115	CFS027	117	117	115	115
DZS018	117	120	119	119	TOS011	117	117	111	111	CFS029	117	119	119	119
DZS019	117	117	119	119	TOS012	117	119	115	119	CFS030	117	117	117	117
DZS020	117	117	115	119	TOS013	117	117	115	119	CFS031	117	117	115	115
DZS023	117	141	115	115	TOS014	117	140	113	113					
DZS024	117	117	119	119	TOS015	117	125	113	115					
DZS026	117	117	115	115	TOS016	117	117	113	113					
DZS027	117	117	115	119	TOS017	117	119	113	115					
DZS028	117	117	115	115	TOS018	117	125	115	115					
DZS030	117	117	115	115	TOS019	117	125	113	115					
DZS031	117	117	115	115	TOS020	117	119	113	115					
					TOS021	117	117	115	115					
					TOS022	117	119	111	115					
					TOS023	117	119	115	115					
					TOS024	117	120	115	115					
					TOS025	117	120	115	115					
					TOS026	117	120	115	115					
					TOS027	117	117	117	119					
					TOS028	117	117	119	119					
					TOS030	117	117	111	115					
					TOS031	117	117	115	115					

*D = sinantrópico S= silvestre

Tabla 9. Tamaño en pares de bases, de los alelos de individuos de *R. ecuadoriensis* para las comunidades del norte de Manabí Chita-El Remojo- Río Canoa-Estero Seco (CRES) y El Bejuco (BJ) de la provincia de Manabí.

Código muestra	Loci analizados		Código muestra	Loci analizados	
	L13	L47		L13	L47
CRES001	117	119	BJD001	117	120
CRES007	117	117	BJD002	117	119
CRES008	101	117	BJD004	116	119
CRES009	117	117	BJD009	117	118
CRES010	117	117	BJD010	117	117
CRES011	117	119	BJD011	117	119
CRES012	102	102	BJD012	117	117
CRES013	117	117	BJD013	117	117
CRES014	117	117	BJD014	117	117
CRES015	117	123	BJD015	117	118
CRES018	117	117	BJD016	117	119
CRES021	117	117	BJD021	117	117
CRES022	117	117	BJD023	117	142
CRES030	117	117	BJD024	117	117
			BJD025	117	117
			BJD027	117	117
			BJD029	117	117
			BJS003	117	117
			BJS005	117	141
			BJS006	117	117
			BJS010	117	119
			BJS018	117	119

*D = sinantrópico S= silvestre

Tabla 10. Frecuencia de alelos para los microsatélites L13 y L47 en individuos *R. ecuadoriensis* de la provincia de Manabí

Locus	Alelo/n	Comunidades				
		CF	CRES	TO	DZ	BJ
	N	39	14	56	46	22
L13	101	0.000	0.036	0.000	0.000	0.000
	102	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000
	108	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000
	116	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023
	117	0.936	0.786	0.786	0.728	0.727
	118	0.000	0.000	0.000	0.000	0.045
	119	0.051	0.071	0.098	0.185	0.136
	120	0.000	0.000	0.036	0.022	0.023
	122	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000
	123	0.013	0.036	0.000	0.000	0.000
	125	0.000	0.000	0.036	0.000	0.000
	127	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000
	134	0.000	0.000	0.009	0.033	0.000
	140	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000
141	0.000	0.000	0.000	0.022	0.023	
142	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	
	N	39	14	56	46	22
L47	111	0.013	0.000	0.107	0.000	0.045
	112	0.000	0.000	0.009	0.000	0.023
	113	0.051	0.107	0.250	0.000	0.000
	115	0.308	0.286	0.330	0.424	0.614
	116	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000
	117	0.064	0.000	0.027	0.022	0.045
	118	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000
	119	0.500	0.536	0.268	0.554	0.227
	121	0.051	0.000	0.009	0.000	0.045

Tabla 11. Riqueza Alélica (definida como alelos/N)

Localidades	N	L13		L47		Total	
		Alelos	Riqueza	Alelos	Riqueza	Alelos	Riqueza
CFD	24	2	0.08	6	0.25	8	0.33
CFS	15	3	0.2	5	0.33	8	0.53
CRES	14	5	0.36	4	0.29	9	0.64
TOD	26	5	0.19	5	0.19	10	0.38
TOS	30	5	0.17	6	0.2	11	0.37
DZD	28	4	0.14	3	0.11	7	0.25
DZS	18	5	0.28	2	0.11	7	0.39
BJD	17	6	0.35	5	0.29	11	0.65
BJS	5	3	0.6	3	0.6	6	1.2

*D = sinantrópico S= silvestre

Tabla 12. Test estadísticos de parámetros genéticos y ecológicos, para las poblaciones silvestres y sinantrópicas de la provincia de Manabí

Población	N	PL	AE	Ae	Ar	H_O	H_E	Nm	F_{ST}	F_{IS}	K
Silvestre/ Sinantrópica	177	2	6	2	3.096	0.346 ± 0.038	0.465 ± 0.04	3.25	0.083	0.36	1

N = Número de individuos analizados.

PL = Número de loci polimórficos.

AE = Promedio del número de alelos exclusivos por locus, calculado en el programa GenAIEx 6.41.

ae= número de alelos efectivos en la población.

Ar = Riqueza alélica, calculado en el programa FSAT 2.932.

H_O = Proporción de heterocigocidad observada en todos los loci ± la desviación estándar. Calculado en el programa Arlequín versión 3.1.

H_E = Proporción de heterocigocidad esperada en todos los loci ± la desviación estándar. Calculado en el programa Arlequín versión 3.1.

Nm = Número de migrantes por generación, calculado en el programa Genalex 6.41.

F_{ST} = Índice de fijación, calculado en el programa Structure versión 2.2.

F_{IS} = Índice de endogamia sobre loci, calculado en el programa FSTAT 2.932..

K = Número de poblaciones calculadas a través del ΔK , calculado en el programa Structure versión 2.2.

Tabla 13. Diversidad Alélica (promedio de alelos por locus)

	N	L13 Alelos	L47 Alelos	Total Alelos
CFD	24	2	6	8
CFS	15	3	5	8
CRES	14	5	4	9
TOD	26	5	5	10
TOS	30	5	6	11
DZD	28	4	3	7
DZS	18	5	2	7
BJD	17	6	5	11
BJS	5	3	3	6
Diversidad Alélica		4.2	4.3	8.6

*D = sinantrópico S= silvestre

Tabla 14. Equilibrio Hardy- Weinberg por locus

Locus	H_O	H_E	χ^2	P	
L13	0.391	0.340	6.567	0.72	Ns
L47	0.301	0.590	24.017	0.02	*

ns = no significativo

* = significativo

Tabla 15. Análisis de similaridad (ANOSIM) utilizando distancias genéticas

	CF	CRES	TO	DZ	BJ
CF	0	0.9491	0.0049	0.5715	0.8613
CRES	0.9491	0	0.0001	0.0001	0.0001
TO	0.0049	0.0001	0	0.9998	0.9103
DZ	0.5715	0.0001	0.9998	0	0.6332
BJ	0.8613	0.0001	0.9103	0.6332	0

Tabla 16. Análisis de la Varianza Molecular

Fuente Variación	Gl	Suma de cuadrados	Componentes de la variancia	% Variación
Entre grupos	1	2.276	-0.00380	-0.73
Entre poblaciones dentro de grupos	7	20.622	0.04455	8.57
Dentro de poblaciones	509	243,952	0.47928	91.16
Total	517	266,849	0,52002	

Tabla 17. Cálculo del Δ de K para todas las muestras

# K	LK	Desviación estándar	L'K	L''K	Δ K
1	-805.24	0.0502625	-	-	-
2	-727.56	3.1928209	77.68	77.68	24.329583
3	-733.665	9.4850728	-6.105	-83.785	8.8333534
4	-722.45	8.425369	11.215	17.32	2.0556963
5	-695.545	9.6969054	26.905	15.69	1.618042
6	-710.15	14.098955	-14.605	-41.51	2.9441899
7	-682.77	338.77529	27.38	41.985	0.1239317
8	-783.89	19.405639	-101.12	-128.5	6.6217864
9	-794.055	18.392718	-10.165	90.955	4.9451636

K= número de poblaciones estimadas

LnP(D) = probabilidad de K

LK = promedio de 20 iteraciones de la LnP(D) por cada número de poblaciones o K

L'K = $L(K)_n - L(K)_{n-1}$

L''K = $L'(K)_n - L'(K)_{n-1}$

Δ K = $L''K / \text{Desviación estándar}$

11. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN con el kit DNeasy

Para la extracción de ADN del triatomino se utilizaron patas de individuos colectados. Las mestras fueron conservadas previamente en alcohol al 100% por lo que se procedió a quitar el exceso de alcohol con papel absorbente antes de la extracción. El tejido fue triturado con un bisturí estéril y macerado a través de un pistilo previamente autoclavado. Alrededor de 25 mg de tejido fueron colocados en un tubo eppendorf de 1.5 ml. A este se le adicionó 180 μ l de buffer ATL y 20 μ l de Proteinasa K para lisar el tejido, acompañado de un vortex para mezclar el contenido. Las muestras fueron colocadas en baño maría (56 °C) durante toda la noche como parte del proceso de lisis. Una vez completado el tiempo de incubación se realizó vortex a las muestras por 15 segundos, se adicionó 200 μ l de Buffer AL seguido de un vortex. Luego se añadieron 200 μ l de etanol al 100% para precipitar el ADN, acompañado de un vortex para mezclar el contenido (Qiagen, 2006).

Se pipeteo el contenido del eppendorf a la columna DNeasy mini spin introducida en tubo de colección de 2 ml. Se centrifugó la muestra a 8000 rpm por un minuto y se descartó el sobrenadante. En un nuevo tubo de colección se colocó la columna y se agregaron 500 μ l de Buffer AW1. La muestra fue centrifugada por un minuto a 8000 rpm y el sobrenadante fue descartado. La columna fue colocada en un nuevo tubo de colección, al que se agregaron 500 μ l del buffer AW2 y se centrifugó a 14 000 rpm por tres minutos, el sobrenadante fue una vez más descartado. Se colocó la columna un eppendorf autoclavado de 1.5 ml, a ésta se le agregó 200 μ l de Buffer AE a la membrana de la columna. Esta fue incubada a temperatura ambiente por un minuto y se procedió a centrifugar cada muestra por un minuto a 8000 rpm. Este último paso se realizó dos veces para obtener la mayor cantidad de ADN. El ADN fue almacenado a 4 °C (Qiagen, 2006).

Anexo 2. Individuos silvestres de la comunidad de El Bejuco

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha de colección	Código casa /punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
BJS001	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22JUN2009	BJ042-1	M	Silvestre	BJ5200
BJS002	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22JUN2009	BJN042-1	H	Silvestre	BJ5203
BJS003	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22JUN2009	BJN042-1	M	Silvestre	BJ5211
BJS004	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22JUN2009	BJN042-1	H	Silvestre	BJ5212
BJS005	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.25JUN2009	BJN035-1	M	Silvestre	BJ5222
BJS006	BEJUCO	EX: NIDO DE RATÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.25JUN2009	BJN046-1	III	Silvestre	BJ5249
BJS007	BEJUCO	EX: NIDO DE RATÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.25JUN2009	BJ046-1	II	Silvestre	BJ5251
BJS008	BEJUCO	EX: NIDO DE SUKACA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26JUN2009	BJN0121	III	Silvestre	BJ5261
BJS009	BEJUCO	EX: NIDO DE SUKACA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26JUN2009	BJN0121	III	Silvestre	BJ5262
BJS010	BEJUCO	EX: NIDO DE SUKACA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26JUN2009	BJ031-1	H	Silvestre	BJ5270

BJS011	BEJUCO	EX: NIDO DE SUKACA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26JUN2009	BJ031-1	V	Silvestre	BJ5271
BJS012	BEJUCO	EX: NIDO DE SUKACA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26JUN2009	BJ031-1	M	Silvestre	BJ5272
BJS013	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23JUN2009	BJN056-1	V	Silvestre	BJ4273
BJS014	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23JUN2009	BJN056-1	M	Silvestre	BJ4274
BJS015	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23JUN2009	BJN056-1	IV	Silvestre	BJ4275
BJS016	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26JUN2009	BJN064-1	M	Silvestre	BJ5398
BJS017	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26JUN2009	BJN064-1	H	Silvestre	BJ5399
BJS018	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26JUN2009	BJN064-1	H	Silvestre	BJ5400
BJS019	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJN078	H	Silvestre	BJ5621
BJS020	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJN078	IV	Silvestre	BJ5622
BJS021	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.11JUL2009	BJN030-1	M	Silvestre	BJ5628

BJS022	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.11JUL2009	BJN030-1	M	Silvestre	BJ5635
BJS023	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.11JUL2009	BJN02-3	III	Silvestre	BJ5637
BJS024	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.11JUL2009	BJN02-3	III	Silvestre	BJ5639
BJS025	BEJUCO	EX: NIDO DE RATÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJN027-4	H	Silvestre	BJ5643
BJS026	BEJUCO	EX: NIDO DE RATÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJN027-4	H	Silvestre	BJ5644
BJS027	BEJUCO	EX: NIDO DE RATÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJN027-4	H	Silvestre	BJ5645
BJS028	BEJUCO	EX: NIDO DE RATÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJN027-4	M	Silvestre	BJ5651
BJS030	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJN036-2	H	Silvestre	BJ5658
BJS031	BEJUCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJN036-2	M	Silvestre	BJ5660

Anexo 3. Individuos sinantrópicos de la comunidad de El Bejuco

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha de colección	Código casa/ punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
BJD001	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22JUN2009	BJ504	M	Peridomiciliar	BJ5201
BJD002	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22JUN2009	BJ504	M	Peridomiciliar	BJ5202
BJD003	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23JUN2009	BJ313	H	Peridomiciliar	BJ5208
BJD004	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23JUN2009	BJ313	M	Peridomiciliar	BJ5209
BJD005	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23JUN2009	BJ313	M	Peridomiciliar	BJ5210
BJD006	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ325	V	Peridomiciliar	BJ5213
BJD007	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ325	V	Peridomiciliar	BJ5214
BJD008	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ414	M	Peridomiciliar	BJ5225
BJD009	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ414	M	Peridomiciliar	BJ5226
BJD010	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ307	III	Peridomiciliar	BJ5231

BJD011	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ307	III	Peridomiciliar	BJ5232
BJD012	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ307	M	Peridomiciliar	BJ5233
BJD013	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ307	H	Peridomiciliar	BJ5234
BJD014	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ307	III	Peridomiciliar	BJ5236
BJD015	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ414	H	Peridomiciliar	BJ5237
BJD016	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ307	III	Peridomiciliar	BJ5238
BJD017	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ307	H	Peridomiciliar	BJ5239
BJD018	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ307	III	Peridomiciliar	BJ5240
BJD019	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	BJ414	M	Peridomiciliar	BJ5241
BJD020	BEJUCO	EX: NIDO DE PIJUI	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.10JUL2009	BJ209	M	Peridomiciliar	BJ5613
BJD021	BEJUCO	EX: NIDO DE PIJUI	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.10JUL2009	BJ209	IV	Peridomiciliar	BJ5614

BJD022	BEJUCO	EX: NIDO DE PIJUI	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJ306	H	Peridomiciliar	BJ5615
BJD023	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJ306	M	Peridomiciliar	BJ5619
BJD024	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJ307	H	Peridomiciliar	BJ5625
BJD025	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJ307	H	Peridomiciliar	BJ5626
BJD026	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJ307	H	Peridomiciliar	BJ5627
BJD027	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJ307	H	Peridomiciliar	BJ5629
BJD029	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	BJ307	H	Peridomiciliar	BJ5631
BJD030	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.13OCT2009	BJ307	M	Peridomiciliar	BJ5685
BJD031	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.13OCT2009	BJ307	IV	Peridomiciliar	BJ5688
BJD032	BEJUCO	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07DIC2009	BJ307	V	Peridomiciliar	BJ5819

Anexo 4. Individuos silvestres de la comunidad Danzarín

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha de colección	Código casa /punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
DZS001	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN204	H	Silvestre	DZ5664
DZS002	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN207	H	Silvestre	DZ5665
DZS003	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN207	H	Silvestre	DZ5666
DZS004	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN103	M	Silvestre	DZ5680
DZS005	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN103	M	Silvestre	DZ5681
DZS006	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN103	H	Silvestre	DZ5683
DZS007	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN203	H	Silvestre	DZ5691
DZS008	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN203	M	Silvestre	DZ5695
DZS009	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN113	M	Silvestre	DZ5705

DZS010	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN113	H	Silvestre	DZ5706
DZS011	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN114	H	Silvestre	DZ5713
DZS012	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN205	H	Silvestre	DZ5730
DZS013	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN106	M	Silvestre	DZ5731
DZS014	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN206	V	Silvestre	DZ5733
DZS015	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN202	M	Silvestre	DZ5734
DZS016	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ103	M	Silvestre	DZ5742
DZS017	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN106	IV	Silvestre	DZ5745
DZS018	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ103	IV	Silvestre	DZ5746
DZS019	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN104	V	Silvestre	DZ5752

DZS020	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN104	V	Silvestre	DZ5753
DZS021	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN104	V	Silvestre	DZ5754
DZS022	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN206	M	Silvestre	DZ5797
DZS023	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN206	H	Silvestre	DZ5798
DZS024	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN206	H	Silvestre	DZ5800
DZS025	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN103	V	Silvestre	DZ5803
DZS026	DANZARÍN	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN103	V	Silvestre	DZ5804
DZS027	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN205	V	Silvestre	DZ5807
DZS029	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN205	V	Silvestre	DZ5809
DZS030	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24OCT2009	DZN209	M	Silvestre	DZ5810

DZS031	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24OCT2009	DZN122	M	Silvestre	DZ5818
DZS032	DANZARÍN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	DZN217	H	Silvestre	DZ5865

Anexo 5. Individuos sinantrópicos de la comunidad de Danzarín (DZS)

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha de colección	Código casa /punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
DZD001	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ111	M	Peridomiciliar	DZ5696
DZD002	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	M	Peridomiciliar	DZ5697
DZD003	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	H	Peridomiciliar	DZ5698
DZD004	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	H	Peridomiciliar	DZ5699
DZD005	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ301	M	Peridomiciliar	DZ5701
DZD006	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ301	M	Peridomiciliar	DZ5702
DZD007	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ301	M	Peridomiciliar	DZ5703
DZD008	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ301	H	Peridomiciliar	DZ5704
DZD009	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ114	M	Peridomiciliar	DZ5720

DZD010	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	M	Peridomiciliar	DZ5732
DZD011	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24OCT2009	DZ207	M	Peridomiciliar	DZ5740
DZD012	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24OCT2009	DZ307	M	Peridomiciliar	DZ5741
DZD013	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	M	Peridomiciliar	DZ5751
DZD015	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ301	IV	Peridomiciliar	DZ5778
DZD016	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ301	IV	Peridomiciliar	DZ5779
DZD017	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ114	IV	Peridomiciliar	DZ5783
DZD018	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ114	IV	Peridomiciliar	DZ5784
DZD019	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	H	Peridomiciliar	DZ5786
DZD020	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	H	Peridomiciliar	DZ5787

DZD021	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	H	Peridomiciliar	DZ5788
DZD022	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	H	Peridomiciliar	DZ5789
DZD023	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ111	V	Peridomiciliar	DZ5794
DZD024	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	IV	Peridomiciliar	DZ5796
DZD025	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ114	H	Peridomiciliar	DZ5812
DZD026	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	V	Peridomiciliar	DZ5813
DZD027	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	V	Peridomiciliar	DZ5814
DZD028	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZ108	H	Peridomiciliar	DZ5866
DZD029	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN114	IV	Peridomiciliar	DZ5911
DZD030	DANZARÍN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.23OCT2009	DZN114	IV	Peridomiciliar	DZ5912
DZD031	DANZARÍN	EX: CAMA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fco.24OCT2009	N/A	H	Intradomiciliar	DZ6020

Anexo 6. Individuos silvestres de la comunidad Tablada del Algodón (TOS)

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha de colección	Código casa /punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
TOS001	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22OCT2009	TON222	M	Silvestre	TO5663
TOS002	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22OCT2009	TON221	M	Silvestre	TO5673
TOS003	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22OCT2009	TON221	H	Silvestre	TO5675
TOS004	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON219	M	Silvestre	TO5676
TOS005	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22OCT2009	TON131	H	Silvestre	TO5689
TOS006	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON119	M	Silvestre	TO5690
TOS007	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON111	M	Silvestre	TO5700
TOS008	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON120	H	Silvestre	TO5708
TOS009	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON120	H	Silvestre	TO5709

TOS010	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON120	M	Silvestre	TO5710
TOS011	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON102	M	Silvestre	TO5711
TOS012	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON102	IV	Silvestre	TO5712
TOS013	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON108	H	Silvestre	TO5757
TOS014	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON217	M	Silvestre	TO5758
TOS015	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON217	H	Silvestre	TO5759
TOS016	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON217	H	Silvestre	TO5760
TOS017	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON217	H	Silvestre	TO5773
TOS018	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON217	H	Silvestre	TO5774
TOS019	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON217	H	Silvestre	TO5792

TOS020	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON217	V	Silvestre	TO5793
TOS021	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TON214	M	Silvestre	TO5795
TOS022	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22OCT2009	TON140	V	Silvestre	TO5815
TOS023	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON217	V	Silvestre	TO5820
TOS024	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON102	V	Silvestre	TO5821
TOS025	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON109	V	Silvestre	TO5823
TOS026	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON109	V	Silvestre	TO5824
TOS027	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON103	M	Silvestre	TO5830
TOS028	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TON103	V	Silvestre	TO5831
TOS030	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22OCT2009	TON221	V	Silvestre	TO5833

TOS031	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.22OCT2009	TON221	V	Silvestre	TO5834
--------	------------------------	---------------------------	-----------------------------------	----------------	--------	---	-----------	--------

Anexo 7. Individuos sinantrópicos de la comunidad Tablada del Algodón (TOD)

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha de colección	Código casa /punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
TOD001	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA DEBAJO DE CAMA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO211	H	Intradomiciliar	TO5667
TOD002	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA DEBAJO DE CAMA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO211	H	Intradomiciliar	TO5668
TOD003	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA DEBAJO DE CAMA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO211	M	Intradomiciliar	TO5669
TOD004	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: ROPA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	M	Intradomiciliar	TO5670
TOD005	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: ROPA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	H	Intradomiciliar	TO5671
TOD006	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: ROPA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	M	Intradomiciliar	TO5672
TOD007	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO208	H	Peridomiciliar	TO5677
TOD008	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO208	M	Peridomiciliar	TO5678

TOD009	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO208	M	Peridomiciliar	TO5679
TOD010	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: CUYERA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO302	M	Peridomiciliar	TO5707
TOD011	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: COLCHÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	V	Intradomiciliar	TO5717
TOD012	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: COLCHÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	V	Intradomiciliar	TO5718
TOD013	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: COLCHÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	V	Intradomiciliar	TO5719
TOD014	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA DEBAJO DE CAMA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO211	V	Intradomiciliar	TO5726
TOD015	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA DEBAJO DE CAMA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO211	IV	Intradomiciliar	TO5727
TOD016	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA DEBAJO DE CAMA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO211	V	Intradomiciliar	TO5728
TOD017	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA DEBAJO DE CAMA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO211	V	Intradomiciliar	TO5729

TOD018	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO113	M	Peridomiciliar	TO5743
TOD020	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: CUYERA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO302	H	Peridomiciliar	TO5755
TOD021	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO302	M	Peridomiciliar	TO5756
TOD022	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: ESTERA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	V	Intradomiciliar	TO5763
TOD023	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: DENTRO DEL TOLDO	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	V	Intradomiciliar	TO5764
TOD024	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: DENTRO DEL TOLDO	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	H	Intradomiciliar	TO5765
TOD025	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: ROPA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	V	Intradomiciliar	TO5767
TOD030	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: COLCHÓN	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO104	H	Intradomiciliar	TO5816
TOD031	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: CUYERA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO302	H	Peridomiciliar	TO5826
TOD032	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: CUYERA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO302	H	Peridomiciliar	TO5827
TOD033	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: CUYERA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO302	M	Peridomiciliar	TO5828
TOD034	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: DENTRO DEL TOLDO	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20OCT2009	TO108	M	Intradomiciliar	TO5901
TOD042	TABLADA DEL ALGODÓN	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.21OCT2009	TO208	H	Peridomiciliar	TO6132

Anexo 8. Individuos silvestres de las comunidades de Chande y San Francisco (CFS)

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha de colección	Código casa /punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
CFS001	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FNN112	H	Silvestre	FN5244
CFS002	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.03JUL2009	FNN142	M	Silvestre	FN5246
CFS003	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.01JUL2009	FNN237	V	Silvestre	FN5263
CFS004	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE SUKACA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.01JUL2009	FNN127	V	Silvestre	FN5282
CFS005	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.03JUL2009	FNN144	H	Silvestre	FN5287
CFS006	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.03JUL2009	FNN144	M	Silvestre	FN5289
CFS007	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.03JUL2009	FNN144	V	Silvestre	FN5290
CFS008	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.01JUL2009	FNN229	H	Silvestre	F54292
CFS009	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.02JUL2009	FNN133	M	Silvestre	FN5300
CFS010	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.03JUL2009	FNN142	H	Silvestre	FN5306

CFS011	SAN FRANCISCO	EX: LEÑA-NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.02JUL2009	FNN342	M	Silvestre	FN5312
CFS012	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FNN221	V	Silvestre	FN5336
CFS013	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.03JUL2009	FNN257	M	Silvestre	FN5345
CFS014	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE AVE	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.03JUL2009	FNN252	V	Silvestre	FN5353
CFS015	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.03JUL2009	FNN251	H	Silvestre	FN5382
CFS016	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.08JUL2009	CDN213	M	Silvestre	CD5402
CFS017	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.10JUL2009	CDN108	M	Silvestre	CD5450
CFS018	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.10JUL2009	CDN108	H	Silvestre	CD5451
CFS019	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.08JUL2009	CDN216	M	Silvestre	CD5454
CFS020	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN05	H	Silvestre	CD5456
CFS021	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN205	H	Silvestre	CD5457

CFS022	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN213	H	Silvestre	CD5478
CFS023	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN213	M	Silvestre	CD5480
CFS024	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN213	IV	Silvestre	CD5481
CFS025	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.09JUL2009	CDN223	V	Silvestre	CD5513
CFS026	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN105	V	Silvestre	CD5521
CFS027	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN105	H	Silvestre	CD5523
CFS029	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN105	M	Silvestre	CD5529
CFS030	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CDN104	IV	Silvestre	CD5539
CFS031	CHANDE	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.09JUL2009	CDN305	V	Silvestre	CD5876

Anexo 9. Individuos sinantrópicos de las comunidades de Chande - San Francisco (CFD)

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha colección	Código casa / punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
CFD001	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATÓN EN LEÑA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FN204	V	Peridomiciliar	FN5253
CFD002	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATÓN EN LEÑA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FN204	V	Peridomiciliar	FN5255
CFD003	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATÓN EN LEÑA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FN204	M	Peridomiciliar	FN5256
CFD004	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATÓN EN LEÑA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FN204	M	Peridomiciliar	FN5257
CFD005	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATÓN EN LEÑA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FN204	H	Peridomiciliar	FN5258
CFD006	SAN FRANCISCO	EX: LEÑA- NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FN204	V	Peridomiciliar	FN5313
CFD007	SAN FRANCISCO	EX: LEÑA- NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FN204	H	Peridomiciliar	FN5314
CFD008	SAN FRANCISCO	EX: LEÑA- NIDO DE RATA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.30JUN2009	FN204	M	Peridomiciliar	FN5316
CFD009	SAN FRANCISCO	EX: LEÑA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.24JUN2009	FN405	V	Peridomiciliar	FN5378
CFD010	SAN FRANCISCO	EX: LEÑA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.29JUN2009	FN405	III	Peridomiciliar	FN5379
CFD011	SAN	EX: LEÑA	<i>Rhodnius</i>	Fcol.29JUN2009	FN405	V	Peridomiciliar	FN5380

CFD012	FRANCISCO SAN FRANCISCO	EX: PALOS	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.02JUL2009	FN216	H	Peridomiciliar	FN5381
CFD013	CHANDE	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.08JUL2009	CD507	M	Peridomiciliar	CD5422
CFD014	CHANDE	EX:PARED DE SALA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.08JUL2009	CD112	M	Intradomiciliar	CD5468
CFD015	CHANDE	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.08JUL2009	CD408	H	Peridomiciliar	CD5471
CFD016	CHANDE	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.08JUL2009	CD408	M	Peridomiciliar	CD5472
CFD017	CHANDE	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.08JUL2009	CD408	V	Peridomiciliar	CD5473
CFD018	CHANDE	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.08JUL2009	CD408	M	Peridomiciliar	CD5474
CFD019	CHANDE	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CD501	IV	Peridomiciliar	CD5502
CFD020	CHANDE	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CD501	H	Peridomiciliar	CD5504
CFD021	CHANDE	EX: NIDO DE CHACHAJA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CD501	IV	Peridomiciliar	CD5535
CFD022	CHANDE	EX: NIDO DE GALLINA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.07JUL2009	CD404	IV	Peridomiciliar	CD5583
CFD024	CHANDE	EX: PARED	<i>Rhodnius</i>	Fcol.07JUL2009	CDN107	H	Intradomiciliar	CD6175

CFD025	CHANDE	DORMITORIO EX: PARED SALA	<i>ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius</i>	Fcol.08JUL2009	CD113	M	Intradomiciliar	CD6177
CFD026	CHANDE	EX: NIDO DE GALLINA	<i>ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius</i>	Fcol.07JUL2009	CD404	H	Peridomiciliar	CD6184
CFD027	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATA	<i>ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius</i>	Fcol.20JUN2009	FN204	H	Peridomiciliar	FN6346
CFD028	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE RATA	<i>ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius</i>	Fcol.20JUN2009	FN204	H	Peridomiciliar	FN6347
CFD029	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE SUCACA - PERIDOMICILIO	<i>ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius</i>	Fcol.01JUL2009	FNN127	H	Peridomiciliar	FN6348
CFD030	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE SUCACA - PERIDOMICILIO	<i>ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius</i>	Fcol.01JUL2009	FNN127	M	Peridomiciliar	FN6349
CFD031	SAN FRANCISCO	EX: NIDO DE SUCACA - PERIDOMICILIO	<i>ecuadoriensis</i> <i>Rhodnius</i>	Fcol.01JUL2009	FNN127	M	Peridomiciliar	FN6350

Anexo 10. Individuos silvestres de las comunidades de Chita- Río Canoa- Estero Seco (CRES)

Código	Comunidad	EX:	Especie	Fecha de colección	Código casa/ punto	Sexo/ Estadio	Ecotopo	Código UEM
CRES001	CHITA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20FEB2010	CIN010	H	Silvestre	CI5981
CRES002	CHITA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20FEB2010	CIN010	H	Silvestre	CI5982
CRES003	CHITA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20FEB2010	CIN04	M	Silvestre	CI5983
CRES004	CHITA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.20FEB2010	CIN04	H	Silvestre	CI5984
CRES005	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.19FEB2010	RCN016	III	Silvestre	RC6047
CRES006	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.19FEB2010	RCN016	III	Silvestre	RC6048
CRES007	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.19FEB2010	RCN016	III	Silvestre	RC6049
CRES008	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	M	Silvestre	RC6050
CRES009	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	H	Silvestre	RC6051

CRES010	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	H	Silvestre	RC6052
CRES011	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	M	Silvestre	RC6053
CRES012	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	H	Silvestre	RC6054
CRES013	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	H	Silvestre	RC6056
CRES014	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	M	Silvestre	RC6057
CRES015	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	IV	Silvestre	RC6058
CRES016	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	IV	Silvestre	RC6059
CRES017	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.18FEB2010	RCN005	IV	Silvestre	RC6060
CRES018	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.19FEB2010	RCN011	M	Silvestre	RC6061
CRES019	RIO CANOA	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.19FEB2010	RCN011	M	Silvestre	RC6062
CRES020	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	H	Silvestre	ET6085

CRES021	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	M	Silvestre	ET6086
CRES022	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	H	Silvestre	ET6087
CRES023	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	H	Silvestre	ET6088
CRES024	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	M	Silvestre	ET6092
CRES025	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	M	Silvestre	ET6093
CRES026	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	M	Silvestre	ET6094
CRES027	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	IV	Silvestre	ET6095
CRES028	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	V	Silvestre	ET6096
CRES029	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	IV	Silvestre	ET6097
CRES030	ESTERO SECO	EX: NIDO DE ARDILLA	<i>Rhodnius ecuadoriensis</i>	Fcol.26FEB2010	ETN012	V	Silvestre	ET6098

Anexo 11. Análisis de la estructura poblacional usando el programa Arlequín ver 3.5.1.2

AMOVA ANALYSIS

Distance method: Pairwise differences

AMOVA design and results :

Reference: *Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984.*
Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992.
Weir, B. S., 1996.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	1	2.276	-0.00374 Va	-0.72
Among populations within groups	7	20.622	0.04165 Vb	8.01
Among individuals within populations	250	159.952	0.15774 Vc	30.34
Within individuals	259	84.000	0.32432 Vd	62.37
Total	517	266.849	0.51998	

Fixation Indices

FIS : 0.32722
 FSC : 0.07953
 FCT : -0.00719
 FIT : 0.37627

Significance tests (1023 permutations)

Vd and FIT : P(rand. value < obs. value) = 0.00000
 P(rand. value = obs. value) = 0.00000
 P-value = 0.00000+-0.00000

Vc and FIS : P(rand. value > obs. value) = 0.00000
 P(rand. value = obs. value) = 0.00000
 P-value = 0.00000+-0.00000

Vb and FSC : P(rand. value > obs. value) = 0.00000
 P(rand. value = obs. value) = 0.00000
 P-value = 0.00000+-0.00000

Va and FCT : P(rand. value > obs. value) = 0.59629
 P(rand. value = obs. value) = 0.00587
 P-value = 0.60215+-0.01361

Population specific FIS indices (1023 permutations)

Pop#	Name	FIS	P(Rand FIS>=Obs FIS)
1	DZD	0.62036	0.000000
2	BJD	0.49440	0.000000
3	CFD	0.50588	0.000000

4	DZS	0.34109	0.000000
5	TOD	0.15499	0.007820
6	TOS	0.41974	0.000000
7	BJS	0.21788	0.027370
8	CFS	0.19066	0.068426
9	CRES	0.30769	0.089932

=====
 == Comparisons of pairs of population samples
 =====

List of labels for population samples used below:

Label	Population name
1:	CFD
2:	CFS
3:	CRES
4:	TOD
5:	TOS
6:	DZD
7:	DZS
8:	BJD
9:	BJS

 Population pairwise FSTs

Distance method: Pairwise differences

	CFD	CFS	CRES	TOD	TOS	DZD	DZS	BJD	BJS
CFD	0.00000								
CFS	0.05539	0.00000							
CRES	0.01814	0.03195	0.00000						
TOD	0.08987	0.12145	0.06673	0.00000					
TOS	0.13725	0.03804	0.08324	0.11935	0.00000				
DZD	0.08557	0.05720	0.02865	0.14483	0.10406	0.00000			
DZS	0.07644	0.01655	0.03722	0.16102	0.05526	0.05872	0.00000		
BJD	0.23341	0.05919	0.14202	0.22155	0.01231	0.14776	0.07160	0.00000	
BJS	0.06106	0.02452	0.01389	0.10611	0.06925	-0.00440	0.04459	0.12190	0.00000

 FST P values

Number of permutations : 1023

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*								
2	0.05664+-0.0086	*							
3	0.24512+-0.0136	0.10352+-0.0088	*						
4	0.00781+-0.0024	0.00000+-0.0000	0.00781+-0.0031	*					
5	0.00000+-0.0000	0.01465+-0.0031	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	*				
6	0.01855+-0.0044	0.03809+-0.0063	0.11523+-0.0082	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	*			
7	0.01660+-0.0034	0.16602+-0.0113	0.06250+-0.0072	0.00000+-0.0000	0.00195+-0.0014	0.03125+-0.0052	*		
8	0.00000+-0.0000	0.04785+-0.0074	0.00000+-0.0000	0.00000+-0.0000	0.17480+-0.0124	0.00293+-0.0016	0.03223+-0.0056	*	
9	0.13086+-0.0124	0.30762+-0.0149	0.43066+-0.0137	0.00781+-0.0028	0.01367+-0.0031	0.58496+-0.0129	0.11719+-0.0103	0.01562+-0.0042	*

=====
 == Summary of computations done within populations
 =====

Expected heterozygosity

Locus#	CFD	CFS	CRES	TOD	TOS	DZD	DZS	BJD	BJS	Mean	s.d.	Tot. Het.
1	0.04167	0.24181	0.37662	0.28130	0.44314	0.46558	0.34429	0.45276	0.48421	0.34793		0.13450
2	0.60816	0.67345	0.62597	0.70437	0.65994	0.51169	0.50548	0.48663	0.65263	0.60315		0.07666
Mean	0.32491	0.45763	0.50130	0.49284	0.55154	0.48864	0.42488	0.46970	0.56842	0.47554		0.06762
s.d.	0.40057	0.30521	0.17632	0.29916	0.15331	0.03260	0.11398	0.02395	0.11909	0.18047		0.12175

Number of alleles

Locus#	CFD	CFS	CRES	TOD	TOS	DZD	DZS	BJD	BJS	Mean	s.d.	Tot. number
1	2	3	5	5	4	5	6	3	4.222	1.227		16
2	6	5	4	5	6	3	2	5	3	4.333	1.333	9
Mean	4.000	4.000	4.500	5.000	5.500	3.500	3.500	5.500	3.000	4.278	0.853	12.500
s.d.	2.828	1.414	0.707	0.000	0.707	0.707	2.121	0.707	0.000	1.021	0.889	4.950

////////////////////////////////////
 END OF RUN NUMBER 1 (25/06/11 at 13:31:43)
 Total computing time for this run : 0h 0m 50s 853 ms