

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación de *Panstrongylus howardi*
(Neiva, 1911) endémico de la provincia de Manabí, y su posible distribución en el
Ecuador.**

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

FRANCES DEBORAH CASTILLO ERAZO

Quito, 2017

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Frances Deborah Castillo Erazo ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Anita G. Villacís
Directora de la Disertación
Quito, 12 de julio 2017

DEDICATORIA

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis padres, sin ustedes, este paso y todos los anteriores no se hubieran logrado. Paúl, por tu apoyo a lo largo de los años.

Agradezco al Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL), en especial a la Dra. Anita Villacís, por su entrega para la realización de éste trabajo. Al Msc.SIG. Cesar Yumiseva y a la Dra. Ana Lucía Moncayo por sus consejos y apoyo contribuyendo a la realización de esta disertación.

Un agradecimiento especial para Santiago Cadena por su apoyo en el insectario.

Agradezco de igual manera a las comunidades de Manabí, siempre dispuestas a colaborar para el desarrollo de la investigación sobre la ECh.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	V
TABLA DE CONTENIDO.....	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE ANEXOS	XI
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. HISTORIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	3
3.2. EPIDEMIOLOGÍA ACTUAL DE LA ECh	4
3.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> , AGENTE CAUSAL DE LA ECh	6
3.4. SINTOMATOLOGÍA DE LA ECh	7
3.5. TRATAMIENTO.....	8
3.6. TRIATOMINAE, INSECTOS QUE TRANSMITEN LA ECh.....	9
3.6.1. TRIATOMINOS EN EL ECUADOR Y SUS HÁBITATS	10
3.6.2. EL GÉNERO <i>Panstrongylus</i>	11
3.6.3. <i>Panstrongylus howardi</i>	12
3.7. CAPACIDAD VECTORIAL.....	12
3.8. MODELAMIENTO DE NICHO ECOLÓGICO	13
3.9. CONTROL VECTORIAL EN EL ECUADOR	14
3.10. OBJETIVO GENERAL	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18

4.1.	SITIO DE ESTUDIO	18
4.2.	OBTENCIÓN DE PARENTALES <i>Panstrongylus howardi</i>	19
4.3.	SELECCIÓN DE NINFAS DE ESTADIO V (NV) PARA OBTENER PAREJAS.....	19
4.4.	ALIMENTACIÓN DE <i>Panstrongylus howardi</i>	20
4.5.	CICLO DE VIDA.....	20
4.6.	HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN Y DEFECACIÓN	20
4.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y DESCRIPCIÓN DE VARIABLES	21
4.7.1.	CICLO DE VIDA Y MORTALIDAD DE <i>Panstrongylus howardi</i>	22
4.7.2.	HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN Y DEFECACIÓN.....	23
4.8.	ANÁLISIS DE NICHO ECOLÓGICO.....	24
5.	RESULTADOS	26
5.1.	CICLO DE VIDA DE <i>Panstrongylus howardi</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO	26
5.2.	MORTALIDAD DE <i>Panstrongylus howardi</i>	26
5.3.	HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN Y DEFECACIÓN DE <i>Panstrongylus howardi</i> BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.....	27
5.3.1.	TIEMPO DE INGRESO DE LA PROBÓSCIDE (min)	27
5.3.2.	TIEMPO DE ALIMENTACIÓN (min)	28
5.3.3.	CANTIDAD DE SANGRE INGERIDA (mg).....	28
5.4.	HÁBITOS DE DEFECACIÓN DE <i>Panstrongylus howardi</i>	29
5.5.	NICHO ECOLÓGICO	30
6.	DISCUSIÓN.....	32
6.1.	CICLO DE VIDA DE <i>Panstrongylus howardi</i>	33
6.1.1.	MORTALIDAD DE <i>Panstrongylus howardi</i>	34
6.2.	HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN DE <i>Panstrongylus howardi</i>	36
6.2.1.	TIEMPO DE INGRESO DE LA PROBÓSCIDE.....	36
6.2.2.	TIEMPO DE ALIMENTACIÓN	36

6.2.3.	CANTIDAD DE SANGRE INGERIDA	38
6.3.	PATRONES DE DEFECACIÓN DE <i>Panstrongylus howardi</i>	39
6.4.	MODELO DE NICHOS ECOLÓGICO.....	40
7.	CONCLUSIONES	43
7.1.	CICLO DE VIDA DE <i>Panstrongylus howardi</i>	43
7.2.	MORTALIDAD DE <i>Panstrongylus howardi</i>	43
7.3.	HABITOS DE ALIMENTACIÓN.....	44
7.4.	TIEMPO PRE-ALIMENTACIÓN.....	44
7.5.	TIEMPO ALIMENTACIÓN	44
7.6.	CANTIDAD DE ALIMENTO.....	45
7.7.	EFICACIA VECTORIAL.....	45
7.8.	NICHOS ECOLÓGICO	45
8.	RECOMENDACIONES	46
9.	BIBLIOGRAFIA.....	47
10.	FIGURAS.....	59
11.	TABLAS	69
12.	ANEXOS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 2.	Mapa de Portoviejo, Provincia de Manabí, indicando las localidades de infestación y colectas de <i>Panstrongylus howardi</i>	61
Figura 3.	Ciclo de vida de <i>Panstrongylus howardi</i>	62
Figura 4.	Porcentaje de mortalidad de <i>Panstrongylus howardi</i>	63
Figura 5.	Curvas de supervivencia de <i>Panstrongylus howardi</i>	64
Figura 6.	Tiempo de alimentación (min) por estadio ninfal	65
Figura 7.	Alimento ingerido (mg. de sangre) por estadio ninfal de <i>Panstrongylus howardi</i>	66
Figura 8.	Defecación de <i>Panstrongylus howardi</i> por estadio ninfal.....	67
Figura 9.	Mapa del Ecuador, mostrando predicciones de idoneidad de condiciones o áreas aptas para <i>Panstrongylus howardi</i>	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Análisis del ciclo de vida de <i>Panstrongylus howardi</i> .	70
Tabla 2.	Mortalidad de <i>Panstrongylus howardi</i>	71
Tabla 3.	Supervivencia por estadio y total de <i>Panstrongylus howardi</i>	72
Tabla 4.	Tiempo (minutos) de ingreso de la probóscide de <i>Panstrongylus howardi</i>	73
Tabla 5.	Hábitos de alimentación (Tiempo mínimo y máximo (minutos) de alimentación) de <i>Panstrongylus howardi</i> en condiciones de laboratorio.	74
Tabla 6.	Cantidad de sangre ingerida (mg.) por estadio ninfal de <i>Panstrongylus howardi</i>	75
Tabla 7.	Dinámica de defecación de <i>Panstrongylus howardi</i>	76
Tabla 8.	Resumen de los hábitos de alimentación y defecación de <i>Panstrongylus howardi</i> bajo condiciones de laboratorio	77

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Calculo de Kruskal Wallis obtenidos para el ciclo de vida de <i>Panstrongylus howardi</i> ...	79
Anexo 2. Análisis de supervivencia de Log-rank para <i>Panstrongylus howardi</i>	80
Anexo 3. Análisis estadístico para el tiempo de picada de <i>Panstrongylus howardi</i>	81
Anexo 4. Análisis estadístico para el tiempo de alimentación de <i>Panstrongylus howardi</i>	83
Anexo 5. Análisis estadísticos para la cantidad de alimento ingerido por <i>Panstrongylus howardi</i> con.....	85
Anexo 6. Variables ecológicas utilizadas para el modelamiento de nicho ecológico	87
Anexo 7. Tablas con valores de contribución por variable climática de los análisis logísticos con 8 repeticiones.	90

1. RESUMEN

La Enfermedad de Chagas (ECh). Es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado, *Trypanosoma cruzi*, transmitida principalmente a través de las heces infectadas de insectos vectores pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. La importancia epidemiológica de *Panstrongylus howardi*, especie endémica de la provincia de Manabí, ha incrementado puesto que ha sido observada invadiendo y colonizando viviendas humanas, haciendo necesaria la descripción de su ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación así como de su posible distribución geográfica. Para este estudio se utilizaron 65 individuos descendientes de triatominos colectados en 8 comunidades rurales del cantón Portoviejo, los mismos que fueron mantenidos en condiciones controladas de $28\pm 6^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $80\pm 10\%$ de humedad relativa y fotoperiodos de 12 horas, condiciones que asemejan a su ambiente natural. Se realizó ofrecimientos de alimentación semanal con sangre de *Mus musculus*. Se registró el peso antes y después de la ingesta. Para el ciclo de vida se contabilizó el número de días necesarios para mudar de un estadio a otro, y total, así como la mortalidad por estadio ninfal y total. Para los hábitos de alimentación y defecación, se registró el tiempo de: a) picada b) alimentación y c) de la primera defecación, así como la d) cantidad de sangre ingerida. Para el análisis de los datos se utilizó estadística descriptiva e inferencial. Se obtuvo un total de $186,9\pm 12,2$ días hasta llegar a adulto, significando que es una especie bianual. La mortalidad más alta se observó en NI (32,3%) y NII (20%). La eficacia vectorial, incrementó a medida que se desarrollaban las etapas ninfales, especialmente en los estadios NIV y NV. El 67,34% de los individuos defecaron durante la alimentación, lo que demuestra que *P. howardi* debe ser considerada como una especie secundaria de vigilancia epidemiológica en la provincia de Manabí. Además, mediante modelamiento de nicho ecológico se encontró que las zonas con condiciones ambientales potenciales para ser habitadas por ésta especie se encuentran al Noreste y al Suroeste de la provincia de Manabí, así como un pequeño parche en la provincia de Loja.

Palabras claves: Ciclo de vida, Enfermedad de Chagas, hábitos de alimentación y defecación, modelamiento de nicho ecológico, *Panstrongylus howardi*.

2. ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic disease caused by the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*, transmitted mainly through infected feces of insect vectors belonging to the family Reduviidae, subfamily Triatominae. The epidemiological importance of *Panstrongylus howardi*, endemic species of the Manabí province, has increased since it has been observed invading and colonizing human dwellings, making necessary the description of its life cycle, feeding and defecation habits and its geographic distribution. In this study, 65 individuals from triatomines collected in 8 rural communities of the Portoviejo canton were used, which were maintained under controlled conditions of $28\pm 6^{\circ}\text{C}$ of temperature, $80\pm 10\%$ relative humidity and 12-hour photoperiods, similar conditions to its natural environment. Weekly feeding offerings were made with *Mus musculus* blood. Weight was recorded before and after intake. For the life cycle, the number of days needed to move from one stage to another, and its total, likewise, ninfal and total mortality were counted. For feeding and defecation habits, were measured the time of: a) pre-feeding b) feeding and c) of the first defecation, as well as d) the amount of blood ingested. Descriptive and inferential statistics were used. A total of 186.9 ± 12.2 days was obtained until reaching adult, meaning that it is a biannual species. The highest mortality was observed in NI (32.3%) and NII (20%). The vector efficacy increased as the nymphal stages developed, especially in the NIV and NV stages. 67.34% of the individuals defecated during feeding, which shows that *P. howardi* should be considered as a secondary species of epidemiological surveillance in the province of Manabí. In addition, through niche modeling it was found that the zones with potential environmental conditions to be inhabited by this species are to the Northeast and the Southwest of the province of Manabí, as well as a small patch in the province of Loja.

Keywords: Chagas Disease, ecological niche modeling, feeding and defecation patterns, Life cycle, *Panstrongylus howardi*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. HISTORIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

El perfil epidemiológico histórico de la Enfermedad de Chagas (ECh) puede ser dividido en cinco periodos. El primer periodo se establece con el origen del clado *cruzi* (*Trypanosoma cruzi*) en el supercontinente formado por los actuales, América del Sur, Australia, y Antártica, según varios autores se propone que el grupo Salivaria (*Trypanosoma brucei*) se diversificó hace aproximadamente 100 millones de años cuando Suramérica se separó de África (Rothhammer, Nuñez, Standen y Arriaza, 1985; Coimbra, 1988; Stevens y Gibson, 1999).

El segundo periodo empieza con la llegada de los humanos a las Américas (aprox. hace 26.000 – 12.000 años) en el actual territorio que cubre en el norte desde Estados Unidos hasta Argentina y Chile al sur, territorio donde se dio la primera infección accidental con *T. cruzi* (Aráujo, Jansen, Reinhard y Ferrara, 2009), probablemente debido a la incursión de poblaciones nómadas en ecotopos o territorios de la enfermedad, en búsqueda de recursos tales como alimento (Guhl et al., 2000).

El tercer periodo empieza hace alrededor de 10.000 años, con tres procesos de suma importancia: i) el asentamiento humano, en viviendas construidas con lodo y material vegetal, bastante favorable para la colonización de los triatominos, insectos que transmiten la ECh, siendo el caso actual de *Triatoma infestans*; ii) el inicio de la agricultura, proceso que requirió el almacenamiento de granos, convirtiéndose en un foco de atención para roedores y por ende, para insectos hematófagos (Aráujo et al., 2009), iii) causando establecimiento de antropozoonosis, que se intensifica con el inicio de la domesticación, dando paso al contacto cercano, incluso intradomiciliario, con algunos mamíferos como el cuy (*Cavia sp.*) (Aufderheide et al., 2004).

A partir del siglo 16, se dio un drástico cambio en la relación humano-ambiente, gracias al desarrollo y subsiguientes avances en agricultura, ganadería, así como la apertura

de rutas de transporte marítimo, terrestre (automotriz y por ferrocarril), procesos que provocaron un incremento en la presión antropogénica en diversos ambientes naturales, contribuyendo al establecimiento de focos zoonóticos que facilitaron el transporte de vectores, provocando el esparcimiento de la infección dentro y fuera de las Américas (Coura y Viñas, 2010).

Durante el siglo 20 se da inicio al cuarto periodo, con el primer estudio de la ECh, realizado por Carlos Chagas, quien en 1909, describió científicamente al primer triatomino y el ciclo de transmisión de la enfermedad (vector, hospedero y patógeno), así como las manifestaciones clínicas agudas del primer caso humano (Schofield y Días, 1999; Jurberg y Galvão, 2006; Rassi y Marin-Neto, 2010; Coura, 2013). En su admirable trabajo, señala con gran visión que el controlar la transmisión de la enfermedad sería el objetivo más deseable, así como la mejor estrategia en la lucha contra la enfermedad que ahora lleva su nombre, planteando que el control de la ECh representa “un deber del estado” (Schofield y Días, 1999). Durante este siglo se da un cambio por demás importante: el establecimiento de rutas de tráfico aéreo, permitiendo el movimiento de enormes cantidades de personas a gran velocidad alrededor del mundo (WHO, 2010), factor que posteriormente se retomará debido a su gran relevancia.

A inicios del siglo 21, nos encontramos en el quinto periodo, caracterizado por retos planteados en los periodos anteriores, y grandes avances sobre todo en cuanto al planteamiento de estrategias de control, como se menciona a continuación.

3.2. EPIDEMIOLOGÍA ACTUAL DE LA ECh

Con el panorama histórico mencionado anteriormente, se plantea que en la actualidad el perfil epidemiológico global de la ECh es el resultado de dos grandes fuerzas: i) transmisión vectorial doméstica en poblaciones latinoamericanas expuestas a lo largo de toda su vida y ii) migración a gran escala del ámbito rural al urbano durante los últimos 50 años (Bern, 2015).

Tomando en cuenta los casos con mal diagnóstico y falta de reporte, se estima que a nivel mundial alrededor de 10 millones de personas viven con la enfermedad, siendo responsable de 10.600 muertes al año (Bern, 2015). La ECh está presente en 18 países del continente Americano, donde pese a los esfuerzos realizados para su erradicación, se mantiene como la enfermedad parasitaria más importante en el hemisferio occidental, presentando una cantidad de años (426 miles) de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD) (medida utilizada para cuantificar la pérdida de vida sana, ya sea por mortalidad prematura o por el tiempo vivido con una salud menguada), 7,5 veces superior a los que presenta la malaria (Hotez, Botazi, Franco-Paredes, Ault y Periago, 2008; Mathers, 2008; Bern, 2015).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente el mayor número de personas que viven con la ECh se encuentran en focos de pobreza, en tres de los países más ricos de América Latina (Argentina, Brasil y México) (Bern, 2015). Región donde según la Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi), 6 millones de personas portan la enfermedad, y es la causante de 7.000 muertes por año. En los últimos años, la ECh se ha “globalizado”, debido a la migración a gran escala, con miles de casos al sureste de Europa, Australia y Japón (Beaumier, et al., 2016). En Ecuador, alrededor de 6,2 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad y más de 230.000 están infectadas en la actualidad (PAHO, 2006; WHO, 2015).

Recientes estudios sugieren la presencia en Ecuador de aproximadamente 200.000 pacientes seropositivos y una incidencia de 36 casos/100.000 habitantes/año, cifras que se estima puedan ser mayores por falta de reporte de casos, como consecuencia de la falta de conocimiento por parte del personal médico en áreas con transmisión vectorial activa, combinada con falta de capacidad de diagnóstico en el resto del país (Aguilar, Abad-Franch, Racines y Paucar, 1999, Quinde Calderón, Ríos-Quituzaca, Solorzano y Dumonteil, 2016; Abad-Franch y Aguilar, 2003; Dumonteil et al., 2016).

3.3. *Trypanosoma cruzi*, AGENTE CAUSAL DE LA ECh

La ECh es causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), descubierto por el médico Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934) en 1909 (Galvão, 2006; Rassi et al., 2010; Coura, 2013).

Este parásito tiene la capacidad de infectar a más de 100 especies de mamíferos tanto domésticos como silvestres y puede ser transmitida por más de 150 especies de hemípteros de la subfamilia Triatominae (Reduviidae) (WHO, 2015).

Trypanosoma cruzi es una especie altamente heterogénea, dado que presenta diferencias biológicas (por ejemplo: en los patrones infectivos observados en ratones, resistencia a quimioterapia, entre otros), bioquímica y moleculares, así mismo, presenta una gran diversidad genética. *T. cruzi* se halla dividida en 6 grandes linajes, conocidos como unidades discretas de tipificación (DTU) (Araújo et al., 2009; Zingales et al., 2009), además, se entiende que cada una de estas DTU presenta diferentes características biológicas, epidemiológicas y filogeográficas, diferencias no del todo esclarecidas. En el Ecuador se conoce de la presencia de la DTU I (Costales et al., 2015).

El complejo ciclo de vida de *T. cruzi* involucra a vertebrados (humanos y otros mamíferos) hospederos e invertebrados (el vector triatomino), y puede ser clasificado en tres fases morfológicamente distintas: dos fases replicativas: los epimastigotes flagelados, que se encuentran en el triatomino, y el amastigote redondo, que crecen y se reproducen dentro de las células de mamíferos hospederos, ambas formas replicativas pueden originar a la forma no replicativa pero infectiva, el tripomastigote flagelado (Figura 1). Este último es transmitido por el vector y es responsable de invadir las células de los mamíferos donde perpetúa la infección (Coura, 2013; Moraes y Franco, 2016; CDC, 2017).

Las formas de transmisión de *T. cruzi* se dan por: i) contacto con las heces contaminadas de triatominos de forma vectorial (principal mecanismo de transmisión), ii)

ingesta de alimentos contaminados con heces del triatomino conteniendo las formas metacíclicas del parásito iii) transmisión congénita, en países endémicos como Bolivia, Chile y Paraguay, al menos 5% de las pacientes embarazadas en fase crónica transmiten la enfermedad a su progenie, mientras que en el resto de países endémicos alrededor del 1 al 2% o menos de ellas, lo hacen (Rassi, et al., 2010), iv) transfusión de sangre, Según Rassi et al. (2010) las probabilidades de adquirir ECh de un donante infectado son del 10 al 20%, principalmente por transfusión de plaquetas; v) trasplante de órganos, vi) accidentes de laboratorio y/o por vii) el manejo inadecuado de cadáveres de animales infectados (Jurberg y Galvão, 2006; Bern, 2015; Nieto-Sánchez, Baus, Guerrero y Grijalva, 2015).

3.4. SINTOMATOLOGÍA DE LA ECh

El periodo de incubación de la ECh después de la transmisión vectorial es de 1 a 2 semanas, dando paso a la fase aguda de la enfermedad, que dura aproximadamente dos meses durante la cual es detectable la parasitemia microscópicamente (WHO, 2015). Los síntomas son usualmente leves, y poco específicos que pueden incluir fiebre, malestar, tos, sarpullido, diarrea, hepatoesplenomegalia, y atípicamente linfocitosis (Bern, 2015; WHO, 2015). En raros casos, un nódulo en la piel (chagoma) o edema palpebral (signo de Romana) pueden indicar el lugar de inoculación (CDC, 2016). En la mayoría de los casos la fase aguda pasa desapercibida, en menos del 1% de las infecciones, esta fase puede dar lugar a una fuerte inflamación del músculo cardíaco o del cerebro, y de la capa que lo recubre (miocarditis y meningoencefalitis respectivamente) (Bern, Martin y Gilman, 2011; CDC, 2016). Esta fase termina cuando se da un balance en el sistema inmune del hospedero, provocando una reducción drástica del número de tripomastigotes circulantes, haciendo casi imposible la detección directa de la enfermedad (Barrett et al., 2003). De ser tratada adecuadamente la fase aguda, se podría prevenir el desarrollo de la fase crónica (Moraes y Franco, 2016).

La fase crónica por lo general no presenta síntomas, pero los pacientes están infectados de por vida (Moraes y Franco, 2016) con parásitos alojados en tejidos específicos, especialmente en el músculo cardíaco, y digestivo (Carabarin-Lima et al., 2013; WHO, 2015; Moraes y Franco, 2016) siendo detectables únicamente mediante una

electrocardiografía (Barrett et al., 2003). Durante ésta fase, son observables diferentes formas clínicas: i) forma indeterminada o asintomática, siendo ésta la más frecuente, es típicamente hallada inmediatamente después de la fase aguda y dura toda la vida en un 70-85% de los pacientes (Barrett et al., 2003); ii) la forma cardíaca ocurre en alrededor del 30% de los pacientes, presentando desordenes cardíacos tales como arritmia, desordenes del músculo cardíaco, falla cardíaca, embolismo secundario, entre otros; iii) forma digestiva, con lesiones localizadas y alargamiento del esófago y colon, y iv) una forma combinada (cardíaca y digestiva), que afecta aproximadamente al 10% de los pacientes (WHO, 2015).

La enfermedad puede ser más severa en menores de 5 años, adultos mayores, personas con supresión inmune o infectados con un alta parasitemia, tal como ocurre durante la transmisión oral y en personas con VIH/SIDA, sin embargo, la manifestación más frecuente en éstos grupos es meningoencefalitis (WHO, 2015).

3.5. TRATAMIENTO

No existe vacuna disponible, y solo existen dos medicamentos registrados para tratar la ECh, uno derivado de nitrofurantoina, nifurtimox (Lampit, Bayer) y 2-nitroimidazol benzimidazol (Radanil, Roche), esa última especialmente efectiva en recién nacidos, así como en la fase aguda de la enfermedad (Díaz et al., 2015).

Cabe mencionar que estos medicamentos presentan graves limitaciones, como por ejemplo: largos periodos de tratamiento, y efectos secundarios adversos. Además, presentan una limitada eficacia, misma que depende de factores como: la fase de infección, edad del paciente, así como el área endémica involucrada, debido a susceptibilidad diferenciada según la variación genética del parásito (WHO, 2012; Díaz et al., 2015).

3.6. TRIATOMINAE, INSECTOS QUE TRANSMITEN LA ECh

Los parásitos transmitidos por insectos hematófagos son responsables de aproximadamente el 16% de la carga mundial por enfermedades transmisibles (Daumerie y Lorenzo, 2010), y su dispersión es altamente dependiente del comportamiento de sus vectores artrópodos (Marlière et al., 2015).

Los triatominos o chinches pertenecen a la subfamilia Triatominae, familia Reduviidae del orden Hemiptera, clase Insecta. Actualmente ésta subfamilia comprende 152 especies distribuidas dentro de 5 tribus y 15 géneros (Otálora-Luna, Pérez-Sánchez, Sandoval, Aldana, 2015; Santillán-Guayasamín, Villacís, Grijalva, Dujardin, 2017). Todas estas especies son capaces de transmitir *T. cruzi*, pero pocas son consideradas de importancia epidemiológica (Schofield y Galvão, 2009).

Presentan metamorfosis hemimetábola, lo que quiere decir que cumplen con tres fases primordiales: huevo, ninfa y adulto, a su vez, dentro de la fase ninfal se presentan 5 estadios ninfales (NI, NII, NIII, NIV y NV), todos parecidos a los adultos con excepción de las alas y órganos reproductores, los mismos que aparecen durante la última muda. Son insectos con una vida larga, con generaciones bianuales (6-8 meses) o anuales (8 meses a >1 año), dependiendo de la especie (Villacís, Arcos-Terán y Grijalva, 2008; Villacís, 2011).

Los triatominos son estrictamente hematófagos a lo largo de todo su ciclo de vida (Rabinovich et al., 2011), necesitan de la sangre de vertebrados para alimentarse, desarrollarse y reproducirse, condición que los hace susceptibles a infección con *T. cruzi* (Villacís, 2011; Mosquera, Villacís y Grijalva, 2016). Para cumplir con dicha necesidad, presentan un aparato picador/succionador llamado probóscide, que sale de la parte frontal de la cabeza (Borror, Triplehorns, y Johnson. 1989; Villacís, 2011).

En referencia a las especies de importancia epidemiológica, en 1999 la Organización Panamericana de la Salud (OPS) declaró a *Triatoma infestans* como el principal vector de la ECh en Latinoamérica (Bonney, 2014), especie presente en los seis países dentro de la Iniciativa del Cono Sur (Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) así como en el sur de Perú (país que se unió a la iniciativa posteriormente), y al norte de Chile (Schofield y Dias, 1999; Miles, Feliciangeli y Arias, 2003; Lardeux, Depickére, Duchon y Chavez, 2010). Siendo inicialmente selvático, *T. infestans* ha expandido su distribución, y en la actualidad se lo encuentra también en los hábitats domiciliar y peridomiciliar (Miles et al., 2003).

Rhodnius prolixus, le sigue en importancia epidemiológica a *T. infestans*, dado que es el principal vector de la ECh en Mesoamérica (El Salvador, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Honduras y México) y los llanos de Venezuela y Colombia (Hashimoto y Schofield, 2012).

3.6.1. TRIATOMINOS EN EL ECUADOR Y SUS HÁBITATS

En el Ecuador se han registrado 16 especies de triatominos, de las cuales 13 son potenciales vectores de la ECh (Suarez-Davalos, Dangles, Villacís y Grijalva 2010; Santillan-Guayasamín et al., 2017).

Son primordialmente nocturnos, y viven en asociación con huéspedes vertebrados algunos de los cuales son reservorios del parásito de la ECh en tres tipos de hábitats, i) silvestre, como palmeras por ejemplo *Rhodnius ecuadoriensis* con *Phytelephas aequatorialis* en la costa ecuatoriana (Villacís, 2011), nidos de aves, madrigueras de roedores, ii) doméstico, grietas de paredes y/o techos, por ejemplo *Panstrongylus chinai*, *P. rufotuberculatus* y *Triatoma carrioni* (Grijalva et al., 2015) en la provincia de Loja al sur del Ecuador. iii) peridoméstico, tales como nidos de gallinas siendo la preferencia de *Triatoma carrioni*, *Panstrongylus chinai*, *P. rufotuberculatus* en la provincia de Loja (Grijalva et al., 2015), y acumulaciones de material, como ladrillo por ejemplo *P. howardi*

llegando a ocupar una gran variedad de ecotopos y alimentándose de diferentes tipos de huéspedes (; Otálora-Luna et al., 2015, Villacís et al, 2015).

Especies como *Rhodnius robustus*, *R. pictipes*, *Panstrongylus geniculatus* y *Eratyrus mucronatus* se encuentran en su mayoría en el hábitat silvestre asociadas a palmeras como *Phytelephas tenuicaulis*, y *Astrocaryum sp.* de la región Amazónica (Abad-Franch et al., 2001).

En la provincia de Manabí (sitio de estudio) se reportan varias especies de triatomos, entre los cuales tenemos a: *R. ecuadoriensis*, considerada como principal vector de la ECh, *P. howardi*, *P. rufotuberculatus* y *P. geniculatus* (Villacís, et al., 2015; Sánchez, 2016). Históricamente se ha reportado a *Triatoma dimidiata* (Abad-Franch et al., 2001), sin embargo, estudios recientes no han encontrado ningún individuo de esta especie, pese al esfuerzo de búsqueda (Villacís comunicación personal).

3.6.2. EL GÉNERO *Panstrongylus*

El género *Panstrongylus* (Berg, 1879) está agrupado con *Triatoma* y otros siete géneros dentro de la Tribu Triatomini (Patterson et al., 2009). Después de *Triatoma* y *Rhodnius*, éste género abarca el mayor número de especies de la subfamilia Triatominae, con 13 especies y una amplia distribución geográfica en el Neotrópico, que va desde México hasta Argentina (Patterson et al., 2009). La importancia epidemiológica del género *Panstrongylus* ha incrementado en los últimos años debido a que varias especies que se restringían al hábitat silvestre, han sido documentadas invadiendo ambientes domésticos y peridomésticos (Santos, Jurberg, Galvão, Rocha, Fernandez 2003; Patterson et al., 2009; Villacís et al., 2015). En el Ecuador, se conocen 6 especies de este género: *P. chinai*, *P. geniculatus*, *P. howardi*, *P. lignarius/ P. herreri* y *P. rufotuberculatus* (Villacís et al., 2015).

3.6.3. *Panstrongylus howardi*

Panstrongylus howardi es una especie endémica del Ecuador (Abad-Franch, et al., 2001). Villacís et al. (2015) reportó un alto índice de infestación de *P. howardi* en el hábitat peridoméstico (In=6,6%) en varias comunidades del cantón Portoviejo, (Manabí), principalmente en nidos de roedores y marsupiales ubicados entre acumulación de ladrillos (Villacís et al., 2015), verificando además la circulación de poblaciones de *T. cruzi* (57,5%) y *T. rangeli* (8,6%, incluye infección mixta) en este insecto. Estos datos sugieren el alto potencial que tiene esta especie para invadir el domicilio, incrementando el riesgo de que el insecto entre en contacto con el ser humano, se alimente de él, y se dé la consecuente transmisión de la ECh (Villacís et al., 2015).

3.7. CAPACIDAD VECTORIAL

Varias características son consideradas al momento de valorar la capacidad de una especie de triatomino como potencial vector de esta enfermedad. Dentro de las cuales, son de suma importancia las siguientes:

i). Tener en cuenta factores referentes a la relación vector-parásito, determinantes para la transmisión vectorial de *T. cruzi*. Dentro de estos, cabe mencionar la susceptibilidad del triatomino a ser infectado por el parásito, seguido por la eficacia de transmisión del mismo al momento de la alimentación, es decir, la capacidad de defecar mientras se alimenta (Patterson, Barbosa y Feliciangeli, 2009).

ii). Conocer la distribución geográfica y ecológica, que desde un punto de vista macroecológico, éste se entiende como el resultado de una serie de interacciones entre las características fisiológicas y ecológicas propias del insecto, su habilidad de dispersión, la capacidad de adaptarse a diferentes hábitats y huéspedes, frecuencia de invasión a ambientes domésticos, y su habilidad para establecer colonias domésticas y peridomésticas (de la Vega, Medone, Ceccarelli, Rabinovich y Schilman, 2015).

3.8. MODELAMIENTO DE NICHOS ECOLÓGICOS

Es importante tomar en cuenta que ecológicamente el concepto de nicho ecológico presenta una variedad de significados basados o relacionados con el comportamiento de una especie bajo condiciones ambientales específicas (Khatibi, y Sheikholeslami, 2016). Dos conceptos importantes son los propuestos por Hutchinson (1957), sobre nicho fundamental y nicho real, definiendo al primero como el conjunto de ambientes donde una especie persiste, en ausencia de interacciones con otras especies, siendo así, ambientes donde una especie tiene un crecimiento poblacional positivo, mientras que fuera de éstos, presentaría un decrecimiento cercano a la extinción local (Khatibi, y Sheikholeslami, 2016; Godsoe, Jankowski, Holt y Gravel, 2017). El nicho real hace referencia a ambientes que permiten la persistencia de una especie tomando en cuenta interacciones bióticas. Para algunos autores, el nicho real, incluye ambientes donde una especie está presente, tras considerar la migración y limitaciones en su dispersión (Godsoe, Jankowski, Holt y Gravel, 2017).

En la actualidad existe debate sobre el nombre correcto para nombrar la actividad de modelar áreas de distribución. Utilizándose en especial tres términos: i) Modelamiento de nicho ecológico (EMN por sus siglas en inglés), concepto que relaciona un conjunto de variables ecológicas a la aptitud de una especie; ii) Modelamiento de Idoneidad de Hábitat (HSMs por sus siglas en inglés) que relaciona las variables ecológicas a la probabilidad de ocurrencia de una especie, siendo así las áreas potenciales (GI: área invadible o A: el nicho fundamental), (Khatibi, y Sheikholeslami, 2016) y por último el iii) Modelamiento de Distribución de Especie (SDM), que combina datos de observación o abundancia de una especie con estimaciones ambientales, modelándose así, el área ocupada por una especie o G0 (Elith y Leathwick, 2009).

Dejando de lado problemas semánticos, al momento de realizar un estudio de nicho o área se debe tener en cuenta tres factores: i) La existencia de al menos dos clases de nichos: el fundamental, y el real, ii) existen al menos tres áreas de interés: (la ocupada, la potencial y la invadible) y iii) modelar nicho (subconjuntos de E: espacio abstracto,

compuesto por las variables que representan condiciones ambientales que una especie tolera) que no es lo mismo que modelar área (subconjuntos de G: área geográfica con extensión y resolución), lo que nos lleva al diagrama de BAM, que es una representación abstracta del espacio G mismo que ilustra los dominios que determinan el nicho ecológico de una especie. Siendo:

B: hace referencia al nicho real

A: hace referencia al nicho fundamental

M: área accesible para la especie

Los ENM estiman la distribución potencial correlacionando información de ocurrencia con predictores ambientales (Lobo, Jiménez-Valverde y Hortal, 2010). Esta aproximación se basa en la teoría de nicho ecológico (Hutchinson, 1972), dado que modelan una porción del “nicho fundamental” de las especies (Pearson y Dawson, 2003). Cabe recalcar, que la mayoría de los modelos de nicho predicen la distribución de las especies asumiendo que las comunidades donde están insertadas son gleasonianas, respondiendo de forma individual al ambiente como se ha mencionado anteriormente (Wiens, Stralberg, Jongsomjit, Howell y Snyder, 2009).

En conclusión, las ENM’s permiten caracterizar las necesidades ecológicas de una especie, prediciendo además la potencial invasión de otras áreas, así como cambios de distribución en respuesta al cambio climático (de la Vega et al., 2015), factores de gran importancia para caracterizar y comprender la compleja dinámica de distintas enfermedades donde intervienen varios agentes, como es el caso de la ECh.

3.9. CONTROL VECTORIAL EN EL ECUADOR

El control de la ECh en el país formalmente empezó en el 2003-2004, en el que se priorizaron tres regiones según la seroprevalencia de la enfermedad en cada una de ellas, siendo: Costa (1,99%), Amazonia (1,75%) y la Sierra sur del Ecuador con (0,65%), cubriendo en total, 11 provincias del Ecuador (Dumonteil et al., 2016) en las cuales aún se

reporta infestación domiciliar con vectores de la ECh (Dumonteil et al., 2016). Es necesario recalcar que en la provincia de Manabí no se observó disminuir la infestación domiciliar como consecuencia del esporádico control con insecticidas en la zona, abarcando además muy pocos domicilios (Costales et al., 2015).

Cabe mencionar que gracias a los esfuerzos gubernamentales realizados para el control de la ECh, se ha logrado reducir el nivel de infestación en la región costa del Ecuador, pero se recalca la necesidad de que dicho control se realice de forma sistemática y constante para evitar re-infestación, y así poder obtener resultados a largo plazo (Dumonteil et al., 2016). Teniendo en cuenta que las especies susceptibles al control, mediante campañas de rociamiento, son aquellas que se encuentran ya domiciliadas, tal como *Triatoma dimidiata*, mientras que para aquellas especies con hábitats silvestres y con una demostrada tendencia a invadir el ambiente domiciliar, tal como *Rhodnius ecuadoriensis* o *Panstrongylus howardi*, se hace necesaria la implementación de estrategias alternativas de vigilancia, prevención y control (Dumonteil et al., 2016).

Dado que la ECh es considerada una enfermedad olvidada, y al no existir una vacuna, ni tratamiento efectivo (Díaz et al., 2015), la principal estrategia para controlar esta enfermedad se basa en la prevención de la transmisión vectorial y/o control de la presencia de vectores mediante insecticidas.

Las preferencias ecológicas de *P. howardi*, el alto índice de infestación (6,6% en el peridomicilio), y de infección con *T. cruzi* (53,2%) (Villacís, et al., 2015), así como de su alta capacidad adaptativa [hábitats silvestre (Suarez-Davalos, et al., 2010), peridomiciliar y domiciliar (Villacís, et al., 2015)] se plantea la necesidad de determinar su importancia como vector de la ECh en la costa central del Ecuador. Por estas razones, es fundamental el estudio de la biología de esta especie haciendo hincapié en el ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación, así como el nicho ecológico. Motivo por el cual se plantearon los siguientes objetivos:

3.10. OBJETIVO GENERAL

Determinar el ciclo de vida, patrones de alimentación y defecación de *Panstrongylus howardi*, bajo condiciones de laboratorio, y su distribución potencial mediante modelamiento de nicho ecológico, con el propósito de establecer su importancia como vector de la enfermedad de Chagas en la provincia de Manabí.

3.10.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CICLO DE VIDA:

- Establecer el tiempo que requiere *P. howardi* para completar su desarrollo desde huevo hasta adulto bajo condiciones de laboratorio, utilizando tablas de vida.
- Determinar el porcentaje de mortalidad durante el ciclo de vida de *P. howardi*, bajo condiciones de laboratorio, utilizando tablas de vida.

PATRONES DE ALIMENTACIÓN Y DEFECACIÓN:

- Establecer el tiempo de alimentación de *P. howardi* en cada uno de sus estadios mediante el seguimiento y cronometraje de cada ofrecimiento de alimento.
- Conocer la cantidad de sangre ingerida por *P. howardi* en cada estadio, así como durante todo su ciclo de vida (peso en mg. antes y después de la alimentación).
- Estimar la eficacia vectorial de *P. howardi* en cada estadio ninfal, mediante el seguimiento y cronometraje de las deyecciones durante el ofrecimiento de alimento.

NICHO ECOLÓGICO:

- Determinar la potencial distribución de *Panstrongylus howardi* en el Ecuador, utilizando datos de presencia y variables ecológicas mediante programas de modelamiento de nicho ecológico.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. SITIO DE ESTUDIO

La provincia de Manabí se encuentra localizada al noroccidente costero del Ecuador, ocupando un territorio de 18.400 Km² dividida en 22 cantones y un total de 75 parroquias (Twyman, 2010).

El clima de la región depende de las corrientes marinas (Humboldt y El Niño) y de su inversión. Entre los meses de mayo a octubre, la corriente meridional fría de Humboldt afecta las aguas del océano ocasionando la presencia de altos niveles de humedad, pero poca precipitación. Entre los meses de diciembre a abril, la corriente de El Niño ocasiona la llegada de masas de aire cálidas y húmedas engendrando un fuerte aumento pluviométrico (Martínez, Graber y Harris, 2006).

La costa centro sur de la provincia de Manabí presenta un clima tropical megatérmico seco con una temperatura promedio entre 26, 7°C a 28 °C (MAGAP, 2016), y un régimen pluvial anual que oscila entre 500 y 1000 mm anuales. Presenta gran variabilidad de ecosistemas o hábitats asociados a micro-climas y comunidades bióticas específicas debido a la variabilidad de relieves de la cordillera abarcando rangos de 0 a 80 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Martínez et al., 2006).

Históricamente Manabí ha sido un punto importante para la producción de muchos de los productos de agro-exportación del Ecuador, incluyendo cacao (*Theobroma cacao*), caucho (*Ficus sp.*) tagua (*Phitelephas aecuatorialis*) y café (*Coffea spp.*) (Ferrin, 1988; Twyman, 2010).

4.2. OBTENCIÓN DE PARENTALES *Panstrongylus howardi*

Los parentales de los individuos de *Panstrongylus howardi* que se utilizaron en éste estudio fueron colectados en los años 2004, 2007 y 2008, en 8 comunidades rurales de la provincia de Manabí: El Bejuco, Pimpiguasí, San Gabriel, La Encantada, Maconta Abajo, Jesús María, La Ciénega y Quebrada de Maconta (Figura 2). Estos individuos fueron colectados en hábitats domésticos y peridomésticos (Villacís et al., 2015), bajo el permiso de investigación 02-17IC-FAU-DNBAPVS/MA y 010-IC-FAU-DNBAPVS/MA. Posterior a esto, fueron trasladados a las instalaciones del Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en Quito, donde se los mantuvo en una incubadora bajo condiciones controladas de $28\pm 6^{\circ}\text{C}$, $80\pm 10\%$ de humedad relativa y fotoperiodos de 12 horas, condiciones que asemejan a su ambiente natural.

4.3. SELECCIÓN DE NINFAS DE ESTADIO V (NV) PARA OBTENER PAREJAS

Con el propósito de obtener parejas de *Panstrongylus howardi*, se seleccionaron ninfas de quinto estadio (NV) que fueron colocadas en recipientes plásticos con un papel Whatman doblado en forma de abanico y cortado las puntas para que el individuo pueda caminar y alimentarse con facilidad. Una vez que mudaron a adultos, se prosiguió a formar parejas para la obtención de huevos con los que se empezó éste estudio. Una vez obtenidos los huevos, los mismos fueron separados en frascos independientes de los parentales, a la espera de su eclosión (Villacís et al., 2008; Mosquera et al., 2016; Padilla, 2016).

Al eclosionar, las ninfas I (NI), fueron colocadas individualmente en recipientes plásticos con un papel Whatman colocado de la forma ya mencionada, para que los individuos se movilizan y puedan alimentarse con facilidad. Además se colocó en cada frasco al menos un individuo adulto muerto para que obtengan bacterias simbiotes necesarias para su desarrollo y metabolismo, y se les asignó un código para facilitar el seguimiento (Sassera, Epis, Pajoro, Bandi, 2013; Otálora-Luna et al., 2015).

4.4. ALIMENTACIÓN DE *Panstrongylus howardi*

Para la alimentación de los individuos tanto para el ciclo de vida, como para los patrones de alimentación y defecación, se utilizaron ratones (*Mus musculus*), cuyo certificado de manejo de animales fue mediante el protocolo 15-H-034 aprobado por Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de la Universidad de Ohio.

4.5. CICLO DE VIDA

Cada individuo fue revisado a diario con el propósito de tener mayor precisión sobre el ciclo de vida. Para ser observados con mayor facilidad eran colocados fuera de su frasco en tinas plásticas. Se contabilizaron el número de días necesarios para mudar de un estadio a otro, hasta completar el ciclo de vida. Además, se analizaron variables tales como: i) supervivencia y mortalidad en cada estadio ninfal, por sexo, y total, que es el número o porcentaje de individuos de cada estadio que sobrevivió/murió y ii) promedio de duración en días de cada estadio ninfal, lo que significa el cálculo promedio de días que los individuos que *P. howardi* necesitan para completar con cada uno de sus estadios ninfales.

4.6. HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN Y DEFECACIÓN

Para este proceso se sacó de su respectivo frasco a cada individuo y se lo colocó sobre el ratón inmovilizado con una red plástica dentro de una tina, el ofrecimiento de alimento se realizó durante 15 minutos, de darse el caso en el que el triatomino no ingresara la probóscide durante este plazo de tiempo, fue retirado y devuelto a su frasco. El ofrecimiento de alimento se realizó individualmente, es decir, un solo individuo por ratón, tanto durante el ofrecimiento como la alimentación.

Para esta parte del estudio se registró la siguiente información, basada en Villacís et al., (2008), Mosquera, et al., (2016) y Padilla, (2016): i) el tiempo de picada en minutos

(min), ii) el tiempo de alimentación (min), iii) el tiempo de la primera defecación (min), siendo el momento en que los individuos defecan durante la alimentación y las subsiguientes por un periodo de 15 (min), iv) la cantidad de sangre ingerida en miligramos (mg), se obtiene mediante la diferencia entre el peso inicial y final de cada individuo, para esto se registró el peso antes y después de la ingesta del alimento.

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

Para analizar los datos del ciclo de vida de *Panstrongylus howardi* se utilizaron tablas de vida utilizando Excel (Office 2010), las mismas que recopilaron una serie de mediciones secuenciales que revelaron los cambios a través del ciclo de vida de esta especie (Harcourt, 1969).

Estos datos fueron analizados con el programa SPSS Statistics v23, 0, en el que se realizaron las siguientes pruebas: i) Kolmogorov Smirnov (muestras con n mayores a 45), ya que nuestro caso se utilizó un $n=65$, ésta prueba permite determinar si los datos presentan distribución normal, ii) Levene, que permite determinar la homogeneidad de varianza, estableciendo si éstas son significativamente diferentes. iii) Coeficiente de varianza (CV), índice medidor del porcentaje de error con respecto a la media. Dado que nuestros datos fueron tomados bajo condiciones de laboratorio, los valores de CV deberán ser menores al 20% (Sánchez, 2012). De cumplir con homogeneidad de varianza, así como presentar normalidad se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) mismo que permite determinar si existen diferencias significativas entre estadios ninfales o por el contrario, puede suponerse que sus medias poblacionales no difieren. De darse el caso de obtenerse varianzas heterogéneas o falta de normalidad, o un CV muy alto, no se procedió a aplicar ANOVA.

En el caso de que los valores CV fueran mayores al 20%, se realizó una transformación logarítmica de los datos, lo que significa llevarlos de multiplicativos a aditivos, obteniendo así valores de CV menores. Posteriormente se procedió a aplicar el

ANOVA, junto con Post-hoc (prueba de Tukey) misma que permite determinar cuáles son los estadios diferentes, al comparar sus medias (Sánchez, 2011).

De no cumplirse con los requerimientos necesarios para realizar el ANOVA, se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que permite conocer si existen diferencias significativas entre estadios ninfales, sin suponer normalidad y homogeneidad de varianzas. Al utilizar esta prueba se utiliza a la mediana como medida de tendencia central y al rango intercuartílico como la medida de dispersión.

Finalmente a todos los resultados, se les calculó un intervalo de confianza al 95%, que permite estimar los valores desconocidos con una determinada probabilidad de acierto; dado que en experimentos donde se somete a animales a un determinado tratamiento (en este caso alimentación y observación semanal), el efecto se estima mediante la media de la muestra, pero debido a que las muestras aplicadas durante toda la fase experimental, muestran una serie de medias diferentes, la solución fue calcular el límite de confianza (CI), que nos permite tener un 95% de certidumbre de que el valor de la media está dentro de éste intervalo (Sánchez, 2011).

4.7.1. CICLO DE VIDA Y MORTALIDAD DE *Panstrongylus howardi*

Para establecer el total de días que requiere *P. howardi* para completar su ciclo de vida así como por estadio, se calculó la mediana estadística del total de días que requiere, así mismo se realizó una comparación entre estadios para determinar cuál de estos requirió el mayor y el menor número de días según corresponda.

Se calculó la mortalidad absoluta por estadio ninfal a partir de NI, tomando el número de individuos muertos por estadio, dividido para el total de individuos que ingresaron al mismo estadio ninfal (vivos y muertos) y se multiplicó por 100, obteniéndose así los porcentajes de mortalidad por cada estadio ninfal.

Se realizó un análisis de supervivencia utilizando el método no paramétrico de Kaplan-Meier para cada estadio ninfal. Las curvas Kaplan-Meier se definen como la probabilidad de supervivencia en un periodo de tiempo determinado, considerando varios intervalos de tiempo (Bland y Altman, 1998).

Para comprobar si existen diferencias significativas en las curvas de supervivencia obtenidas, utilizaremos la prueba de Log-rank la que sirvió para probar si la diferencia entre los tiempos de supervivencia entre los grupos (estadios) son estadísticamente diferentes o no (Bland y Altman, 1998).

Para todos los análisis antes mencionados se utilizó un p : 0,005 para determinar la significancia estadística.

4.7.2. HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN Y DEFECACIÓN

Dentro de estos parámetros se calculó: i) el tiempo que necesitó cada individuo para alimentarse, ii) la cantidad de sangre ingerida en cada ofrecimiento, iii) número de defecaciones durante la alimentación y 15 minutos (min) posteriores a ésta.

a) TIEMPO DE ALIMENTACIÓN

Para éste parámetro se calculó el tiempo (min) que le llevó alimentarse, desde el ingreso de la probóscide hasta la salida de la misma de la vena del hospedero. Para esto se cronometró el tiempo de ingreso de la probóscide en el ratón, hasta cuando la retira del mismo.

b) CANTIDAD DE SANGRE INGERIDA

Se pesó al triatomino con una balanza electrónica (Mettler Toledo, AB54-S, Switzerland), antes de la oferta de alimento y después de la misma. El valor se calculó en miligramos (mg) restando del peso final del inicial:

$$m \text{ final (mg)} - m \text{ inicial (mg)} = \text{sangre ingerida (mg)}$$

Siendo:

m final: peso final del individuo al finalizar la alimentación.

m inicial: el peso inicial del individuo antes del ofrecimiento de alimento.

Además se calculó, el peso ganado (mg.) por estadio ninfal, tomando el peso final por alimentación dividido sobre el peso inicial.

c) DEFECACIÓN DURANTE LA ALIMENTACIÓN Y 15 (MIN) DESPUÉS

Estos datos fueron tomados en minutos, utilizando un cronómetro simple y se estableció una frecuencia promedio por estadio ninfal, permitiéndonos establecer la eficacia vectorial de la especie en cuestión.

4.8. ANÁLISIS DE NICHOS ECOLÓGICO

Para determinar la distribución de *P. howardi* en el Ecuador bajo condiciones ambientales actuales se utilizaron 8 datos de presencia de esta especie en las comunidades de la provincia de Manabí mencionadas con anterioridad, los mismos que fueron colectados en años previos por el CISEAL, así como por el Servicio Nacional de Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores Artrópodos (SNEM). Una vez referenciadas a coordenadas geográficas con formato WG584 se correlacionaron con imágenes tipo raster representando 19 variables climáticas que caracterizan el clima entre los años 1950-2000 y una variable adicional, que es la altura, todas con una resolución de 1 Km²; disponibles en línea en la página web: www.worldclim.org/bioclim (Anexo 6).

Estos datos fueron procesados en los siguientes programas:

i) Qgis v2.18.1, multiplataforma que permite visualizar, editar y analizar datos geográficos, en este caso generar mapas de presencia de *P. howardi* en el Ecuador.

ii) MaxEnt v3.3.3, este programa utiliza un algoritmo que estima la distribución más uniforme (“de máxima entropía”) de una especie, en un espacio geográfico dado, a partir de la relación observada entre las localidades de presencia y las características ambientales (Pawar et al., 2007). Se utilizaron los parámetros por defecto de Maxent, pero se especificó un máximo de 5 y 8 iteraciones con formato logístico y crudo para cada uno. El formato logístico expresa la estimación de probabilidad de presencia en un rango entre 0 y 1, (siendo 1 la mayor probabilidad) mientras que el formato crudo lo expresa de forma exponencial (Phillips, 2005). Dentro de los parámetros por defecto utilizados es necesario mencionar a Jackknife, mismo que analiza la contribución de cada variable a las características finales del modelo (Peterson y Cohoon, 1999).

5. RESULTADOS

5.1. CICLO DE VIDA DE *Panstrongylus howardi* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

La respuesta al primer objetivo específico del ciclo de vida, se puede observar en la tabla 1, que *Panstrongylus howardi* completó su ciclo de vida en un total de $186,9 \pm 12,2$ días, por lo que se considera una especie bianual (Figura 3).

El tiempo que requieren los huevos de *P. howardi* para eclosionar bajo condiciones controladas de laboratorio, es de $28,8 \pm 1,1$ días. Se evidenció que conforme los individuos se desarrollaban, mayor era el tiempo (días) que tardaban en mudar y pasar al siguiente estadio. El estadio que necesitó menos tiempo fue NII a NIII con 22 ± 6 días, y el que necesitó un mayor tiempo fue el estadio ninfal V (NV) para mudar a adulto con 42 ± 8 días.

Las pruebas estadísticas aplicadas para ciclo de vida fueron no paramétricas por observarse que no todos los datos presentaron normalidad ($p < 0,001$), para lo que se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, observándose diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre los estadios ninfales en cuanto al tiempo que les toma para pasar de un estadio a otro (Anexo 1).

5.2. MORTALIDAD DE *Panstrongylus howardi*

Para determinar la mortalidad durante el ciclo de vida de *P. howardi* bajo condiciones de laboratorio se determinó la mortalidad absoluta (Tabla 2). *Panstrongylus howardi* presentó mayor mortalidad durante los dos primeros estadios ninfales, el primer estadio ninfal (NI) presentó 32,3% (21 individuos) y el segundo estadio ninfal (NII) el 20% (13 individuos). A partir del siguiente estadio ninfal (NIII), se observó que disminuye

drásticamente este porcentaje de mortalidad, apreciándose solo un 1,5% (1 individuo) para los dos últimos estadios ninfales (NIV y NV) (Figura 4).

Mediante el análisis de supervivencia se observa la mayor supervivencia corresponde a NIV (96,6%) y NV (96,4%) (Tabla 3), mientras que la más baja se observa en NI (67,7%).

La prueba de Log-rank mostró que existen diferencias significativas en cuanto a la supervivencia entre los estadios ninfales ($p= 0,001$) (Anexo 2), en el análisis se incluyó a machos y hembras, pero cabe recalcar que se realizó el seguimiento de los mismos por dos meses, más no hasta su muerte. En el gráfico no se muestra esta información, dado que presentan 100% de supervivencia (Figura 5).

5.3. HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN Y DEFECACIÓN DE *Panstrongylus howardi* BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO

Para contestar el primero y segundo objetivos de los hábitos de alimentación y defecación se consideró: i) tiempo de ingreso de la probóscide para proceder a la ii) alimentación de la cual se analizó el tiempo promedio, y iii) la cantidad de alimento que ingiere durante la misma.

5.3.1. TIEMPO DE INGRESO DE LA PROBÓSCIDE (min)

Los cuatro primeros estadios ninfales (NI, NII, NIII y NIV) lo hicieron en un rango de tiempo de 3 a 5 minutos ($5,2\pm 6,2$; $5,2\pm 6$; $3,1\pm 4,2$ y $5,5\pm 7,9$ minutos, respectivamente) (Tabla 4), siendo NIII el que tomó menor tiempo ($3,1\pm 4,2$ min.) y el mayor tiempo corresponde a los machos con $10,6\pm 6,6$ minutos, mientras que las hembras tomaron un tiempo de $9,1\pm 4,8$ min. (Tabla 4).

Los análisis estadísticos demostraron que no existe normalidad en los datos ($p < 0,001$), al calcularse el CV se obtuvo valores demasiado altos (62,6%), por lo que se aplicó transformación logarítmica de datos, al mantenerse la no normalidad se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde se evidenció la existencia de diferencias significativas ($p = 0,032$) entre los estadios en cuanto al tiempo de ingreso de la probóscide en el hospedero (Anexo 3).

5.3.2. TIEMPO DE ALIMENTACIÓN (min)

El tiempo de alimentación, aumentó conforme los individuos se desarrollaban dentro de las etapas ninfales, disminuyendo ligeramente cuando los individuos llegaron a su etapa adulta. NI requirió el menor tiempo de alimentación en comparación al resto de estadios ninfales con un promedio de 18,2 minutos; mientras que NV requirió el tiempo más largo con 42,5 min. (Figura 6) (Tabla 5). Las hembras presentaron 38,8 min. y los machos 36,8 min.

Al evidenciarse falta de normalidad, y un CV de 45,52%, se realizó transformación de datos obteniéndose un CV de 13,82% y normalidad ($p = 0,2$), por lo que se procedió a realizar el ANOVA, donde se evidenció diferencias significativas entre los estadios ninfales ($p < 0,001$) en cuanto al tiempo de alimentación. Aplicándose la prueba de Tukey se obtuvieron tres grupos: el primer grupo corresponde a NI, NII, NIII, el segundo lo forman NII, NIII, machos, NIV y hembras; y el tercer grupo lo conforman los machos, NIV, NV junto con las hembras (Anexo 4).

5.3.3. CANTIDAD DE SANGRE INGERIDA (mg)

La cantidad de sangre que necesitaron los individuos de *Panstrongylus howardi* para mudar de un estadio a otro, varió dependiendo del estadio ninfal en el que se encontraba. Al igual que el tiempo de alimentación, la cantidad de sangre ingerida por los

individuos aumentó a lo largo de su desarrollo y disminuyó en su etapa adulta. NI ingirió un promedio de $5,9 \pm 3,1$ mg., siendo ésta la menor cantidad de alimento ingerido en comparación al resto de estadios ninfales, mientras que la ingesta en NV fue de $459,6 \pm 315,2$ mg. Finalmente, respecto a las hembras de *P. howardi* consumieron 365 ± 202 mg., mientras que los machos tomaron 159,4 mg. de sangre (Tabla 6).

Debido a que el conjunto de datos de la cantidad de sangre (mg) consumida no presentó normalidad, ni homogeneidad de varianzas, a pesar de realizarse transformación logarítmica de datos, se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde se evidenciaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre los estadios ninfales en cuanto a la cantidad de alimento ingerido.

Con respecto a las veces que multiplicaron su peso inicial durante la alimentación se observa que todos los estadios ninfales aumentaron en promedio 6,7 veces su peso. Las hembras aumentaron 5,07 su peso inicial, comparado con los machos que aumentaron apenas dos veces su peso (Tabla 8).

Las pruebas estadísticas utilizadas para ésta última variable fue de tipo no paramétrico, Kruskal-Wallis, dado que no presentó normalidad. Esta prueba mostró que el número de veces que aumentaron el peso inicial presenta diferencias significativas entre estadios $p = 0,005$.

5.4. HÁBITOS DE DEFECACIÓN DE *P. howardi*

Para contestar con el tercer objetivo de los hábitos de alimentación y defecación, se obtuvo para todos los estadios el tiempo de defecación. La mayoría de los eventos de defecación se observó mientras se alimentaban (Figura 8), principalmente en los dos últimos estadios ninfales (NIV= 43,3%, NV= 34,6%). Mientras que los primeros estadios ninfales presentaron un mayor porcentaje de deyección después de la alimentación, siendo

el caso de NII, 17,8% (8 individuos) y levemente en NIII, 21,9% (7 ind.). En referencia a las hembras, el 25% (3 ind.) de éstas defecaron durante la alimentación, y los machos lo hicieron el 7,1% (1 ind.) (Tabla 7 y 8).

Finalmente, se observó que el tiempo de defecación durante la alimentación fue aumentando a medida que los individuos se desarrollaban, obteniendo que el estadio ninfal NIII presentó el menor tiempo de defecación durante la alimentación (27,3 min), mientras que NV se demoró 40,3 minutos, presentando el mayor tiempo para defecar. Respecto a los adultos, las hembras presentan un tiempo promedio de defecación de 36,3 min., mientras que de machos se obtuvo un único dato de 33,1 minutos (Tabla 7).

Se utilizó estadística descriptiva para obtener las frecuencias de defecación por estadio, tanto durante la alimentación como 15 minutos posterior a ésta.

Al no hallarse homogeneidad de varianzas para el tiempo de defecación durante la alimentación ($p=0,046$), y presentar un CV muy alto (33,28%) se realizó transformación de datos; con los que se obtuvo normalidad ($p=0,200$), se redujo el CV (8,9%) y se evidenció homogeneidad de varianzas ($p=0,379$). Procediéndose a realizar el ANOVA, donde se evidenció la inexistencia de diferencias significativas entre los estadios ninfales ($p=0,111$).

5.5. NICHO ECOLÓGICO

Para ambas experimentaciones se obtuvo que las condiciones ambientales con mayor contribución para el modelo son: el rango altitudinal, la precipitación del trimestre más seco, estacionalidad de la temperatura, precipitación del trimestre más cálido y el rango de temperatura media (Anexo 7).

Se observa que las áreas con mayor probabilidad de idoneidad (Figura 9) se encuentran concentradas en la zona de Portoviejo, Manabí, seguidas por áreas ubicadas al

noreste de la provincia de Guayas, así como un pequeño parche en la provincia del Oro al norte y en la provincia de Loja. Estas áreas muestran las condiciones típicas o propias de la especie, variando en rangos intermedios entre 0 y 1 (Figura 9).

6. DISCUSIÓN

Tomando en cuenta que la transmisión a través de vectores es la principal forma de adquirir la enfermedad (Bonney, 2014) varios estudios demuestran que un adecuado diseño de las campañas de control vectorial son claves para la erradicación de la ECh (Nunes y Dones, 2014), más estos dependen del entendimiento de la biología y el comportamiento de los triatominos, y los motivos por los cuales ocurren infestaciones recurrentes (Miles et al., 2003).

Estudios sobre el ciclo de vida y eficacia vectorial han sido de gran ayuda para el desarrollo de iniciativas de control vectorial, tal como la Iniciativa del Cono Sur, enfocado para el control de *Triatoma infestans* (Schofield y Dias, 1999), lográndose la erradicación de Chagas agudo en grandes áreas rurales, así como la eliminación de transmisión vectorial en Uruguay, Chile, Brasil y Argentina (Coura, Viñas, y Junqueira, 2014). Por otro lado, la Iniciativa de América Central y México, se ha enfocado en el control de *Triatoma dimidiata* (Starr, Rojas, Zeledón, Hird y Carpenter, 1991; Reyes, y Angulo, 2009), y *Rhodnius prolixus*, lográndose grandes avances en algunos países como El Salvador y Honduras (Barrett et al., 2003; Hashimoto y Schofield, 2012).

En el Ecuador, el Centro de Investigación para la Salud en América Latina (CISeAL) ha realizado este tipo de investigación para *Rhodnius ecuadoriensis* de las provincias de Manabí y Loja, (Villacís et al., 2008), *Panstrongylus chinai* (Mosquera et al., 2016) y *Triatoma carrioni* (Padilla, 2016) todas las especies antes mencionadas distribuidas principalmente en Loja.

Panstrongylus howardi es catalogada como especie endémica del Ecuador (Abad-Franch et al., 2001; Villacís et al., 2015). Ha sido registrada invadiendo el hábitat domiciliar y peridomiciliar (Índice de Infestación: 1,4% y 6,6% respectivamente) en algunas comunidades del cantón Portoviejo, presentando un índice de infección con *T. cruzi* del 53,2% (Villacís et al., 2015).

6.1. CICLO DE VIDA DE *P. howardi*

El conocer diversos parámetros biológicos, tales como el periodo de desarrollo ninfal y la mortalidad son de suma importancia dado que influencia directamente el tamaño poblacional de una especie, así, cuanto menor sea la mortalidad y el periodo de desarrollo, mayor será el tamaño poblacional de dicha especie (Barreto-Santana, Starling, Gurgel y Cuba, 2011). Esta información, nos ayuda a analizar el escenario de competencia entre especies que coexisten en un determinado hábitat (Rabinovich y Nieves, 2011), siendo éste principalmente el caso entre *R. ecuadoriensis* y *P. howardi* en la provincia de Manabí (Villacís et al., 2015).

P. howardi demostró necesitar $186,9 \pm 12,2$ días, para completar su desarrollo, por lo que se considera como una especie bianual. En comparación a otras especies presentes en el Ecuador, del mismo género y de importancia epidemiológica. El tiempo total que requiere *P. howardi*, se encuentra entre, *P. geniculatus* (Latreille 1811), especie presente en 18 países de Latinoamérica, misma que requiere de 324,38 días (Rabinovich y Felinciangeli, 2015), y *P. rufotuberculatus* (Champion, 1899) presente en 10 países de la región, con $138,82 \pm 51,42$ días (Wolff, Cuartas, Velásquez y Jaramillo, 2004). Si comparamos con *P. chinai* (Del Ponte), presente en Ecuador y Perú, éste requirió un total de $371,4 \pm 22,3$ días (Mosquera et al., 2016).

Es necesario recalcar que *P. geniculatus* fue alimentado con sangre de gallina (Cabello y Galíndez, 1998; Rabinovich y Felinciangeli, 2015), a pesar de encontrarse principalmente asociado a mamíferos (como armadillos: *Dasybus novemcinctus*, ratones, cuyes entre otros) (Cabello y Galíndez, 1998), mientras que para *P. chinai* y esta especie se utilizó ratones (*Mus musculus*), siendo de su preferencia en el hábitat natural gallinas y mamíferos domésticos (Patterson et al., 2009).

En relación a las especies con similar distribución geográfica, presentan ciclos bastante parecidos, siendo: *R. ecuadoriensis*, con $189,9 \pm 20$ días (Villacís et al., 2008), y *T. dimidiata* con $240,5 \pm 9,77$ días (Zeledón, Guardia, Zuñiga, Swartzwelder, 1970; Guzmán-Marín, Barrera-Perez, Rodriguez-Felix, y Zavala-Velázquez, 1992), cabe resaltar que todos estos estudios fueron realizados bajo condiciones de laboratorio, tratando de asemejar el ambiente natural, el cual ciertamente influencia en el metabolismo del insecto, la necesidad de alimento y la disponibilidad del mismo, afectando consecuentemente al ciclo de vida (Canale, Cecere, Chuit y Gürtler, 1999; Zeledón, Cordero, Marroquín y Lorosa, 2010).

Respecto al tiempo de muda de los estadios ninfales, se corroboró lo establecido por otros estudios en *T. dimidiata*, *T. lenti*, *T. rycmani*, *P. chinai* y *P. geniculatus* (Canale et al., 1999, Zeledón et al., 2010; Mosquera et al., 2016), ambos parámetros están directamente relacionados, es decir, entre más avanzado sea el estadio ninfal, mayor tiempo para mudar requerirá. El tiempo mínimo de muda se observó en el paso de NII a NIII con (22 ± 6) días y el mayor tiempo corresponde al paso de NV a adultos (42 ± 8) días).

6.1.1. MORTALIDAD DE *P. howardi*

La mortalidad más alta se observó en los dos primeros estadios ninfales, NI presentó un 32,3% y NII 20%, disminuyendo a medida que avanza el desarrollo ninfal, pudiendo adjudicarse a la dificultad que presentan los primeros estadios ninfales para alimentarse (29% sin alimentarse) por la delicadeza de sus partes bucales (Villacís et al., 2008; Barreto-Santana, et al., 2011; Durán, Siñani y Depickère, 2014).

Éstos resultados se asemejan a los obtenidos por Cabello y Galíndez, (1988), en *P. geniculatus* en la que se observó mayor mortalidad en los dos primeros estadios ninfales (62,5% NI y 25% NII), al igual que Rabinovich y Felinciangeli (2015), para la misma especie (9,24% y 7,98% respectivamente), así como en *T. dimidiata* (Zeledón, Guardia, Zúñigac y Swartzwelder, 1970), *T. infestans* (Rabinovich, 1972), y *Rhodnius neglectus* (Rocha, Jurberg, Carcavallo, Cunha, V y Galvão, 2001). Otras especies tales como *P.*

chinai mostraron mayor mortalidad en los estadios NI (50%) y NV (52,2%) (Mosquera et al., 2017), y Wolff et al., 2004 en *P. rufotuberculatus*, obtuvo mayor mortalidad en el segundo estadio ninfal (10%).

El paso de NV a adultos es en donde se observa la mortalidad más baja en *P. howardi*, este evento no se ha visto en otras especies, por ejemplo en *P. geniculatus* se observó un 12,5% de mortalidad en el último estadio ninfal (Cabello y Galíndez, 1998), así como *P. chinai* (52,2%) (Mosquera et al., 2016). Este evento podría estar relacionado con la adquisición de nuevas estructuras anatómicas y cambios fisiológicos durante la muda a adultos (Arévalo et al., 2007; Barreto-Santana et al., 2011).

Cabe mencionar, que a pesar de controlar las condiciones ambientales en las que fueron mantenidos los individuos a lo largo de su desarrollo (temperatura $28\pm 6^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $80\pm 10\%$, fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad) tratando de simular las de su entorno natural, probablemente éstas condiciones pueden diferir de las que normalmente ocurren en su hábitat natural, donde existen variaciones climáticas que influyen en el metabolismo del insecto, en sus necesidades tróficas y consecuentemente en su ciclo de vida (Canale et al., 1999).

Así mismo, como se indicó en la metodología de la investigación, los individuos de *P. howardi* analizados son de laboratorio, condición que favorece la endogamia, misma que puede variar en poblaciones domiciliarias, peridomiciliarias y silvestres (Canale et al., 1999). Razones por las que se hace difícil realizar comparaciones entre distintas especies, incluso dentro del mismo género, debido además a la diversidad de metodologías utilizadas en cada laboratorio; como por ejemplo: la procedencia y tipo de alimento y/o condiciones ambientales (Guarneri, Pereira y Diotaiuti, 2000, Martínez-Ibarra et al., 2008; Guerenstein y Lazzari, 2009; Meireles-Filho y Kyriacou, 2013).

Varios estudios se han enfocado en determinar qué factores son claves para el desarrollo de los insectos, en especial de aquellos transmisores de enfermedades,

llegándose a establecer que la temperatura y la humedad son factores influyentes para la sobrevivencia y consecuente culminación del ciclo de vida (Guerenstein y Lazzari, 2009; Meireles-Filho y Kyriacou, 2013).

6.2. HÁBITOS DE ALIMENTACIÓN DE *P. howardi*

6.2.1. TIEMPO DE INGRESO DE LA PROBÓSCIDE

El tiempo de pre-alimentación es bastante similar en los tres primeros estadios ninfales, aumentando levemente a medida que éstos avanzan, correspondiendo el menor y mayor tiempo a NIII ($3,1 \pm 4,2$ min.), y a los machos ($10,6 \pm 6,6$ min.) respectivamente. Según Zeledón et al., (1977), el tiempo que los triatominos están en contacto con el hospedero antes del ingreso de la probóscide es de 5 a 10 minutos.

Panstrongylus howardi muestra en promedio mayor avidez y voracidad hacia la fuente de sangre, por ende mayor rapidez para alimentarse. En relación a otras especies como *P. rufotuberculatus* (15-30 min.) (Wolff et al., 2004), y bastante similar a *R. ecuadoriensis* (4,42-8,30 min.) (Villacís et al., 2006) y *P. chinai* (4,55 min.) (Mosquera et al., 2016).

6.2.2. TIEMPO DE ALIMENTACIÓN

El tiempo de alimentación está directamente relacionado con el estadio ninfal (Carcavallo, et al., 1999). Durante los primeros estadios ninfales, los triatominos necesitaron menor tiempo de alimentación a diferencia de los estadios más avanzados, siendo NI (20,2 min.) y NV (42,5 min.) el menor y mayor tiempo respectivamente. Las hembras por su parte, demoraron mayor tiempo en alimentarse respecto a los machos. Estos resultados se pudieron evidenciar también con otras especies estudiadas como por

ejemplo con *P. chinai* (Mosquera et al., 2016), *R. ecuadoriensis* (Villacís et al., 2008) y *T. carrioni* (Padilla, unpublished data).

El estudio de ésta variable resulta epidemiológicamente relevante, debido que entre más se prolongue el tiempo de alimentación, mayor será la probabilidad de que el triatomino defecue sobre el hospedero (Rabinovich, Leal y de Piñero, 1979), las especies que tienden a alimentarse por más de 10 minutos son consideradas como potenciales vectores de la ECh (Zeledón, Alvarado y Jiron, 1977), factor que además las hace susceptibles de infección con *T. cruzi* de tratarse de un hospedero infectado, a mayor sangre ingerida, mayor será la probabilidad de ingerir el parásito (Oliveira Calvalho-Costa y Sarquis, 2009).

A excepción de ciertos individuos, principalmente en el último estadio: NV y adultos, se observó interrupción de la alimentación (por diversos intervalos de tiempo) debido a movimientos del hospedero inmovilizado (*Mus musculus*). Similar comportamiento fue observado en *P. rufotuberculatus* por Wolff et al., (2004) y en *R. prolixus* por Días (1956). Zabala y D'Antonio (1988) y Días (1956), proponen que este comportamiento, es un mecanismo desarrollado con el propósito de probar la irritabilidad del hospedero antes, y durante la alimentación.

Por otro lado, la interrupción de la alimentación causada por el movimiento del hospedero inmovilizado (*Mus musculus*) tiene como resultado tiempos prolongados de alimentación, incrementando a su vez la probabilidad de exposición del hospedero al material fecal con *T. cruzi* (Zeledón et al., 1977). Se ha reportado que especies de importancia epidemiológica requieren más tiempo de alimentación, como por ejemplo *T. infestans* (21 min.), *R. prolixus* (17 min.), y *T. dimidiata* (30 min.) (Oliveira et al., 2009). Es importante mencionar que el tiempo necesario para saciarse depende del hospedero, y de su tamaño entre otros factores (Arévalo, Carranza, Guhl, Clavijo, y Vallejo, 2007).

6.2.3. CANTIDAD DE SANGRE INGERIDA

La cantidad de sangre ingerida en cada alimentación depende de la especie de triatomino, del estadio ninfal, así como de las condiciones ambientales en las que el triatomino se desarrolla (Carcavallo et al., 1999). Al igual que el tiempo de alimentación, la cantidad de sangre ingerida incrementa a medida que progresa el desarrollo ninfal, siendo NI el que ingirió la menor cantidad de alimento ($5,9 \pm 3,1$ mg.) y NV la mayor cantidad ($459,6 \pm 315,2$ mg.). Si comparamos con una especie anual tal como *P. chinai* ($480,3 \pm 190,6$ mg) (Mosquera et al., 2016) la cantidad de alimento ingerido en NV es cercanamente similar, mientras que si contrastamos respecto a otra especie semestral tal como *P. rufotuberculatus* ($290,1 \pm 5,85$ mg.) es bastante superior (Wolff et al., 2004). La necesidad de mayor cantidad de sangre en NV está relacionada con la adquisición de nuevas estructuras anatómicas y cambios fisiológicos durante la muda a adultos (Arévalo et al., 2007; Barreto-Santana et al., 2011).

De acuerdo con Gonçalves, Rocha y Cunha, (2000), las hembras generalmente consumen mayor cantidad de sangre en función de satisfacer la necesidad energética que representa el desarrollo del huevo. Cabe mencionar que el presente estudio realizó el seguimiento de los individuos adultos por dos meses aproximadamente, comprobándose en este estudio donde, las hembras de *P. howardi* consumieron 365 mg. de sangre, superando incluso a la cantidad consumida por especies anuales, como por ejemplo *P. chinai* que presentan un promedio de $187,4 \pm 0,04$ mg. los machos (Mosquera et al., 2016); así como en comparación a especies bianuales tal como *P. rufotuberculatus*, con $212,13 \pm 12,30$ mg. (Wolff et al., 2004).

Schofield (1994) menciona que las ninfas tienden a aumentar entre ocho y nueve veces su propio peso, resultados que difieren con lo observado en este estudio, dado que nuestras ninfas obtuvieron un promedio de $6,7 \pm 1,9$ veces. Mientras que respecto a los adultos, el autor menciona que incrementan entre dos y cuatro veces, tal como *P. chinai* (2,2 veces) (Mosquera et al., 2016) y *Rhodnius ecuadoriensis* (2,11 veces) (Villacís, 2006).

Nuestros resultados difieren a lo mencionado anteriormente dado que las hembras de *P. howardi* aumentaron alrededor de 5 veces su peso.

Finalmente, es necesario tener en cuenta que al determinar la cantidad de sangre ingerida durante la alimentación de los triatominos, se abre otra perspectiva desde el punto de vista médico, que a más de ser los insectos transmisores de la ECh a los humanos, puede causar otro tipo de enfermedades, como por ejemplo anemia. En este estudio se ha demostrado que, un solo individuo puede ingerir un promedio de 0,125 litros de sangre en un lapso de hasta 40 min., lo que quiere decir que una colonia de diez individuos en un ambiente domiciliar consumiría 1,25 litros de sangre, de darse el caso de que estos individuos tengan periodos prolongados de ayuno, y consumieran sangre quincenalmente, afectarían en 2,5 litros de sangre mensualmente, cantidad perjudicial en el caso de infantes, menores de siete años y adultos.

6.3. PATRONES DE DEFECACIÓN DE *P. howardi*

El porcentaje total de defecación durante la alimentación es del 67,34%, resultado similar al obtenido para *P. chinai* (62-81%) (Mosquera et al., 2016). Los estadios NIV y NV son los que presentan mayor número de individuos que defecaron durante la alimentación (43,3% y 34,6% respectivamente); así como las hembras (25%) con respecto a los machos (7,1%).

Este patrón es bastante similar al que demostró *Rhodnius ecuadoriensis* (Villacís et al., 2008), tanto para los estadios ninfales NIV (27,5%) y NV (45%), así como las hembras respecto a los machos (75% y 70% respectivamente), sugiriendo mayor competencia vectorial en los últimos estadios ninfales y adultos.

Respecto al porcentaje de defecación a los 15 minutos posteriores a la alimentación, los estadios ninfales NIII y NII, fueron los que presentaron los porcentajes más altos

(21,9% y 17,8% respectivamente), resultados que difieren grandemente a los obtenidos por Villacís et al., (2008) en *Rhodnius ecuadoriensis* donde los adultos, machos (85%) y hembras (100%) presentaron los porcentajes más altos de defecación.

Dado que la forma de transmisión de *T. cruzi* es a través de las heces, los triatomíneos que defecan durante la alimentación o un tiempo corto después de ésta, son considerados de importancia epidemiológica, como por ejemplo *T. infestans* y *R. prolixus* (Oliveira et al., 2009) y *R. ecuadoriensis* (Villacís et al., 2008) razón por la cual, se sugiere considerar a *P. howardi* como especie secundaria de vigilancia epidemiológica en Manabí.

Vale la pena mencionar que si bien los datos biológicos para muchas especies de triatomíneos están disponibles, realizar comparaciones entre los estudios son difíciles de llevar a cabo debido a las grandes diferencias en el diseño experimental, especialmente con respecto a parámetros como: i) la temperatura, ii) humedad relativa, iii) la frecuencia de alimentación, iv) las fuentes de alimentación, v) el número muestral de la especie estudiada, vi) la densidad de los insectos por contenedor, vii) y la frecuencia de las observaciones (Zárate, 1983, Guarneri et al., 2000; Martínez-Ibarra et al., 2008).

La gran diversidad de especies de triatomíneos presentes en el Ecuador, y en general en Latinoamérica, hace necesario un manejo eficiente del control biológico en las zonas donde se reporta la presencia de ellos. Las capacidades de cada insecto hematófago causante de la ECh dependen mucho de las condiciones y hábitat donde estos co-habitan con el hombre, por ello, el estudio minucioso y por separado de cada especie efectiviza un mejor enfoque a la salud.

6.4. MODELO DE NICHO ECOLÓGICO

MAXENT es considerado como uno de los métodos más completos (Elith et al., 2006) para el modelamiento de nicho ecológico, puesto que cuenta con una serie de

ventajas prácticas que lo hacen fácilmente aplicable: i) sólo requiere datos de presencia, ii) puede utilizar tanto predictores continuos como categóricos, iii) la salidas del modelo es continua pudiendo ser categorizada aplicando distintos umbrales, y iv) los resultados pueden ser manejados utilizando Sistemas de Información Geográfica (Phillips et al., 2006).

Los datos de distribución de especies suelen ser incompletos, y en general sólo contar con información de presencia, a excepción de especies muy comunes o extensamente estudiadas, el número de registros por especie suele ser bajo (Pearson, Raxworthy, Nakamura y Townsend Peterson, 2007). Esto se evidencia en este caso donde se cuenta con 8 datos de presencia, más es necesario recalcar que estos datos fueron verificados por el CISEAL, razón por la cual se estima que el modelo obtenido en el presente estudio, a pesar de presentar ciertamente limitaciones dado el desconocimiento de la ecología de la especie, se puede decir que tiene cierto grado de solidez.

Los modelos de nicho tienen varios supuestos, que deben tenerse en cuenta a la hora de ser utilizados e interpretar sus resultados, el principal de ellos es que la distribución actual de una especie es una representación de sus requerimientos ambientales (Pearson y Dawson 2003). Por otro lado, asumen que las especies se encuentran en equilibrio con su ambiente, es decir que todos los ambientes “adecuados” se encuentran actualmente ocupados y la distribución de las especies no está en expansión ni en retracción (Soberón y Peterson, 2005). Bajo lo expuesto con anterioridad se estima que las áreas encontradas en éste estudio con idoneidad de condiciones para que *P. howardi* se distribuya en ellas, da la razón por la cual se hace necesario un muestreo de las mismas con el propósito de verificar los resultados obtenidos con éste estudio.

Gracias al modelo obtenido con MAXENT se concluye que las áreas con potencial para ser habitadas por *P. howardi* son aquellas donde las condiciones climáticas son bastante únicas, por lo que se encuentran restringidas a cuatro parches (al norte de Manabí y Guayas y dos pequeños en la Provincia del Oro y Loja). El parche observado al noroeste

de la provincia de Loja es de interés para estudios a futuro puesto se tiene la hipótesis de que *P. chinai* y *P. howardi* son formas melánicas de una misma especie. (Villacís, et al., in prep).

7. CONCLUSIONES

Ésta investigación contribuye con información de importancia para el control de la ECh en el Ecuador.

7.1. CICLO DE VIDA DE *P. howardi*

El conocer qué *P. howardi* y *R. ecuadoriensis* presentan ciclos de vida similares es de gran valor epidemiológico, dado que ambas especies comparten la distribución geográfica, por lo tanto, el control mediante rociamiento de piretroides afectará a ambas especies transmisoras de la ECh en la provincia de Manabí, ahorrando recursos así como facilitando el trabajo de control vectorial.

7.2. MORTALIDAD DE *P. howardi*

El tamaño poblacional de una especie de triatmino es un factor de suma importancia epidemiológica y médica, dado que a mayor número de estos insectos, mayor será la probabilidad de transmisión de la ECh, así como mayor será la cantidad de sangre tomada al ser humano. La mortalidad es uno de los factores que influencia directamente al tamaño poblacional, *P. howardi* presenta menor mortalidad en los dos últimos estadios ninfales, siendo éste un factor determinante para el número de adultos con capacidad reproductiva para aumentar su población. Razón por la cual, se propone a *P. howardi* como una especie de vigilancia epidemiológica.

7.3. HABITOS DE ALIMENTACIÓN

El tiempo de pre-alimentación y la cantidad de alimento son factores importantes para la supervivencia de un individuo hematófago, así como para evaluar su eficiencia como vector de la ECh.

7.4. TIEMPO PRE-ALIMENTACIÓN

La posibilidad de sobrevivir depende de la habilidad de obtener alimento, en este estudio, se demostró que *P. howardi* presenta gran avidez y voracidad hacia la fuente de sangre, similar al estudio de *R. ecuadoriensis*, por lo que se recomienda considerar a *P. howardi* como especie secundaria de importancia epidemiológica en la provincia de Manabí.

7.5. TIEMPO ALIMENTACIÓN

El tiempo de alimentación determina el tiempo de contacto vector-hospedero, en consecuencia, a mayor tiempo de contacto mayor será la posibilidad de que el triatomino defeca en el hospedero, aumentando por ende la probabilidad de transmisión de *T. cruzi*. En éste estudio se evidenció que NV y las hembras de *P. howardi* presentan en promedio mayor tiempo de contacto con el hospedero, siendo así, las que podrían transmitir el parásito con mayor probabilidad que el resto de estadios ninfales y que los machos.

7.6. CANTIDAD DE ALIMENTO

La cantidad de alimento es determinante para la sobrevivencia de los triatominos, así como de importancia epidemiológica debido a que de esta forma, los triatominos adquieren *T. cruzi*. *P. howardi* ingiere en promedio una gran cantidad de alimento en comparación a otras especies, por lo cual tiene mayor posibilidad de adquirir el parásito, así como de transmitirlo. Además, tomando en cuenta que las colonias de triatominos tienden a presentar un gran número de individuos, puesto que según Carcavallo et al., (1999), las hembras en su vida fértil pueden llegar a poner hasta 1400 huevos, de los cuales por lo menos el 50 % serán viables, se estima que una colonia de *P. howardi* afecte de manera significativa en cuanto a la cantidad de sangre tomada de un individuo.

7.7. EFICACIA VECTORIAL

En el presente estudio se determinó que *P. howardi* es un vector eficiente de la ECh, razón por la cual, es necesario considerarla como de importancia epidemiológica de la ECh en la provincia de Manabí.

7.8. NICHO ECOLÓGICO

Mediante este estudio se hace evidente que aquellas áreas con posible distribución de *P. howardi* necesitan ser muestreadas, para así determinar con mayor certeza la presencia de esta especie, y proceder a realizar el control vectorial. Además se evidencia la necesidad de tomar en cuenta variables complementarias a las utilizadas en el presente estudio, tales como cobertura vegetal o aquellas relacionadas al uso de suelos, para posterior a esto poder evaluar el modelo obtenido utilizando ENMtools. Esto permitirá establecer de manera más certera el nicho ecológico de *Panstrongylus howardi*.

8. RECOMENDACIONES

Por la rapidez en la obtención del alimento, la cantidad de sangre que consume y la velocidad con que se produce la primera defecación en algunas de las etapas de su desarrollo (características que definen a un vector como eficiente), *Panstrongylus howardi* podría categorizarse como potencial vector de ECh y de vigilancia entomológica continua en la provincia de Manabí, además se debe tener presente que eventualmente ésta especie podría ir ocupando hábitats que las especies consideradas como vectores primarios podrían ir dejando. Éste estudio servirá como base para la implementación de programas de control que permitan reducir el riesgo de transmisión de la ECh en esta provincia.

Como se pudo observar durante todo este trabajo, las características que definen a cada vector son diferentes para cada género, más aún entre especies, y tratar a todos los vectores con una metodología de control similar, con periodos de aplicación de insecticidas piretroides cada cierto tiempo, a pesar de tener ciclos de vida diferentes (univoltinos o multivoltinos), no aporta para la meta final de eliminación vectorial, y más aún el control de la ECh en nuestro país. Por este motivo, se recomienda realizar estudios por especie, integrando estudios multidisciplinarios que abarquen de mejor manera la problemática de la ECh.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abad-Franch, F., Paucar, C., Carpio, C., Cuba Cuba, C. A., Aguilar, V., Marcelo, H., & Miles, M. A. (2001). Biogeography of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) in Ecuador: implications for the design of control strategies. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 611-620. doi: doi.org/10.1590/S0074-02762001000500004
- Abad-Franch F, Aguilar HM (2003) Control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. OPS/OMS-Ministerio de Salud Pública del Ecuador. 70pp.
- Abad-Franch, F. (2007). Eco-epidemiología de la enfermedad de Chagas. La enfermedad de Chagas a la puerta de los, 100.
- Aguilar VH, Abad-Franch F, Racines VJ & Paucar CA (1999) Epidemiology of Chagas disease in Ecuador. A brief review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(Suppl 1), 387–393. Doi: doi.org/10.1590/S0074-02761999000700076
- Aráujo, A., Jansen, A. M., Reinhard, K., & Ferreira, L. F. (2009). Paleoparasitology of Chagas disease: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 9-16. doi: doi.org/10.1590/S0074-02762009000900004
- Arévalo, A., Carranza, J. C., Guhl, F., Clavijo, J. A., & Vallejo, G. A. (2007). Comparación del ciclo de vida de *Rhodnius colombiensis* Moreno, Jurberg & Galvão, 1999 y *Rhodnius prolixus* Stal, 1872 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) en condiciones de laboratorio. *Biomedica*, 27, 119-129. doi: doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.255
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriaza, B., Renier, C., Wittmers Jr. L.E., Fornaciari, G., & Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 2034-2039. doi: 10.1073/pnas.0307312101
- Barreto-Santana, D., Starling, J., Gurgel, R., and Cuba, C. A. 2011. Comparative biology and feeding behavior of *Rhodnius neglectus* and *Rhodnius robustus* (Triatominae) under laboratory conditions. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44: 490–495. doi.org/10.1590/S0037-86822011000400018
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J., Stich, A., Lazzari, J. O., Frasc, A. C., Cazzulo, J. J., & Krishna, S. (2003). The trypanosomiases. *The Lancet*, 362(9394), 1469-1480. doi: http://www.bio.umass.edu/micro/klingsbeil/590s/Reading/Trypanos2003.pdf
- Beaumier, C. M., Gillespie, P. M., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine*, 34(26), 2996-3000. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.074

- Bern, C., Martin, D. L., & Gilman, R. H. (2011). Acute and Congenital Chagas. En Weiss, L., Tanowitz, H., Kirchhoff, L. *Chagas Disease*, 75, 19.
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466. doi: <http://med.mui.ac.ir/sites/default/files/users/ofony/Chagas.pdf>
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1998). Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). *Bmj*, 317(7172), 1572-1580. doi: doi.org/10.1136/bmj.317.7172.1572 (Published 05
- Bonney, K. M. (2014). Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat?. *Parasite*, 21, 11. doi: <https://doi.org/10.1051/parasite/2014012>
- Borror, D. J., Triplehorn, C. A., & Johnson, N. F. (1989). An introduction to the study of insects. *An introduction to the study of insects*. (Ed. 3).
- Buckner, F. S., Moore, A. C., & Cetron, M. S. (2016). Chagas Disease. *The Travel and Tropical Medicine Manual*, 68, 371.
- Cabello, D. R., & Galíndez, I. (1998). Vital statistics of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811) (Hemiptera: Reduviidae) under experimental conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(2), 257-262. doi: doi.org/10.1590/S0074-02761998000200024
- Canale, D., Jurberg, J., Carcavallo, R., Galvão, C., Girón, I., Segura, C., Mena, D., Rocha, D., & Martínez, A. (1999). Bionomics of some species. Atlas of Chagas disease vectors in the Américas, 3, 839-90. En. Carcavallo, I., Galíndez Girón, J., Jurberg, J., & Lent, J., *Atlas of Chagas's disease vectors in the America. Atlas dos vectors da doenca de Chagas nas Americas*, vol.3. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- Canale DM, Cecere MC, Chuit R, Gürtler RE. (1999). Peridomestic distribution of *Triatoma garciabesi* and *Triatoma guasayanai* north-west Argentina. *Med Vet Entomol* 14:383-390. doi: [doi/10.1046/j.1365-2915.2000.00254.x/full](https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2000.00254.x/full)
- CanÇado, J. R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(1), 29-37. doi: doi.org/10.1590/S0036-46652002000100006
- Carabarin-Lima, A., González-Vázquez, M. C., Rodríguez-Morales, O., Baylón-Pacheco, L., Rosales-Encina, J. L., Reyes-López, P. A., & Arce-Fonseca, M. (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update. *Acta tropica*, 127(2), 126-135. doi: doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.007
- Carcavallo, R. U., da Silva Rocha, D., Galíndez Girón, I., Sherlock, I., Galvão, C., Martínez, A. & Cortón, E. (1998). Feeding sources and patterns. RU Carcavallo, I Galíndez-Girón, J Jurberg, H Lent, Atlas of Chagas disease vectors in the Americas, Fiocruz, Rio de Janeiro, 537-560.

- CDC Centers for Disease Control and Prevention). (2016). Enfermedad de Chagas. Biología. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
- CDC Centers for Disease Control and Prevention). (2016). Enfermedad de Chagas. Enfermedad. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/disease.html>
- Ceccarelli, S., & Rabinovich, J. E. (2015). Global Climate Change Effects on Venezuela's Vulnerability to Chagas Disease is Linked to the Geographic Distribution of Five Triatomine Species. *Journal of medical entomology*. doi: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv119>
- Coimbra, C. E. (1988). Human settlements, demographic pattern, and epidemiology in lowland Amazonia: The case of Chagas's disease. *American Anthropologist*, *90*(1), 82-97. doi: 10.1525/aa.1988.90.1.02a00060
- Costa, J., & Peterson, A. T. (2012). Ecological niche modeling as a tool for understanding distributions and interactions of vectors, hosts, and etiologic agents of Chagas disease. *In Recent advances on model hosts* (pp. 59-70). Springer New York. doi: 10.1007/978-1-4419-5638-5_7
- Costales, J. A., Jara-Palacios, M. A., Llewellyn, M. S., Messenger, L. A., Ocana-Mayorga, S., Villacís, A. G., Tibayrenc, M., & Grijalva, M. J. (2015). *Trypanosoma cruzi* population dynamics in the Central Ecuadorian Coast. *Acta tropica*, *151*, 88-93. doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.017
- Coura, J. R., & Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, *465*(n7301_suppl), S6-S7. doi: 10.1038/nature09221
- Coura, J. R. (2013). Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible?. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *108*(8), 962-967. doi.org/10.1590/0074-0276130565
- Coura, J. R., Viñas, P. A., & Junqueira, A. C. (2014). Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *109*(7), 856-862. doi:10.1038/nature09221
- Daumerie D, Lorenzo S. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Eds. Crompton DWT, Peters P. *World Health Organization*. 2010.
- de la Vega, G. J., Medone, P., Ceccarelli, S., Rabinovich, J., & Schilman, P. E. (2015). Geographical distribution, climatic variability and thermo-tolerance of Chagas disease vectors. *Ecography*, *38*(8), 851-860. doi: 10.1111/ecog.01028
- Dias, E. (1956). Observações sobre eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sul-americanos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *54*(1), 115-124. doi.org/10.1590/S0074-02761956000100006

- Díaz, M. L., Leal, S., Mantilla, J. C., Molina-Berríos, A., López-Muñoz, R., Solari, A., Escobal, P., & Rugeles, C. I. G. (2015). Acute chagas outbreaks: molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasites & vectors*, *8*(1), 608. doi: 10.1186/s13071-015-1218-2
- Drugs for Neglected Diseases Initiative. Enfermedad de Chagas [Internet]. Disponible en: <http://www.dndial.org/es/enfermedades-olvidadas/enfermedad-de-chagas.html>.
- Dumonteil, E., Herrera, C., Martini, L., Grijalva, M. J., Guevara, A. G., Costales, J. A., & Waleckx, E. (2016). Chagas disease has not been controlled in Ecuador. *PLoS One*, *11*(6), e0158145. doi.org/10.1371/journal.pone.0158145
- Durán, P., Siñani, E., & Depickère, S. (2014). Biological cycle and preliminary data on vectorial competence of *Triatoma boliviana* in laboratory conditions. *Acta tropica*, *140*, 124-129. Doi: doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.08.014
- Elith J., Graham C. H., Anderson R. P., Dudik M., Ferrier S., Guisan A., Hijmans R. J., Huettmann F., Leathwock J. R., Lehmann A., Li J., Lohmann L. G., Loiselle B. A., Manion G., Moritz C., Nakamura M., Nakazawa Y., Overton J. M., Peterson A. T., Phillips S. J., Richardson K., Scachetti-Pereira R., Schapire R. E., Soberón J., Williams S., Wisz M. S. y Zimmermann N. E. (2006). Novel methods improve predictions of species distributions from occurrence data. *Ecography* *29*: 129-151. doi: 10.1111/j.2006.0906-7590.04596.x
- Ferrín S., Rosa. (1988). “Política de comercialización de café e incidencia en la organización productiva de la economía campesinas en Manabí, Ecuador.” *Estudios rurales latinoamericanos*, vol. 11, nos. 1 y 2: p. 185-23
- González Audino, P., Vassena, C., Barrios, S., Zerba, E., & Picollo, M. I. (2004). Role of enhanced detoxication in a deltamethrin-resistant population of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) from Argentina. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *99*(3), 335-339. doi: doi.org/10.1590/S0074-02762004000300018
- Gonçalves, T. C. M., Rocha, D. S., & Cunha, R. A. (2000). Feeding patterns of *Triatoma vitticeps* in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, *34*(4), 348-352. doi: doi.org/10.1590/S0034-89102000000400006
- Grijalva, M. J., Villacis, A. G., Ocaña-Mayorga, S., Yumiseva, C. A., Moncayo, A. L., & Baus, E. G. (2015). Comprehensive survey of domiciliary triatomine species capable of transmitting Chagas disease in southern Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*, *9*(10), e0004142. doi: doi.org/10.1371/journal.pntd.0004142
- Guarneri, A. A., Pereira, M. H., & Diotaiuti, L. (2000). Influence of the blood meal source on the development of *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma sordida*, and *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera, Reduviidae). *Journal of medical entomology*, *37*(3), 373-379. doi: doi.org/10.1603/0022-2585(2000)037[0373:IOTBMS]2.0.CO;2

- Guerestein, P. G., & Lazzari, C. R. (2009). Host-seeking: how triatomines acquire and make use of information to find blood. *Acta tropica*, *110*(2), 148-158. doi: doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.019
- Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G. A., Cardenas, A., Arroyo, F., & Aufderheide, A. (2000). Chagas disease and human migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *95*(4), 553-555. doi: doi.org/10.1590/S0074-02762000000400018
- Guzmán-Marín, E., Barrera-Perez, M., Rodriguez-Felix, E., & Zavala-Velázquez, J. (1992). Habito biológico de *Triatoma dimidiata* en el estado de Yucatán. *Rev Biomed*, *3*(3).
- Harcourt, D. G. (1969). The development and use of life tables in the study of natural insect populations. *Annual review of entomology*, *14*(1), 175-196. doi: doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.001135
- Hashimoto, K., & Schofield, C. J. (2012). Elimination of *Rhodnius prolixus* in central America. *Parasites & vectors*, *5*(1), 45. doi: 10.1186/1756-3305-5-45
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., & Periago, M. R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*, *2*(9). doi: doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300
- Hutchinson, G. Evelyn. 1957. "Concluding Remarks." *Population Studies: Animal Ecology and Demography*. Cold Springs Harbor Symposia on Quantitative Biology 22:415-27.
- Jurberg, J., & Galvão, C. (2006). Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), *vectors of Chagas disease, and implications for human health* (pp. 1095-1116).
- Lardeux, F., Depickère, S., Duchon, S., & Chavez, T. (2010). Insecticide resistance of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) vector of Chagas disease in Bolivia. *Tropical Medicine & International Health*, *15*(9), 1037-1048. doi: 10.1111/j.1365-3156.2010.02573.x
- Lobo, J. M., Jiménez-Valverde, A., & Hortal, J. (2010). The uncertain nature of absences and their importance in species distribution modelling. *Ecography*, *33*(1), 103-114. doi: DOI: 10.1111/j.1600-0587.2009.06039.x
- MAGAP. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Boletines Zonales Integrales y Temáticos. Enero 2016. En línea. Tomado de: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/edicion-impresa/2016/enero/enero-16-zona-4.pdf>.
- Marlière, N. P., Latorre-Estivalis, J. M., Lorenzo, M. G., Carrasco, D., Alves-Silva, J., de Oliveira Rodrigues, J., de Lima Ferreira, L., de Melo Lara, L., & Guarneri, A. A. (2015). Trypanosomes modify the behavior of their insect hosts: effects on locomotion and on the expression of a related Gene. *PLoS Negl Trop Dis*, *9*(8). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003973>

- Martínez, V. L., Graber, Y., & Harris, M. S. (2006). Estudios interdisciplinarios en la costa centro-sur de la provincia de Manabí (Ecuador): nuevos enfoques. *Bulletin de l'Institut français d'études andines*, (35 (3)), 433-444.
- Martínez-Ibarra, J. A., Salazar-Schettino, P. M., Solorio-Cibrián, M., Cabrera Bravo, M., Novelo-López, M., Vences, M. O., Montes-Ochoa, J. Y., Noguera-Torres, B. (2008). Influence of temperature and humidity on the biology of *Triatoma mexicana* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(7), 719-723. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000700015>
- Mathers, C. (2008). *The global burden of disease: 2004 update*. World Health Organization. Doi: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/
- Meireles-Filho, A. C. A., & Kyriacou, C. P. (2013). Circadian rhythms in insect disease vectors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 48-58. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130438>
- Miles, M. A., Feliciangeli, M. D., & de Arias, A. R. (2003). American trypanosomiasis (Chaga's disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Medical Journal*, 326(7404), 1444. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7404.1444>
- Moraes, C. B., & Franco, C. H. (2016). Novel drug discovery for Chagas disease. *Expert opinion on drug discovery*, 11(5), 447-455. doi: <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2016.1160883>
- Mosquera, K. D., Villacís, A. G., & Grijalva, M. J. (2016). Life Cycle, Feeding, and Defecation Patterns of *Panstrongylus chinai* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) Under Laboratory Conditions. *Journal of medical entomology*. doi: <https://doi.org/10.1093/jme/tjw027>
- Murta, S. M. F., & Romanha, A. J. (1998). In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology*, 116(2), 165-171. doi: 10.1017/S0031182097002084
- Murta, S. M., Nogueira, F. B., dos Santos, P. F., Campos, F. M., Volpe, C., Liarte, D. B., Nirdé, P., Probst, C.M., Krieger, M. A., Goldenberg, S., & Romanha, A. J. (2008). Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Acta tropica*, 107(1), 59-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.011>
- Nieto-Sanchez, C., Baus, E. G., Guerrero, D., & Grijalva, M. J. (2015). Positive deviance study to inform a Chagas disease control program in southern Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 299-309. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140472>

- Nogueira-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R., Isita-Tornell, L., & Camacho, A. D. (2000). Defecation pattern in seven species of triatomines (Insecta, Reduviidae) present in Mexico. *Revista latinoamericana de microbiologia-mexico-*, 42(4), 145-148.
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767-776. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- Oliveira, T. G., Carvalho-Costa, F. A., Sarquis, O., & Lima, M. M. (2009). Feeding and defecation patterns of *Rhodnius nasutus* (Hemiptera; Reduviidae), a triatomine native to an area endemic for Chagas disease in the State of Ceará, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(4), 651-655. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.08-0590>
- Otálora-Luna, F., Pérez-Sánchez, A. J., Sandoval, C., & Aldana, E. (2015). Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Revista chilena de historia natural*, 88(1), 1. doi: 10.1186/s40693-014-0032-0
- Padilla Narváez, F. A. (2016). Ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación de *Triatoma carrioni* (Larrouse, 1926) pertenecientes a la provincia de Loja, bajo condiciones controladas de laboratorio.
- Patterson, J. S., Barbosa, S. E., & Feliciangeli, M. D. (2009). On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: evolution, ecology and epidemiological significance. *Acta tropica*, 110(2), 187-199. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.09.008>
- PAHO, (2006). Technical Report: *Quantitative Chagas Disease Estimates*. Montevideo, Uruguay: Pan American Health Organization.
- Pawar, S., Koo, M. S., Kelley, C., Ahmed, M. F., Chaudhuri, S., & Sarkar, S. (2007). Conservation assessment and prioritization of areas in Northeast India: priorities for amphibians and reptiles. *Biological Conservation*, 136(3), 346-361. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.12.012>
- Pearson, R. G., & Dawson, T. P. (2003). Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful?. *Global ecology and biogeography*, 12(5), 361-371. doi: 10.1046/j.1466-822X.2003.00042.x
- Pearson, R. G., Raxworthy, C. J., Nakamura, M., & Townsend Peterson, A. (2007). Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: a test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of biogeography*, 34(1), 102-117. doi: 10.1111/j.1365-2699.2006.01594.x
- Phillips S. J., Dudík M., Schapire R. E. (2004). A maximum entropy approach to species distribution modeling. *Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning*, pages 655-66. doi:10.1145/1015330.1015412

- Phillips, S. J., Anderson, R. P., & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological modelling*, 190(3), 231-259. Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>
- Quinde-Calderón, L., Rios-Quituzaca, P., Solorzano, L., & Dumonteil, E. (2016). Ten years (2004–2014) of Chagas disease surveillance and vector control in Ecuador: successes and challenges. *Tropical Medicine & International Health*, 21(1), 84-92. Doi : 10.1111/tmi.12620
- Rabinovich, J. E., Leal, J. A., & de Piñero, D. F. (1979). Domiciliary biting frequency and blood ingestion of the Chagas's disease vector *Rhodnius prolixus* Ståhl (Hemiptera: Reduviidae), in Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(3), 272-283. doi: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90082-8)
- Rabinovich, J. E., Kitron, U. D., Obed, Y., Yoshioka, M., Gottdenker, N., & Chaves, L. F. (2011). Ecological patterns of blood-feeding by kissing-bugs (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(4), 479-494. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000400016>
- Rabinovich, J. E., & Nieves, E. L. (2011). Vital statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions: III. *Rhodnius neglectus*. *Journal of medical entomology*, 48(4), 775-787. doi: <https://doi.org/10.1603/ME10277>
- Rabinovich, J. E., & Feliciangeli, M. D. (2015). Vital Statistics of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) Under Laboratory Conditions: IV. *Panstrongylus geniculatus*. *Journal of medical entomology*, 52(5), 797-805. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000200024>
- Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rassi, A., & de Rezende, J. M. (2012). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious disease clinics of North America*, 26(2), 275-291. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rocha, D. D. S., Jurberg, J., Carcavallo, R. U., Cunha, V., & Galvão, C. (2001). Influence of the temperature and humidity on the biology of *Rhodnius neglectus* Lent, 1954 in laboratory conditions. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 34(4), 357-363. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822001000400008>
- Rothhammer, F., Allison, M. J., Núñez, L., Standen, V., & Arriaza, B. (1985). Chagas' disease in pre-Columbian South America. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(4), 495-498. doi: 10.1002/ajpa.1330680405
- Sánchez, J. (2011). Introducción al diseño experimental. Quito –Ecuador.

- Sánchez, J. (2012). Introducción a la estadística no paramétrica y el análisis multivariado. Quito –Ecuador.
- Santillán-Guayasamín, S., Villacís, A. G., Grijalva, M. J., & Dujardin, J. P. (2017). The modern morphometric approach to identify eggs of Triatominae. *Parasites & Vectors*, *10(1)*, 55. doi: 10.1186/s13071-017-1982-2
- Santos, C. M. D., Jurberg, J., Galvão, C., Rocha, D. D. S., & Fernandez, J. I. R. (2003). Morphometric study of the genus *Panstrongylus* Berg, 1879 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *98(7)*, 939-944. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000700014>
- Sassera, D., Epis, S., Pajoro, M., & Bandi, C. (2013). Microbial symbiosis and the control of vector-borne pathogens in tsetse flies, human lice, and triatomine bugs. *Pathogens and global health*, *107(6)*, 285-292. doi: <http://dx.doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000109>
- Schofield, C. J. (1994). *Triatominae: biology & control*. Eurocommunica Publications.
- Schofield, C. J., & Dias, J. C. P. (1999). The southern cone initiative against Chagas disease. *Advances in parasitology*, *42*, 1-27. doi: [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60147-5](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60147-5)
- Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, *110(2)*, 88-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>
- Stevens, J. R., & Gibson, W. C. (1999). The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cadernos de saude publica*, *15(4)*, 673-684. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1999000400002>
- Phillips S. J., Dudík M., Schapire R.E. (2004). *A maximum entropy approach to species distribution modeling*. In Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning, pages 655-662, 2004.
- Soberon, J., & Peterson, A. T. (2005). Interpretation of models of fundamental ecological niches and species distributional areas. doi: <http://hdl.handle.net/1808/20560>
- Suárez, M. V. (2008). Ecología de Triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) peridomiciliares y silvestres en las provincias de Loja y Manabí. Diss. Dissertation, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Suarez-Davalos, V., Dangles, O., Villacis, A. G., & Grijalva, M. J. (2010). Microdistribution of sylvatic triatomine populations in central-coastal Ecuador. *Journal of medical entomology*, *47(1)*, 80-88. doi: <https://doi.org/10.1603/033.047.0111>
- Starr, M. D., Rojas, J. C., Zeledón, R., Hird, D. W., & Carpenter, T. E. (1991). Chagas' disease: risk factors for house infestation by *Triatoma dimidiata*, the major vector of

Trypanosoma cruzi in Costa Rica. *American journal of epidemiology*, 133(7), 740-747. doi: <https://doi.org/10.1603/033.047.0111>

- Twyman, J. (2010). Género, activos y ciclo de vida: Una comparación de cinco cantones de la provincia de Manabí, Ecuador. Documento de Trabajo. Programa de Género y Cultura. Quito: FLACSO-Sede Ecuador. Visita, 30.
- Vassena, C. V., & Picollo, M. I. (2003). Monitoreo de resistencia a insecticidas en poblaciones de campo de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, insectos vectores de la enfermedad de Chagas. *Revista de Toxicología (en línea)*, 3. doi: <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=19/default.htm>
- Villacís, A. G., Arcos-Terán, L., & Grijalva, M. J. (2008). Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(7), 690-695. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000700011>
- Villacís Salazar, A. G. (2011). Análisis de variabilidad fenotípica y diversidad genética de poblaciones sinantrópicas y silvestres de *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León) en dos provincias endémicas para la enfermedad de Chagas en Ecuador (Bachelor's thesis, Quito/PUCE/2011).
- Villacís, A. G., Ocaña-Mayorga, S., Lascano, M. S., Yumiseva, C. A., Baus, E. G., & Grijalva, M. J. (2015). Abundance, natural infection with trypanosomes, and food source of an endemic species of triatomine, *Panstrongylus howardi* (Neiva 1911), on the Ecuadorian Central Coast. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92(1), 187-192. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0250>.
- Villarreal, D., Nirdé, P., Hide, M., Barnabé, C., & Tibayrenc, M. (2005). Differential gene expression in benzimidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(7), 2701-2709. doi: 10.1128/AAC.49.7.2701-2709.2005
- Warren, D. L., Glor, R. E., & Turelli, M. (2010). ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*, 33(3), 607-611. doi: 10.1111/j.1600-0587.2009.06142.x
- Wiens, J. A., Stralberg, D., Jongsomjit, D., Howell, C. A., & Snyder, M. A. (2009). Niches, models, and climate change: assessing the assumptions and uncertainties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(Supplement 2), 19729-19736. doi: 10.1073/pnas.0901639106.
- Wolff, M., Cuartas, E., Velásquez, C., & Jaramillo, N. (2004). Development cycle of *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) under laboratory conditions. *Journal of medical entomology*, 41(6), 1010-1014. doi: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1010>.

- World Health Organization (2002) Control of Chagas disease. *WHO Technical Report Series*, 905. WHO, Geneva. 109 p. doi: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO_TRS_905.pdf
- World Health Organization, & UNICEF. (2007). Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas: 17-20 de abril de 2005, actualizado en julio de 2007, Buenos Aires, Argentina. doi: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69724/1/TDR_SWG_09_spa.pdf
- World Health Organization. (2010). Health of migrants: the way forward. Report of a global consultation, Madrid, Spain, 3-5 March, 2010. Health of migrants: the way forward. Report of a global consultation, Madrid, Spain, 3-5 March, 2010. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44336/1/9789241599504_eng.pdf
- World Health Organization. (2012). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization technical report series, (975). http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf
- World Health Organization. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates= Maladie de Chagas en Amérique latine: le point épidémiologique basé sur les estimations de 2010. *Wkly Epidemiol Rec*, 90(06), 33-44.
- Yost, A. C., Petersen, S. L., Gregg, M., & Miller, R. (2008). Predictive modeling and mapping sage grouse (*Centrocercus urophasianus*) nesting habitat using Maximum Entropy and a long-term dataset from Southern Oregon. *Ecological Informatics*, 3(6), 375-386. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2008.08.004>
- Zabala, N. A., & D'Antonio, M. (1988). Patrones de alimentacion y defecacion en ninfas de 5o estadio de cuatro especies de triatomineos (*Rhodnius prolixus*, *Triatoma pallidipennis*, *T. infestans* y *T. brasiliensis*, Hemiptera, Reduviidae. *Acta científica venezolana*.
- Zeledón R, Guardia VM, Zúñiga A, Swartzwelder JC. (1970). Biology and ethology of *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811). I Life cycle, amount of blood ingested, resistance to starvation, and size of adults. *J Med Entomol* 7: 313-319. doi: <https://doi.org/10.1093/jmedent/7.3.313>
- Zeledón, R., Alvarado, R., & Jirón, L. F. (1977). Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera: Reduviidae). *Acta tropica*, 34(1), 65-77. doi: <http://europepmc.org/abstract/med/16468>
- Zeledón, R., Cordero, M., Marroquín, R., & Lorosa, E. S. (2010). Life cycle of *Triatoma ryckmani* (Hemiptera: Reduviidae) in the laboratory, feeding patterns in nature and experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(1), 99-102. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000100015>
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. D. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A. M., Machado, C. R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends

TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054. doi:
<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>

10. FIGURAS

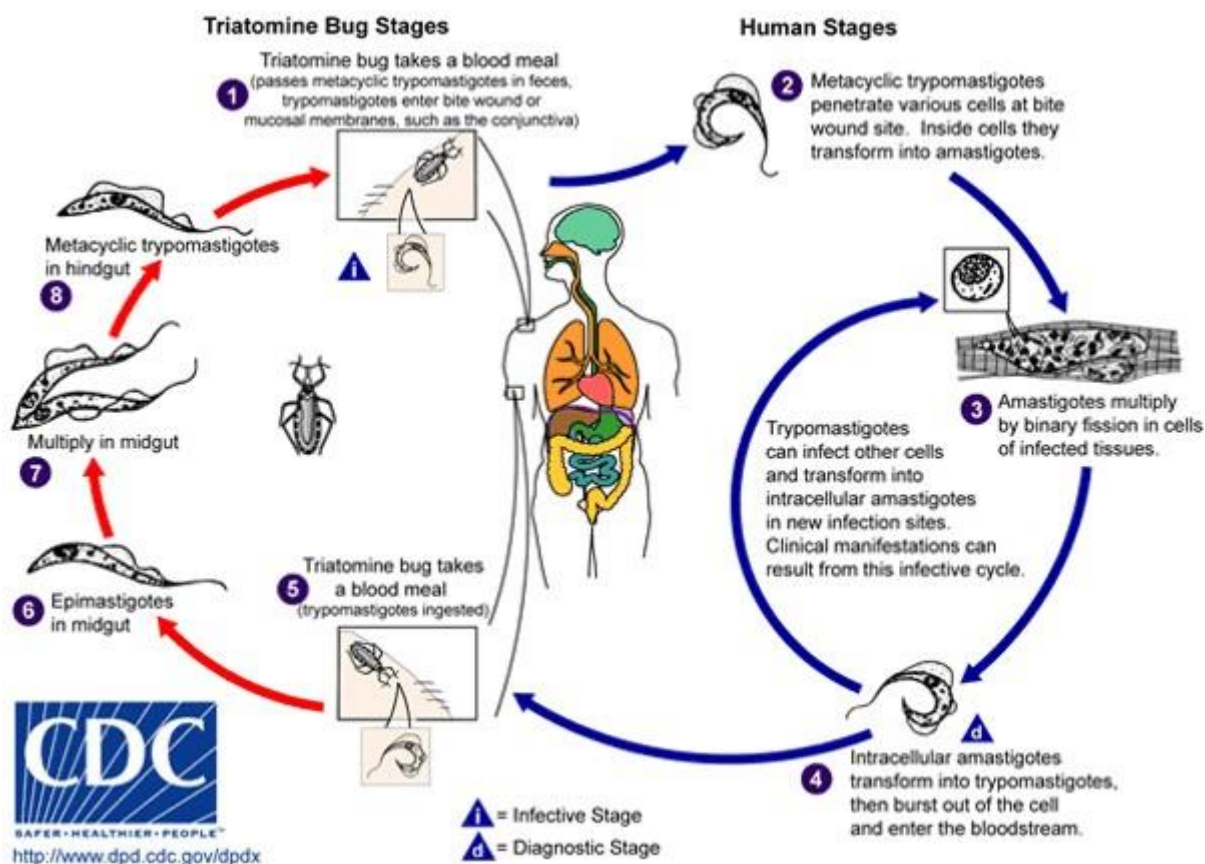


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (CDC, 2016)

Un triatomino (vector) infectado se alimenta de la sangre del hospedero, defeca cerca de la herida donde ingresó la probóscide, liberando la forma tripomastigote del parásito *Trypanosoma cruzi*. El tripomastigote ingresa al hospedero por la herida o a través de una mucosa intacta, por ejemplo la conjuntiva (1). Una vez dentro del hospedero, los tripomastigotes invaden células cercanas al sitio de inoculación, donde se diferencian en amastigotes intracelulares (2). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria (3) y se diferencian en tripomastigotes para luego ser liberados en el sistema circulatorio como tripomastigotes sanguíneos (4). Estos últimos infectan células de una variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en los nuevos sitios de infección.

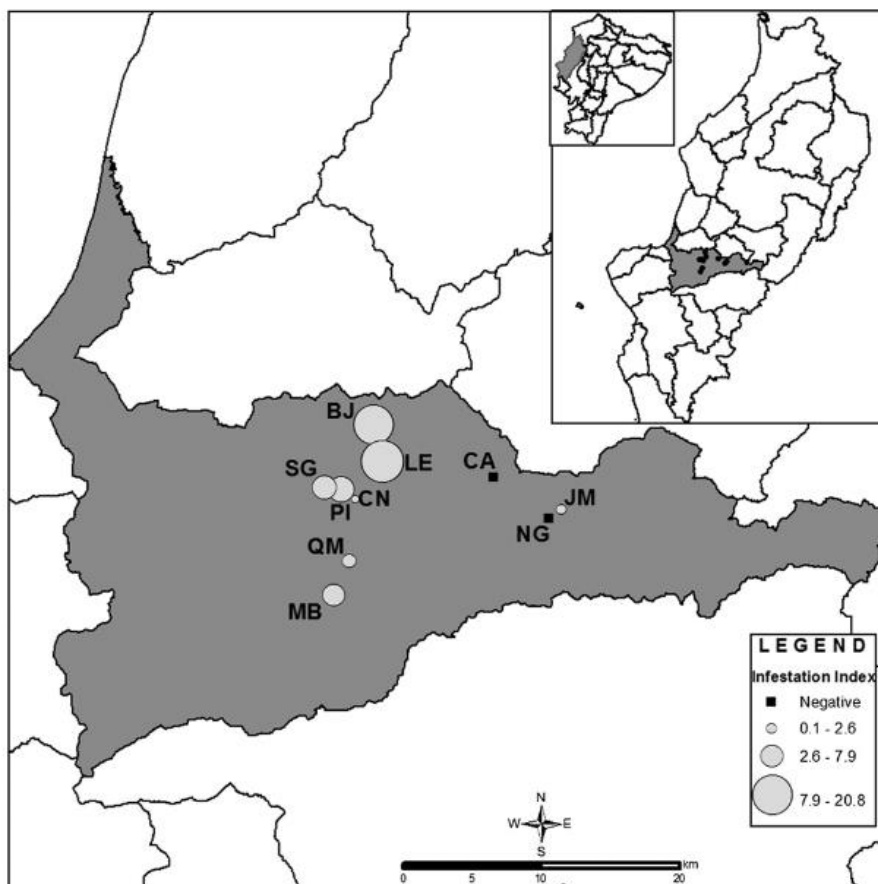


Figura 2. Mapa de Portoviejo, Provincia de Manabí, indicando las localidades de infestación (círculos), las mismas donde se realizaron colectas de *P. howardi*.

Comunidades: BJ, Bejuco; CA, Cruz alta de Miguelillo; CN, La Ciénaga; JM, Jesús María; LE, La Encantada; MB, Maconta Abajo; NG, San Gregorio; PI, Pimpiguasí; QM, Quebrada de Maconta; SG, San Gabriel (Villacís *et al.*, 2015).

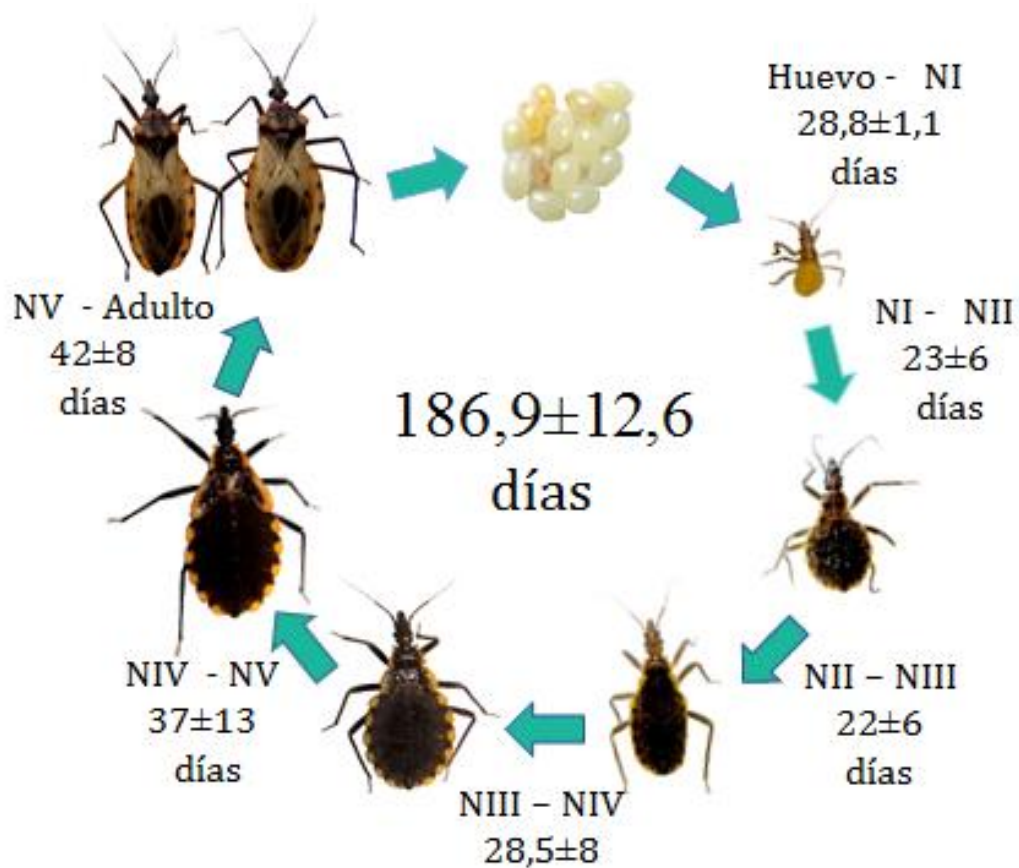


Figura 3. Ciclo de vida, bajo condiciones de laboratorio. Promedio de días que necesitaron los individuos de *Panstrongylus howardi* pertenecientes a la provincia de Manabí, en cada una de sus etapas de desarrollo para mudar al siguiente estadio (Castillo, 2017).

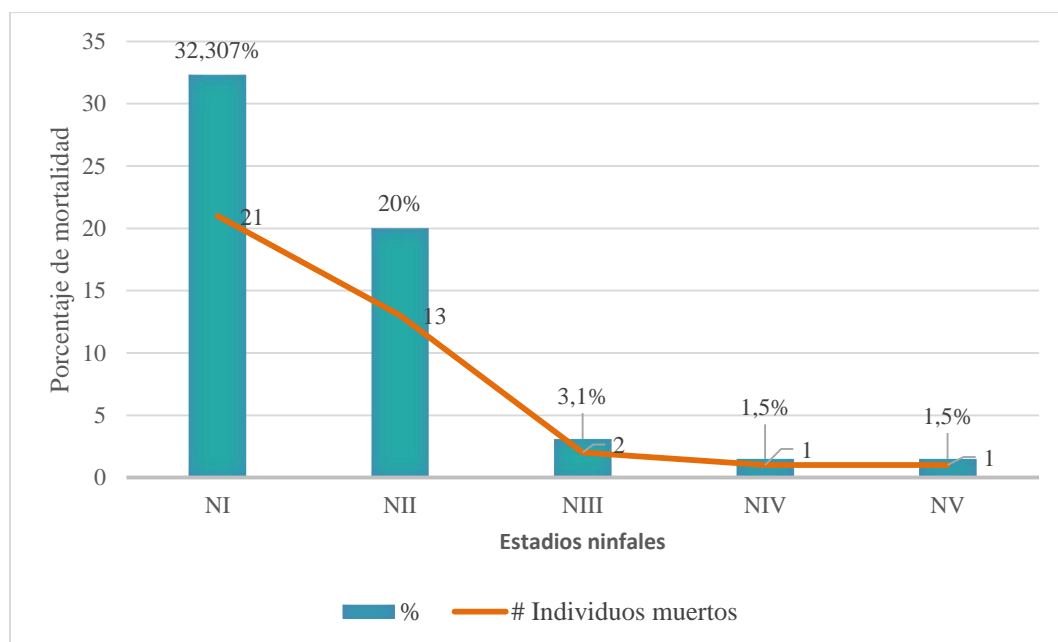


Figura 4. Porcentaje de mortalidad de *P. howardi* bajo condiciones controladas de laboratorio.

Las barras muestran el porcentaje de mortalidad por estadio ninfal, mientras que la línea de tendencia muestra el número de individuos muertos por cada estadio ninfal.

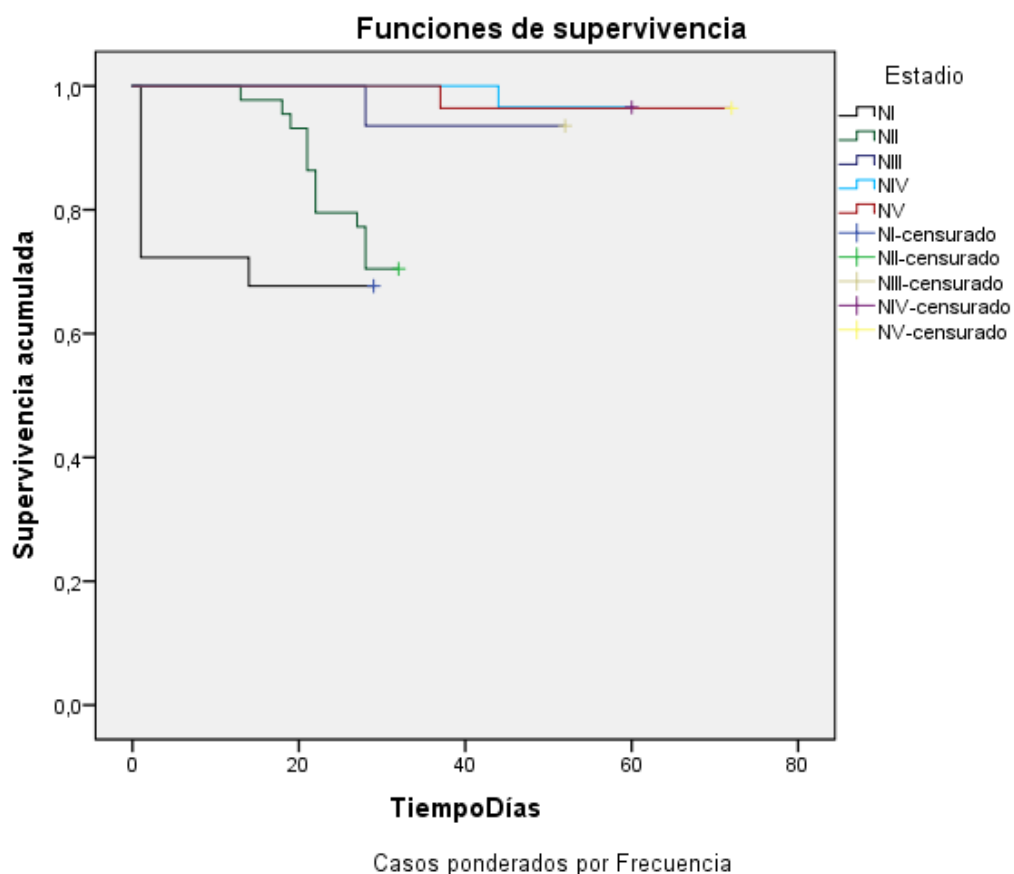


Figura 5. Curvas de supervivencia de *P. howardi* bajo condiciones de laboratorio

Las líneas corresponden a cada uno de los cinco estadios ninfales de *P. howardi*, el eje "x" representa la supervivencia total. Mientras que en el eje "y" se tiene el tiempo en días máximo que sobrevivieron los individuos por estadio. Las líneas correspondientes a censurado hace referencia al tiempo máximo de supervivencia.

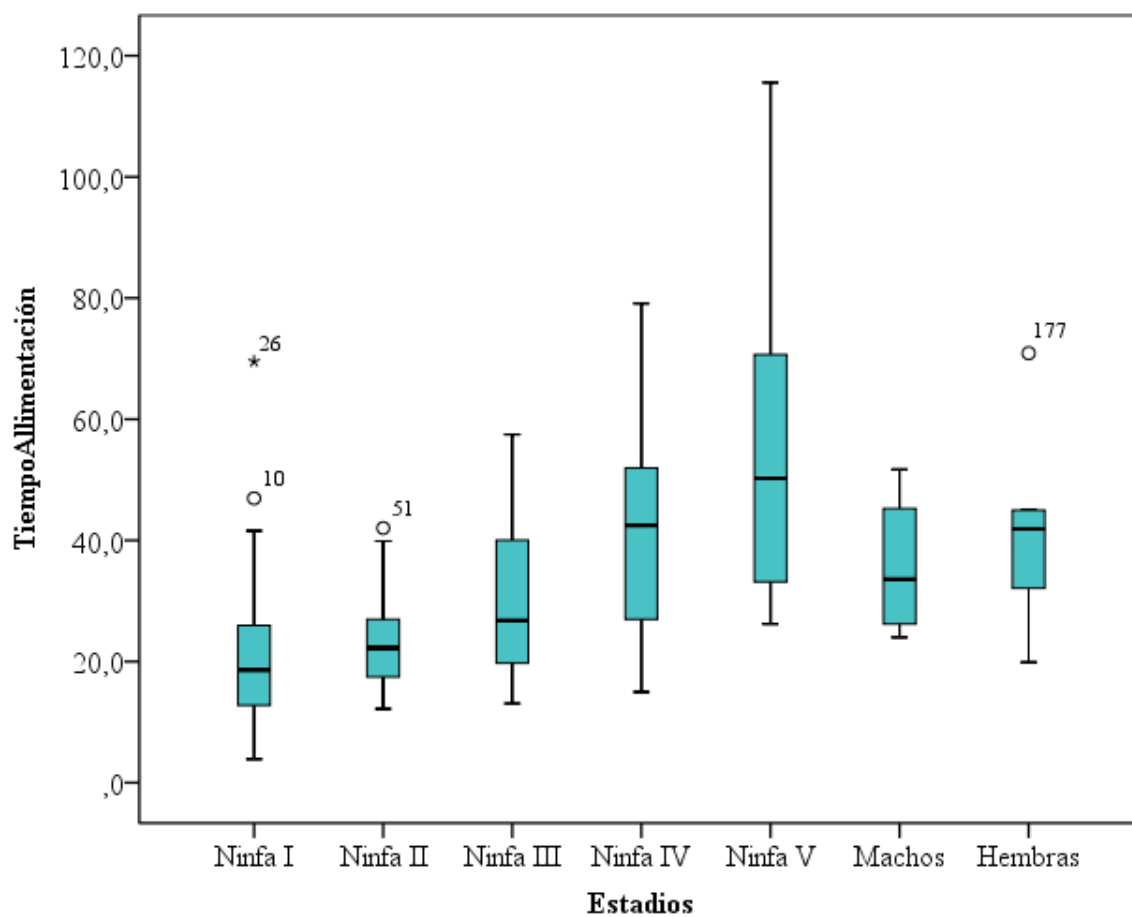


Figura 6. Tiempo de alimentación (min) por estadio ninfal de *P. howardi* bajo condiciones de laboratorio

La figura muestra los valores correspondientes al promedio y su respectiva desviación estándar del tiempo en minutos, se observa lo que cada uno de los estadios ninfales tardó en alimentarse.

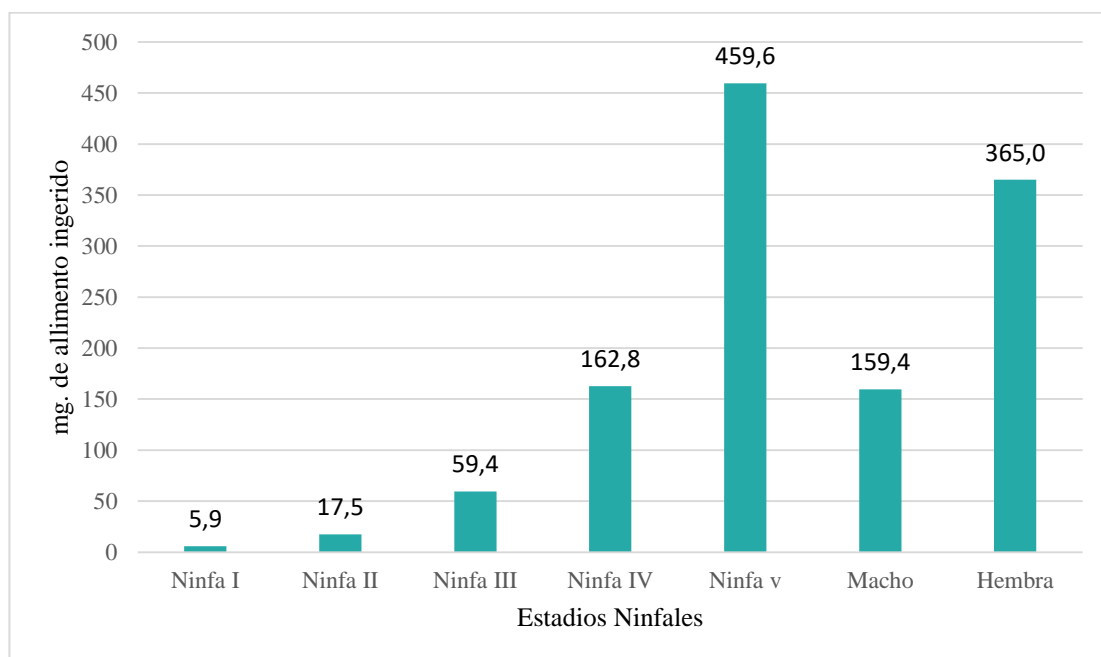


Figura 7. Alimento ingerido (mg. de sangre) por estadio ninfal de *P. howardi* bajo condiciones de laboratorio.

La figura muestra los valores promedio y su desviación estándar de sangre ingeridos (mg.) por cada estadio ninfal hasta finalizar su desarrollo.

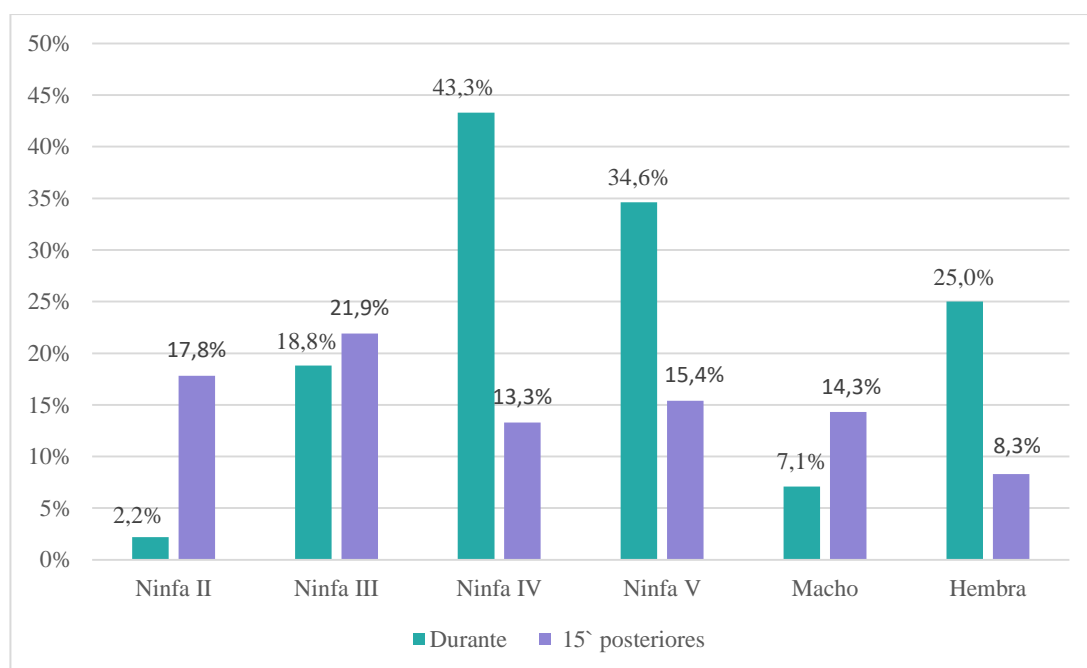


Figura 8. Defecación de *Panstrongylus howardi* bajo condiciones de laboratorio por estadio ninfal

Porcentaje de individuos de cada estadio ninfal de *P. howardi* que defecaron durante la alimentación y 15 minutos después de la misma.

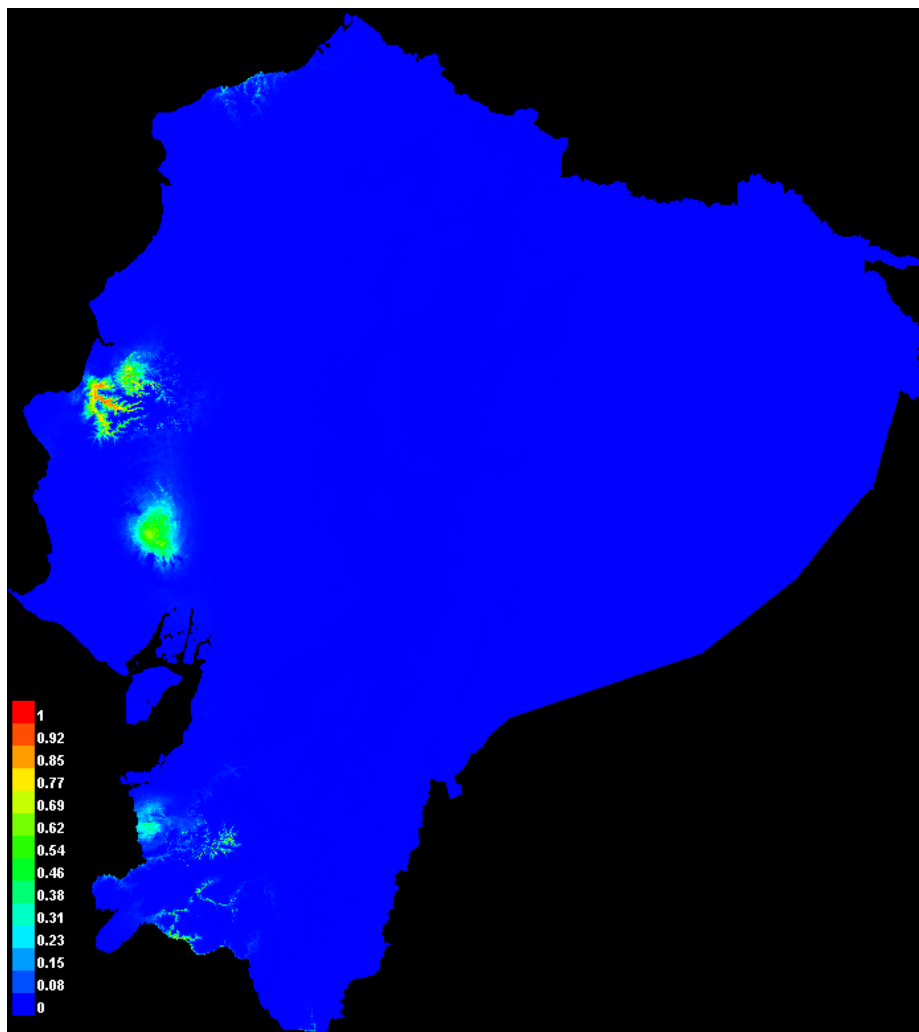


Figura 9. Mapa del Ecuador, mostrando predicciones de idoneidad de condiciones o áreas aptas para *Panstrongylus howardi*.

Los colores rojos o valores de 1 indican alta probabilidad de idoneidad de condiciones, verdes indican las condiciones típicas de los lugares de presencia de la especie, y los claros de azul baja probabilidad de idoneidad de condiciones.

11. TABLAS

Tabla 1. Análisis del ciclo de vida de *Panstrongylus howardi* bajo condiciones de laboratorio.

Etapas de desarrollo	# de individuos	Amplitud					
		Mín	Max	<i>M</i>	<i>IQR</i>	<i>q 25</i>	<i>q 75</i>
Huevo-NI	145	27	34	28,8	1,1	28	30
NI-NII	45	11	29	23	6	22	27,5
NII-NIII	43	13	32	22	6	21	27
NIII-NIV	30	20	52	28,5	8	27,8	36
NIV-V	28	24	60	37	13	30	42,8
NV-adulto	27	27	72	42	8	36	44
Total	145	171	223	186,9	12,2	179	190,5

#: el número total de individuos por estadio. *M*: Mediana, para cada estadio ninfal; *IQR*: rango intercuartílico; *q25*: rango intercuartílico al 25%; *q75*: rango intercuartílico al 75%.

Tabla 2. Mortalidad de *Panstrongylus howardi* bajo condiciones de laboratorio

Estadios	<i>lx</i>	<i>dx</i>	%
NI	65	21	32,3
NII	44	13	20
NIII	31	2	3,1
NIV	29	1	1,5
NV	28	1	1,5
Macho	12	0	0
Hembra	15	0	0

lx: número de triatomíneos en cada estadio ninfal; *dx*: número de triatomíneos muertos por estadio ninfal, %: porcentaje de muertes respecto al tamaño de la muestra inicial (*n*).

Tabla 3. Supervivencia por estadio y total de *Panstrongylus howardi* bajo condiciones de laboratorio

Estadio	N total	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
NI	65	21	44	67,7%
NII	44	13	31	70,5%
NIII	31	2	29	93,5%
NIV	29	1	28	96,6%
NV	28	1	27	96,4%
Macho	15	0	15	100,0%
Hembra	12	0	12	100,0%
Total	224	38	186	83,0%

Dónde: N total: son el número total de individuos por estadio ninfal, N eventos: es en número de individuos muertos por estadio; los datos marcados como censurados hacen referencia a N: número de individuos que sobrevivieron con su respectivo porcentaje.

Tabla 4. Tiempo (minutos) de ingreso de la probóscide de *Panstrongylus howardi* en condiciones de laboratorio.

Estadio	Amplitud			
	<i>M</i>	<i>IQR</i>	Tiempo mínimo (min)	Tiempo Máximo (max)
NI	5,2	6,2	0,2	14,5
NII	5,2	6	0,3	14,1
NIII	3,1	4,2	0,5	13,5
NIV	5,5	7,9	0,22	11,3
NV	7,3	5,3	2,1	14,0
Macho	10,6	6,6	5,5	13,3
Hembra	9,1	4,8	3,3	12,2
Total	6	3,8	0,15	14,5

M: Mediana en minutos de alimentación; *IQR*: Rango intercuartílico.

Tabla 5. Hábitos de alimentación (Tiempo mínimo y máximo (minutos) de alimentación) de *Panstrongylus howardi* en condiciones de laboratorio.

Estadio	Amplitud			
	<i>M</i>	<i>IQR</i> (mg)	Tiempo mínimo (min)	Tiempo Máximo (max)
NI	18,2	14,1	3,88	69,5
NII	22,3	10,3	12,2	42,1
NIII	26,8	20,6	13,07	57,5
NIV	42,5	25,1	14,9	79,1
NV	50,2	38,8	26,2	115,5
Machos	35,2	24,2	24	51,7
Hembras	38,8	32	19,9	70,9

m : Media o promedio de tiempo (minutos) de alimentación; *s*: Desviación estándar.

Tabla 6. Cantidad de sangre ingerida (mg.) por estadio ninfal de *Panstrongylus howardi* bajo condiciones de laboratorio.

Estadio	<i>M</i> (mg)	<i>IQR</i> (mg)	Amplitud	
			Alimento mínimo (min)	Alimento máximo (max)
NI	5,9	3,1	0,2	8,4
NII	17,5	7,5	5,1	41
NIII	59,4	44,6	18,9	581
NIV	162,8	123,4	13,7	834,5
NV	459,6	315,2	96	847,7
Macho	159,4	39,9	148,7	222,5
Hembra	365	202	185,3	488,5

M: Mediana en miligramos de alimento ingerido; *IQR*: Rango intercuartílico.

Tabla 7. Dinámica de defecación de *Panstrongylus howardi* bajo condiciones de laboratorio.

Estadio	# de triatominos	Tiempo (minutos) mínimo de defecación durante la alimentación	Tiempo (minutos) de defecación durante la alimentación (Mediana)	Tiempo (minutos) máximo de defecación durante la alimentación	% de individuos defecaron durante alimentación	# de individuos defecaron durante alimentación	% de individuos defecaron 15 min posterior alimentación	# individuos defecaron 15 min posterior alimentación
NI	49	0,0	-	0,0	0	0	2	1
NII	44	35,9	35,9	0,0	2,2	1	17,8	8
NIII	30	16,3	27,3	34,2	18,8	6	21,9	7
NIV	28	19,4	33,2	45,4	43,3	13	13,3	4
NV	27	23,1	40,3	69,4	34,6	9	15,4	4
Macho	15	33,1	33,1	33,1	7,1	1	14,3	2
Hembra	12	23,1	36,3	44,2	25	3	8,3	1

Tabla 8. Resumen de los hábitos de alimentación y defecación de *Panstrongylus howardi* bajo condiciones de laboratorio

Estadio	N	Tiempo de ingreso probóscide al hospedero (min)	Tiempo de alimentación (min)	Sangre ingerida (mg)	Veces el peso inicial	% de defecación durante la alimentación
		<i>M</i>	<i>M</i>	<i>M</i>	<i>M</i>	%
		I C 95%	I C 95%	I C 95%	I C 95%	I C 95%
NI	49	5,2	20,8±12,2	5,9	5,9	0
		5-7,3	17,3-24,3	4,6-5,7	5,6-8,2	
NII	44	5,2	22,9±7,3	17,5	7,2	2,2
		3,8-6,7	20,5-25,4	16,3-21,1	6,7-8,3	
NIII	30	3,1	29,4±11,2	59,4	7,8	18,8
		3,1-6,3	25,2-33,6	38,9-113,3	6,3-8,3	
NIV	28	5,5	42,2±17,3	162,8	6	43,3
		3,7-7,2	35,5-48,9	137,1-256,9	5,1-7,2	
NV	27	7,3	52,9±22,9	459,6	5,7	34,6
		5,7-8,7	43,2-82,6	341,3-502,8	4,9-7,5	
Macho	15	10,6	34,7±14,9	159,4	1,75	7,1
		4,5-15,5	2,3-71,6	77,9-275,9	1,4-2,3	
Hembra	12	9,1	41,4±16,9	365,8	5,1	25
		4,5-12,5	23,6-59,2	236,4-472,3	2,5-8,2	

m: Media o promedio en miligramos de alimento ingerido; *s*: Desviación estándar; *M*: mediana.

12. ANEXOS

Anexo 1. Calculo de Kruskal Wallis obtenidos para el ciclo de vida de *P. howardi* utilizando SPSS (v 23.0)

Pruebas de normalidad

Kolmogorov-Smirnov ^a			
	Estadístico	Gl	Sig.
Días	,195	173	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de Kruskal-Wallis

Rangos

	Estadios	N	Rango promedio
Días	Ninfa I	45	56,31
	Ninfa II	43	47,08
	Ninfa III	30	98,43
	Ninfa IV	28	132,45
	Ninfa V	27	141,89
	Total	173	

Estadísticos de prueba^{a,b}

	días
Chi-cuadrado	101,811
Gl	4
Sig. Asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

Al no presentarse normalidad en los estadios ninfales de *P. howardi*, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis que permitió observar diferencias altamente significativas entre los estadios ninfales.

Anexo 2. Análisis de supervivencia de Log-rank para *P. howardi*

Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	37,922	6	,000

Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de Estadio.

Se observa que no existen diferencias significativas en cuanto a la supervivencia entre estadios ninfales de *P. howardi*.

Anexo 3. Análisis estadístico para el tiempo de picada de *P. howardi* utilizando SPSS (v 23.0)

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Estadístico	gl	Sig.
Tiempo Picada	,098	152	,001

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de Kruskal-Wallis

	Estadios	N	Rango promedio
Tiempo Picada	Ninfa I	47	78,77
	Ninfa II	29	68,38
	Ninfa III	26	60,46
	Ninfa IV	20	71,10
	Ninfa V	21	92,24
	Macho	4	120,50
	Hembra	5	106,00
	Total	152	

Estadísticos de prueba^{a,b}

	TiempoPicada
Chi-cuadrado	13,788
gl	6
Sig. asintótica	,032

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:
Estadios

Los estadísticos demuestran que existe diferencias significativas ($p=0,032$) entre los distintos estadios ninfales en cuanto al tiempo de ingreso de la probóscide al hospedero.

Anexo 4. Análisis estadístico para el tiempo de alimentación de *P. howardi*

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Estadístico	gl	Sig.
minAlimentación	,051	177	,200

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

LogTiempoAlimentación

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,289	6	170	,038

ANOVA

LogTiempoAlimentación

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4,326	6	,721	18,474	,000
Dentro de grupos	6,635	170	,039		
Total	10,961	176			

Anexo 4. Análisis estadístico para el tiempo de alimentación de *P. howardi* (Continuación...)

LogTiempoAlimentación

Tukey B^{a,b}

Estadios	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
NinfaI	49	20,8241		
NinfaII	37	22,9685	22,9685	
NinfaIII	30	29,4281	29,4281	
Macho	3		34,6800	34,6800
NinfaIV	28		42,1575	42,1575
Hembra	6		41,4183	41,4183
NinfaV	24			52,9009

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,636.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Las pruebas estadísticas demuestran que existen diferencias significativas entre los estadios, formándose tres grupos en la prueba de Tukey.

Anexo 5. Análisis estadísticos para la cantidad de alimento ingerido por *P. howardi* con SPSS (v23.0)

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Estadístico	gl	Sig.
mgAlimento	,246	168	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

Kruskal-Wallis

	Estadio	N	Rango promedio
mgAlimento	Ninfa I	48	27,40
	Ninfa II	35	63,53
	Ninfa III	29	101,05
	Ninfa IV	25	125,78
	Ninfa V	22	150,91
	Macho	3	130,00
	Hembra	6	145,42
	Total	168	

Estadísticos de prueba^{a,b}

	mgAlimento
Chi-cuadrado	147,073
gl	6
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

Anexo 5. Análisis estadísticos para la cantidad de alimento ingerido por *P. howardi* con SPSS (v23.0) (Continuación...)

Al no presentar normalidad ni homogeneidad de varianzas se procedió a realizar estadísticos no paramétricos de Kruskal-wallis. En los estadísticos se observa la existencia de diferencias significativas respecto a la cantidad de alimento ingerido por los distintos estadios ninfales de *P. howardi*.

Anexo 6. Variables ecológicas utilizadas para el modelamiento de nicho ecológico

Temperatura media anual (°C)	$Temperatura\ media\ anual = ((tmax1 + tmax2 + \dots + tmax12)/12 + (tmin1 + tmin2 + \dots + tmin12)/12)/2$, en cada estación
Rango de temperatura media diurna (media mensual de (temp. máxima – temp. mínima))	$Rango\ de\ temperatura\ media\ diurna = ((tmax1 + tmax2 + \dots + tmax12)/12 - (tmin1 + tmin2 + \dots + tmin12)/12)$, en cada estación
Isotermalidad. Índice de variabilidad de la temperatura (P2/P7)*100(Razón del rango diurno promedio con respecto al rango anual)	$Isotermalidad = (Bio2/Bio7) * 100$, en cada estación
Estacionalidad de la temperatura (desviación estándar * 100)	$Estacionalidad\ de\ la\ temperatura = desviación\ estándar\ de\ la\ temperatura\ media\ mensual * 100$, en cada estación
Temperatura máxima del mes más cálido (°C)	De las 12 climatologías mensuales de temperatura máxima, se elige el valor más alto por estación
Temperatura mínima del mes más frío (°C)	De las 12 climatologías mensuales de temperatura mínima, se elige el valor más bajo por estación
Rango de temperatura anual (°C)(temp. máx. del mes más cálido – temp. Mín. del mes más frío)	$Rango\ de\ temperatura\ anual = Bio5 - Bio6$, por estación
Temperatura promedio del trimestre más lluvioso (°C)	$Temperatura\ promedio\ del\ trimestre\ más\ lluvioso = (((Tmax1+Tmax2+Tmax3)/3) + ((Tmin1+Tmin2+Tmin3)/3)) / 2$, por estación
Temperatura promedio del trimestre más seco (°C)	$Temperatura\ promedio\ del\ trimestre\ más\ seco = (((Tmax1+Tmax2+Tmax3)/3) + ((Tmin1+Tmin2+Tmin3)/3)) / 2$, por estación
Temperatura promedio del trimestre más cálido (°C)	$Temperatura\ promedio\ del\ trimestre\ más\ cálido = (((Tmax1+Tmax2+Tmax3)/3) + ((Tmin1+Tmin2+Tmin3)/3)) / 2$, por estación
Temperatura promedio del trimestre más frío (°C)	$Temperatura\ promedio\ del\ trimestre\ más\ frío = (((Tmax1+Tmax2+Tmax3)/3) + ((Tmin1+Tmin2+Tmin3)/3)) / 2$, por estación
Precipitación anual (mm)	$Precipitación\ anual = (prec1 + prec2 + \dots + prec12)$,

por	
Precipitación del mes más lluvioso (mm)	De las 12 climatologías mensuales de precipitación, se elige el valor más alto por estación
Precipitación del mes más seco (mm)	De las 12 climatologías mensuales de precipitación, se elige el valor más bajo por estación
Estacionalidad de la precipitación (coeficiente de variación)	$Estacionalidad\ de\ la\ precipitación = (Desviación\ estándar\ (prec1, prec2, \dots, prec12) * 100) / (1 + ((prec1 + prec2 + \dots + prec12) / 12))$, por estación
Precipitación del trimestre más lluvioso (mm)	$Precipitación\ del\ trimestre\ más\ lluvioso = Prec1 + Prec2 + Prec3$, por estación
Precipitación del trimestre más seco (mm)	$Precipitación\ del\ trimestre\ más\ seco = Prec1 + Prec2 + Prec3$, por estación
Precipitación del trimestre más cálido (mm)	$Precipitación\ del\ trimestre\ más\ cálido = Prec1 + Prec2 + Prec3$, por estación
Precipitación del trimestre más frío (mm)	$Precipitación\ del\ trimestre\ más\ frío = Prec1 + Prec2 + Prec3$, por estación

Anexo7. Tablas con valores de contribución por variable climática para la idoneidad de hábitat de *Panstrongylus howardi*, los análisis logísticos con 5 repeticiones.

Logística					
	<i>Rep. 0</i>	<i>Rep.1</i>	<i>Rep.2</i>	<i>Rep.3</i>	<i>Rep.4</i>
Variable	Porcentaje de contribución				
Rango Altitudinal Ecuador	26,5	30,4	28,1	27,5	28,1
Precipitación del trimestre más frío (mm)	26	5,3	6	6,1	12,1
Estacionalidad de la temperatura	12,5	14	12,3	12,5	12,5
Precipitación del trimestre más cálido (mm)	11,8	10,4	11,4	11,3	12,1
Rango de temperatura media diurna	9,5	10,4	12,3	9,7	10
Precipitación del trimestre más seco (mm)	7,7	24,1	24,2	24,4	20,2

Anexo 7. Tablas con valores de contribución por variable climática de los análisis logísticos con 8 repeticiones. (Continuación...)

Logística								
<i>Rep.0 Rep.1 Rep.2 Rep.3 Rep.4 Rep.5 Rep.6 Rep.7</i>								
Variable	Porcentaje de contribución							
Rangos altitudinales Ecuador	27,3	27,9	29,2	27,5	28,1	29	30,9	30,3
Precipitación del trimestre más frío (mm)	26	5,8	6,7	6,1	12,1	10,9	11,4	12,1
Estacionalidad de la temperatura	14,7	13,1	12	12,5	12,5	13,1	12,8	12,4
Precipitación del trimestre más cálido (mm)	11,6	10,3	12,5	11,3	12,1	13,4	12,9	12,5
Rango de temperatura media diurna	9,7	11,2	11,3	9,7	10	10,9	10,8	10,2
Precipitación del trimestre más seco (mm)	7,8	21,7	24,6	24,4	20,2	19,6	20,1	20,5

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Frances Deborah Castillo Erazo, con C.C. 172487320-1, autora del trabajo de graduación intitulado: “Ciclo de vida, hábitos de alimentación y defecación de *Panstrongylus howardi* (Neiva, 1911) especie endémica de la provincia de Manabí, y su posible distribución geográfica”, previa la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 07 de Agosto del 2017

f) 

CC# 172487320-1

